THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Écologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Chimie, Écologie, Géosciences et AgroSciences Théodore Monod (Poitiers)
Secteur de recherche : Biologie des populations et écologie

Présentée par :
Cybèle Prigot-Maurice

Priming immunitaire chez Armadillidium Vulgare : approches phénoménologique, mécanistique et évolutive

Directeur(s) de Thèse :
Christine Braquart-Varnier, Sophie Beltran-Bech

Soutenue le 17 décembre 2021 devant le jury

Jury :

Président	**Franck Morel**	Professeur, LITEC, Université de Poitiers
Rapporteur	**Yannick Moret**	Directeur de recherche CNRS, BioGéoSciences, Université de Dijon
Rapporteur	**Mathieu Sicard**	Professeur, ISEM, Université de Montpellier
Membre	**Christine Braquart-Varnier**	Professeur, EBI, Université de Poitiers
Membre	**Sophie Beltran-Bech**	Maître de conférences, EBI, Université de Poitiers
Membre	**Joël Meunier**	Chargé de recherche CNRS, IRBI, Université de Tours
Membre	**Aurélie Tasiemski**	Maître de conférences, Évo-Éco-Paléo, Université de Lille

Pour citer cette thèse :
Cybèle Prigot-Maurice. *Priming immunitaire chez Armadillidium Vulgare : approches phénoménologique, mécanistique et évolutive* [En ligne]. Thèse Biologie des populations et écologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2021. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale « *Théodore Monod* »
Chimie, Écologie, Géosciences, Agrosciences
Secteur de Recherche : Biologie des populations et écologie

Présentée par :

Cybèle Prigot-Maurice

PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *ARMADILLIDIUM VULGARE* : APPROCHES PHENOMÉNOLOGIQUE, MÉCANISTIQUE ET ÉVOLUTIVE

Directrices de Thèse :
Christine Braquart-Varnier
Sophie Beltran-Bech

Soutenue le 17 décembre 2021
devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteur	Yannick Moret	Directeur de recherche CNRS, Université de Bourgogne
Rapporteur	Mathieu Sicard	Professeur des Universités, Université de Montpellier
Examinateur	Joël Meunier	Chargé de recherche CNRS, Université de Tours
Examinateur	Franck Morel	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Examinateur	Aurélie Tasiemski	Maîtresse de conférences, Université de Lille
Directrice	Christine Braquart-Varnier	Professeure des Universités, Université de Poitiers
Co-directrice	Sophie Beltran-Bech	Maîtresse de conférences, Université de Poitiers

Je dédie ce manuscrit à mes parents

car si tout cela est possible aujourd'hui,

c'est fondamentalement grâce à vous.

REMERCIEMENTS

Au jury de thèse

Je sais combien le temps est précieux dans le domaine de la recherche, alors j'adresse mes sincères remerciements aux rapporteurs, **Yannick Moret** et **Mathieu Sicard**, ainsi qu'aux examinateurs**, Joël Meunier, Franck Morel** et **Aurélie Tasiemski** d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je suis persuadée que vos expertises apporteront des discussions et des idées complémentaires aux travaux déjà effectués. Merci pour votre implication et l'intérêt que vous portez à mon sujet de thèse.

Au laboratoire EBI

Je remercie tout d'abord **Jean-Marc Bergeaud** et **Richard Cordaux** (Directeur du laboratoire et Chef de l'équipe EES), pour m'avoir chaleureusement accepté au sein du laboratoire et soutenue durant ces trois années.

Sophie, Christine, « mes cheffes », merci de m'avoir choisi pour cette aventure. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, la confiance que vous m'avez accordée et de m'avoir appris à me surpasser. Malgré vos emplois du temps plus que surchargés, vous avez toujours été présentes pour moi, merci de m'avoir si bien accompagnée. Je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez fait pour ma thèse. J'ai adoré faire ce doctorat avec vous !

Je remercie toute l'équipe technique d'EES : **Maryline Raimond**, **Carine Delaunay**, **Alexandra Laffite**, **Hélène Paulhac**, **Tiffany Laverré** et **Isabelle Giraud,** pour votre aide précieuse, vos conseils et surtout pour m'avoir transmis votre savoir-faire. Sans vous, les expériences seraient beaucoup plus compliquées ! Je remercie également **Christelle Mirebeau** (Secrétaire de l'équipe EES) pour m'avoir accompagnée dans toutes les démarches administratives.

Merci à tous **les enseignants-chercheurs de EES,** de m'avoir enseigné la biologie. Si je suis ici aujourd'hui à rédiger ces mots, c'est grâce à votre passion pour les sciences que vous m'avez transmise durant mon cursus scolaire. Je vous remercie pour vos bons conseils durant ma thèse (**Romain Pigeault, Richard Cordaux, Jean Peccoud**), de m'avoir aidé pour l'enseignement (**Joanne Bertaux, Isabelle Marcadé, Yves Caubet, Didier Bouchon, Roland Raimond**) mais aussi de m'avoir encouragée et félicitée pour mon travail (**Bouziane Moumen, Nicolas Bech, Frédéric Grand-Jean, Julia Clause, Pierre Grève, Nicolas Desguines, Freddy-Jeanne Richard**).

Je remercie aussi **Julien Verdon**, **Alexandre Crépin** (Maîtres de conférences, équipe MHE), **Willy Aucher** (Ingénieur de recherches, équipe MHE) ainsi que **Adriana Delwail** (Ingénieure responsable de la plateforme Cytométrie ImageUP). Merci pour tous vos conseils et votre aide technique pour la cytométrie et les cultures bactériennes.

Aux chercheurs d'ici et d'ailleurs

Je porte d'abord mes remerciements à **Suzel Herstel** (Gérante du centre de soin de la LPO, Rosheim). Merci de m'avoir accueilli durant mon premier stage de licence et de m'avoir guidé dans mon parcours professionnel.

Je remercie également **Jean-Marc Bonzom, Olivier Armant,** (Chercheurs au LECO, IRSN, Cadarache), **Denis Réale** (Professeur à l'UQAM, Quebec) et **Joël Meunier** (Chargé de recherches à l'IRBI), de m'avoir encadré durant mes deux stages de Master. Ces premières expériences professionnelles en recherche m'ont beaucoup appris. Vous m'avez sans aucun doute apporté toutes les connaissances nécessaires pour mener à bien mon doctorat et je vous en remercie ! Je souhaite aussi remercier **Benjamin Gourbal** (Enseignant chercheur à l'IHPE, Perpignan). Merci d'avoir suivi mon projet de thèse et d'avoir apporté tes conseils pertinents sur le priming immunitaire d'*A. vulgare*. Je remercie aussi **Philippe Bulet** (Directeur de recherche de la plateforme Biopark Archamps) pour les corrections et les discussions au sujet de ma première publication.

À l'École Doctorale

Je remercie **Didier Bouchon** (Directeur de l'école doctorale Theodore Monod) pour faire de tout son possible pour assurer la pérennité de cette école doctorale. Je remercie également **Sophie Bergeronneau** (Secrétaire de l'école doctorale) d'avoir été disponible dès que j'avais besoin de conseils et d'explication concernant le doctorat, c'était vraiment une grande aide !

À mes amis scientifiques, devenus des amis tout simplement.

Parce que vous avez toujours été là, dans les meilleurs comme dans les pires moments !

Ma Chacha, je me souviendrai toujours de nos premiers échanges durant mon deuxième stage de L3, en salle 110 « c'est bon là, on détecte bien l'ADN des parents ?! ». Et depuis, on ne s'est jamais lâchées ! Merci pour ton soutien, tes encouragements, ta bonne humeur et ton fameux « salut les moches ! ». Merci pour tous ces bons délires (okéé !). Tu as toujours été bienveillante avec moi ! **Ma petite Paulhac**, merci pour tous ces bons moments en ta compagnie et ta gentillesse incommensurable, pour tes encouragements et ton aide technique qui m'a permis de gagner un temps monstre ! Sans toi, il me resterait encore une montagne de vaisselle ! **Mon vieux Mimi**, ma thèse n'aurait jamais été si palpitante si tu n'avais pas été là ! Je n'oublierai jamais notre « jogging », entre la traversée du Clain, tes pieds abimés et le karaoké, tout ça pour terminer chez Memphis coffee. Merci d'avoir aiguayé ma vie durant ces trois années, merci pour ces discussions philosophiques et récits incroyables ! **Toto le vieux hibou**, toujours là où il faut quand il faut ! Merci à toi pour toutes ces discussions et tes conseils, je garderai toujours en mémoire tes petites fusées si bien dessinées, puisque je suis « trop maniaque » pour les laisser ! Merci pour ton soutien et ta bonne humeur.

Sylvine, ta rigueur et ta force de travail m'ont toujours surpris ! Tu es un exemple à suivre pour moi depuis que tu m'as encadrée en L3 et je te remercie de m'avoir appris tant de choses ! Merci pour les crises de rires, tu as la meilleure voix off que je n'ai jamais entendue !

Ma titine ! Merci pour tous les bons moments au bureau et pour tes conseils sur la thèse. Ton rire m'a toujours fait trop rire ! On n'oubliera jamais le « verse toujours » … **Marius,** ça a toujours été un plaisir de discuter avec toi ! Merci pour toutes tes petites astuces et tes bonnes idées. Je n'oublierai jamais la messe des phasmes morts, enterrés dans le pot du ficus. **Benjamin H.,** tes conseils ont toujours été des plus pertinents ! Merci de m'avoir soutenue et merci pour ces petites soirées sympa en ta compagnie.

Elie GOUDOU ! Qu'est-ce qu'on rigole, même si on n'est pas rassurés ! Merci pour tous ces bons moments et merci d'être aussi bienveillant et soucieux pour les autres. **Thomas Junior**, ralenti la clope ou tu partiras avant l'heure ! Merci de nous avoir fait voyager grâce à tes photos de Martinique ! **Cécilia,** même si on n'a pas vraiment pris le temps d'échanger, merci pour tous tes petits gâteaux cuisinés avec amour ! **Victor,** le dompteur d'abeille ! La bonne humeur toujours au rendez-vous, merci pour ce renouveau dans le bureau et courage pour les modèles de survie, ça va se faire ! **Baptiste**, je n'ai jamais vu quelqu'un d'aussi gentil et serviable que toi. Tu as le cœur sur la main, et merci pour tous les chocolats qui m'ont remonté le moral plus d'une fois ! **Isa,** toujours là pour la cohésion d'équipe ! Merci d'être là et de veiller sur les doctorants. Je n'oublierai jamais l'ultracentrifugation de l'IIV-31, ça va que ce n'était pas le SARs-COV-2 ! **Benjamin M.,** merci pour les crises de rires et ton aide technique aux enseignements ! L'année 2022 s'annonce joyeuse !

À ma famille, mes amis, parfois mêmes les deux à la fois !

Parce que le soutien dans un projet professionnel ne provient pas toujours des personnes impliquées dans ce travail, je remercie :

Ondine, toujours présente après 21 ans d'amitié, avec un seul mot d'ordre « pareil ! ». Tout simplement merci pour ta présence et toutes ces discussions interminables sur le sens de la vie. **Ma Baousm,** tu veilles sur moi et tu es objective quand il le faut, pour les bonnes choses comme pour les mauvaises. Merci pour tout, mais surtout pour les moments de bonheur ! **Louise,** merci de penser à moi régulièrement ! On vit dans deux mondes différents mais on a vécu tellement de belles choses ensemble, que je ne peux t'oublier. **Mon coco,** qui serais-je aujourd'hui sans toi ? Je n'ai pas de frère biologique, mais toi tu es tout comme. Merci de me soutenir depuis toujours et merci d'avoir forgé ma personnalité ! **Zahia**, merci d'être là depuis mon arrivée à Poitiers, de m'encourager et de me guider ! Tu es bien plus que « la maman de Jana » pour moi. Merci pour ton enthousiasme, ta bienveillance et ta générosité !

Ma poulette ! C'est la spirale infernale depuis la L3, sans toi je ne serais jamais arrivée là ! Merci pour toutes ces crises de rires et ces soirées champêtres ! c'est une vraie symbiose entre nous après 5 ans de coévolution, merci pour tout ! **Ludivine,** merci pour toutes ces discussions devant la fac jusqu'à 21h ! Tu m'as beaucoup appris sur la rigueur du travail et je t'en remercie ! **Margot,** merci d'avoir rajouter de la joie durant notre Master ! Tu m'as toujours encouragé, même les années suivantes et je t'en remercie énormément ! **Noémie,** ma coéquipière à l'IRSN. Sans toi ce stage n'aurait pas été aussi fun ! Merci pour tous ces bons moments, on n'oubliera jamais D.O, pas vrai ? **Bibek, Gulzara,** when I think that all started with a project about indoor and outdoor cats! I am so glad to know you, you have opened my mind with your cultures and your ways of being. Thank you for everything, you will always be welcome in France!

Un grand merci **à toute la petite clic du Blanc, Ingrandes et ces alentours**. Je ne citerai pas de noms car vous êtes bien nombreux, mais je vous remercie pour toutes ces soirées à vos côtés. Merci pour vos sourires, vos joies de vivre et tous les moments de partage. Je pense sincèrement que sans ça, cette thèse m'aurait usée à la longue !

Même si c'est du passé maintenant, je remercie la famille Mazzola-Bianco pour m'avoir soutenue durant mes 8 premières années d'études supérieures. Vous m'avez tous beaucoup apporté et vous m'avez forgé. Comme je l'ai toujours dit, je garderai toujours les bons souvenirs de cette période, on a vécu beaucoup bons moments et il n'y a rien à regretter.

À mes parents

Les plus grands des merci s'adressent à vous. Merci de faire tout votre possible pour moi et de m'aider quoi qu'il advienne. Je vous remercie de m'avoir transmis vos qualités, dont la sagesse, la patience, l'ouverture d'esprit et l'humilité. Vous m'avez appris que dans la vie, s'il n'y a pas de solutions, c'est qu'il n'y a pas de problèmes. Je retiendrai toujours que « demain est un autre jour » et « qu'il n'y a que les cons qui ne changent pas d'avis », parce que ces expressions que vous me répétez souvent prennent leur sens dans beaucoup de situations. Vous êtes mes deux piliers et les meilleurs parents que l'on puisse avoir. Je n'ai jamais vraiment réussi à vous le dire, mais je vous aime par-dessus tout au monde et je serai toujours là pour vous.

À mon « apicultiste » charmant

Nos chemins se sont recroisés au bon moment et dans les bonnes conditions. Je te remercie du fond du cœur d'être à mes côtés chaque jour depuis bientôt 2 ans (héé oui, déjà !). Merci à toi mon p'ti chat de supporter mes états d'âmes. Promis, tu vas bientôt retrouver une chérie en bonne forme ! Merci de m'apporter tout le réconfort émotionnel dont j'ai besoin et merci pour ta bonne humeur au quotidien (ce n'est pas que « 20% » qui parlent) ! Merci pour cette belle histoire et tous ces merveilleux moments avec toi, je ne pouvais vraiment pas espérer mieux ! je t'aime.

Et aux oubliés

Parce que nous ne sommes pas des machines et que notre mémoire nous fait parfois défaut, je remercie tous ceux que j'ai oublié. Je m'excuse par avance, ce n'est pas parce que l'aide apportée n'a pas de valeur, mais plutôt parce que la vie passe à une telle vitesse, que les évènements s'accumulent et que la surcharge mentale fait le tri dans le cerveau. Je dirais même merci aux oubliés qui m'ont mené la vie dure, qui m'ont blessée, vexée, ou contrariée, parce que c'est dans les moments difficiles qu'on saisit l'occasion de se surpasser et d'évoluer.

AVANT PROPOS



Photo *:* Salle d’expérience. Crédit : Cybèle Prigot-Maurice

Fondée en 1432, l'Université de Poitiers est l'une des plus anciennes facultés de France ayant accueilli des personnages aujourd'hui célèbres tels que François Rabelais ou René Descartes (Boissonnade et al., 1932). En 1854 est créée la faculté des sciences où siège aujourd'hui le laboratoire Écologie et Biologie des Interactions (EBI).

Le laboratoire EBI, rattaché au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) depuis 2012 dans une Unité Mixte de Recherche (UMR 7267), se compose de trois équipes de recherche : Micro-organismes, Hôtes, Environnements (MHE), Sucres et Échanges Végétaux-Environnement (SEVE), et Écologie, Évolution, Symbiose (EES). Composée de 16 enseignants chercheurs permanents, 9 personnels techniques et 8 doctorants au moment de ma thèse, l'équipe EES se concentre principalement sur des recherches fondamentales visant à étudier les interactions symbiotiques sur le modèle centré des isopodes terrestres (communément appelés cloportes) et les micro-organismes qu'ils hébergent. Ces analyses relationnelles se focalisent principalement sur la bactérie endosymbiotique *Wolbachia*, étudiée pour ses effets sur la reproduction et la détermination du sexe des isopodes terrestres. Trois axes de recherches principaux sont explorés chez EES : l'évolution et les mécanismes de la symbiose avec *Wolbachia* (phénotypiques, cellulaires et génétiques), l'interaction au sein de l'holobionte (incluant l'hôte, bactéries et virus) et un axe un peu plus général, portant sur la biodiversité au sein des agrosystèmes (génétique des populations, impacts des milieux urbains, etc). Ces thématiques ont, elles aussi, des racines historiques anciennes. L'étude des isopodes terrestres dans les murs de l'Université de Poitiers remonte aux années 1960, au cours desquelles les premiers élevages de cloportes ont été initiés. Aujourd'hui, cet endroit détient plus de 120 000 individus, répartis entre 30 espèces d'isopodes terrestres issues de divers pays du monde (France, Espagne, Danemark, etc.) et dont certaines lignées sont contrôlées génétiquement.

C'est dans cet environnement de travail que ma thèse a vu le jour. Au départ, elle était une partie intégrante du projet collaboratif : « *UniTy* » (pour UNifying Immune innaTe memorY) ayant fait l'objet d'une demande de financement auprès de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en 2018. *UniTy* partait d'un constat simple : il existe une telle diversité de méthodes et de résultats concernant le priming immunitaire chez les invertébrés*, qu'on se doit d'unifier les méthodes expérimentales sur divers modèles biologiques, afin d'en tirer des conclusions comparables. Ainsi, *UniTy* avait pour objectif de (1) démontrer le priming immunitaire et sa spécificité (*i.e.* capacité(s) immunitaire(s) à reconnaitre spécifiquement des pathogènes donnés), (2) tester si cette capacité est un phénomène généralisé chez les

* dans ce manuscrit, j'emploierai le terme « invertébrés » pour désigner le groupe paraphylétique incluant : les métazoaires sans symétrie (spongiaires), les eumétazoaires à symétrie radiaire, les protostomiens ainsi que les échinodermes et les urochordés (ces deux derniers étant des eumétazoaires deutérostomiens).

invertébrés, (3) explorer les forces écologiques influençant son évolution et (4) identifier les mécanismes cellulaires, moléculaires, génétiques et épigénétiques permettant cette potentielle spécificité. Pour répondre à ces objectifs, des spécialistes de 4 Universités (Benjamin Gourbal, Caroline Montagnani, Yannick Moret et Christine Braquart-Varnier), ainsi que leurs collaborateurs, s'étaient concertés pour explorer le priming immunitaire chez 4 espèces modèles phylogénétiquement éloignées, chez qui le priming immunitaire est suspecté, voire observé (Fig.1 ; Moret & Siva-Jothy, 2003 ; Portela et al., 2013 ; Green et al., 2013).

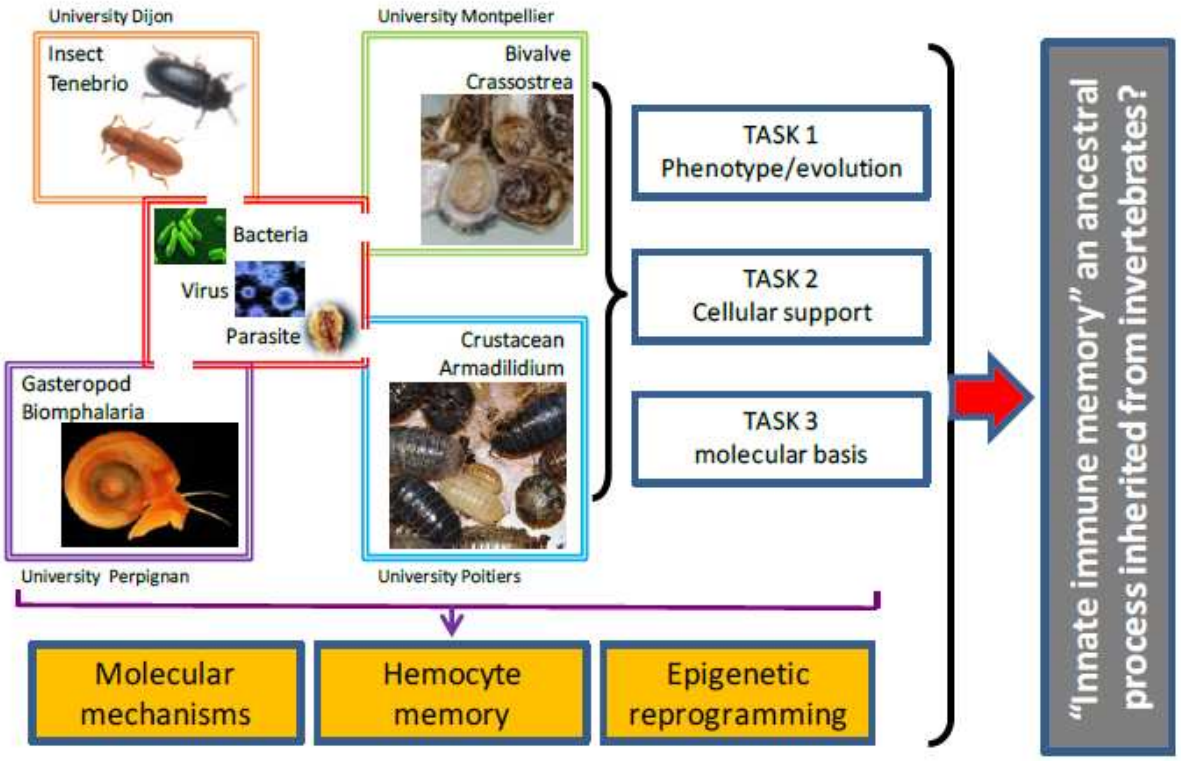


Figure 1. Plan d'action du projet *UniTy*, schéma tiré de la demande d'ANR.

Bien que ce projet collaboratif n'ait pu être mis en œuvre, ma thèse concernant l'étude du priming immunitaire chez le cloporte commun, *Armadillidium vulgare*, a été maintenue et entièrement financée par l'école doctorale Chimie, Écologie, Géosciences, Agrosciences – Théodore Monod (ED n°614) – selon un contrat ministériel. D'octobre 2018 à octobre 2021, elle représentait le projet principal portant sur l'immunité des cloportes dans l'équipe EES, mais également le seul sujet de thèse (à ma connaissance) portant sur le priming immunitaire d'un isopode terrestre. Mes co-directrices, Christine Braquart-Varnier et Sophie Beltran-Bech, ainsi que leur stagiaire de Master 2 Alexandra Cerqueira de Araujo (2017-2018), avaient menées des expériences pilotes avant mon arrivée, apportant des pistes très encourageantes de l'existence d'un priming immunitaire chez *A. vulgare* et de l'influence de *Wolbachia* sur son expression. Elles ont également contribué à la compréhension de son

immunité, en caractérisant les cellules immunitaires (*i.e.* hémocytes ; Chevalier et al., 2011 ; Herbinière et al., 2008), les organes qui les produisent (*i.e.* organes hématopoïétiques ; Braquart-Varnier et al., 2015a), et un peptide antimicrobien spécifique des isopodes terrestres : l'Armadilline (Herbinière et al., 2005 ; Verdon et al., 2016 ; Becking et al., 2020). Leurs travaux ont aussi porté sur l'effet de *Wolbachia* sur les traits d'histoire de vie des isopodes terrestres tels que la survie, la sénescence et la protection contre des pathogènes (Braquart-Varnier et al., 2008 ; Sicard et al., 2010 ; Dittmer et al., 2014 ; Pigeault et al., 2014 ; Braquart-Varnier et al., 2015b ; Valette et al., 2017 ; Depeux et al., 2020), fournissant une base de travail propice à l'étude du priming immunitaire chez *A. vulgare*.

Dans ce manuscrit, j'apporterai des éléments bibliographiques fondamentaux sur l'immunité pour comprendre le contexte global dans lequel s'inscrit le priming immunitaire. J'expliquerai pourquoi le priming immunitaire a fait l'objet de nombreux débats au sein de la communauté scientifique, que représente-t-il, et quelles sont les connaissances actuelles sur son fonctionnement et son évolution. Après avoir exposé les limites mécanistiques et conceptuelles auxquelles nous faisons face lorsque nous parlons de priming immunitaire, je développerai pourquoi les isopodes terrestres sont un modèle biologique prometteur pour approfondir nos connaissances à ce sujet. Cette introduction me permettra de développer les différents objectifs de ma thèse, à savoir :

(1) Valider le processus de priming immunitaire chez *A. vulgare* contre la bactérie pathogène *Salmonella enterica* vivante, de manière phénoménologique (amélioration de la survie) et évolutive (impact sur la reproduction et la sénescence).

(2) Tester ce priming immunitaire avec d'autres modalités d'injections (*S. enterica* inactivées, à différentes doses) afin d'explorer plus précisément le mécanisme sous-jacent du priming immunitaire (réponse cellulaire).

(3) Généraliser le priming immunitaire chez *A. vulgare* face à d'autres pathogènes, tels que des bactéries commensales isolées et injectées à fortes doses, *Listeria ivanovii* ainsi que l'Invertebrate Iridovirus 31 (IIV-31), un virus pathogène naturel des isopodes terrestres.

(4) Explorer la variation du priming immunitaire en fonction des caractéristiques intrinsèques des individus (l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia*) ainsi que, plus généralement, l'interférence entre les symbiotes protecteurs et les pathogènes dans l'expression du priming immunitaire au sein d'un même hôte.

Chaque objectif constituera un chapitre. Les 1er et 2ème chapitres seront appuyés par deux articles scientifiques (dont un publié et l'autre soumis le 28.10.21), auxquels j'apporterai des éléments supplémentaires que je n'ai pu inclure dans ces articles ainsi que des données non publiées. Le 3ème chapitre reposera principalement sur des expériences préliminaires qui demandent à être approfondies dans les prochaines années. Le 4ème chapitre quant à lui porte entièrement sur deux articles scientifiques publiés, dont un article expérimental et un article de synthèse. Pour une raison de clarté, les articles scientifiques sous leur forme publiée seront présentés en annexes, excepté l'article de synthèse. Chaque chapitre sera organisé en une remise en contexte, les résultats obtenus et une discussion détaillée suivie d'une conclusion. En dernière partie sera présentée une synthèse générale, contenant les grandes conclusions que nous pouvons tirer de ces travaux de recherche, plusieurs perspectives à court, moyen et long terme et l'apport général de cette thèse en recherche scientifique.

Plusieurs documents seront inclus après les annexes : (1) mon curriculum vitae, incluant mes précédents stages de recherche, mes formations, les deux services annuels d'enseignement que j'ai effectué ainsi que la liste des présentations orales et des posters que j'ai présenté en congrès durant mon doctorat, avec leurs liens hypertextes dans le cas échéant. (3) Un article collaboratif (Ronai et al., 2020) que nous avons publié dans le journal *Microbiome.* Cet article est un Meeting Report du summer-school « Microbiota, Symbiosis and Individuality », organisé par Thomas Pradeu (Directeur de Recherche CNRS UMR 5164) en 2019 dans le cadre du projet « Immunity, DEvelopment and the Microbiota - Understanding the Continuous Construction of Biological Identity ». Ce summer-school avait pour but de rassembler de jeunes biologistes et philosophes des sciences afin de confronter nos idées sur la question de l'individualité biologique en relation avec les communautés bactériennes que les macro-organismes hébergent.

Je terminerai ce manuscrit par un bilan personnel de ce que le doctorat m'a apporté.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

I. L'IMMUNITÉ 1

I.1 – Histoire et concepts fondamentaux 1

I.2 – Le système immunitaire : reconnaître, accepter, résister ou tolérer 5

I.3 – Bases fondamentales du système immunitaire 8

I.4 – L'évolution du système immunitaire 15

I.5 – La « mémoire immunitaire innée » et le bouleversement de la dichotomie immunité innée *vs* immunité adaptative 20

II. LE PRIMING IMMUNITAIRE DES INVERTÉBRÉS 26

II.1 – Racines historiques 26

II.2 – Connaissances actuelles des mécanismes du priming immunitaire 28

II.3 – Le problème sémantique et le grain de sel des symbiotes protecteurs 35

II.4 – Importance de l'étude du priming immunitaire 39

II.5 – Conditions d'évolution du priming immunitaire chez les invertébrés 42

III. LES ISOPODES TERRESTRES, UN MODÈLE APPROPRIÉ POUR L'ÉTUDE DU PRIMING IMMUNITAIRE 45

III.1 – Biologie en accord avec le priming immunitaire 45

III.2 – L'immunité des isopodes terrestres 48

III.3 – La symbiose à *Wolbachia* et son impact sur l'immunité 50

IV. PROJET DE THÈSE 53

CHAPITRE I 55

I. VALIDATION DU PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE *S. ENTERICA* 57

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 57

I.2 – Résultats et discussion 60

I.3 – Conclusion 66

II. COÛT REPRODUCTIF DU PRIMING IMMUNITAIRE AVEC *S. ENTERICA* 67

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 67

II.2 – Résultats et discussion 72

II.3 – Conclusion 80

CHAPITRE II 85

I. MODALITÉS D'EXPRESSION DU PRIMING IMMUNITAIRE CONTRE *S. ENTERICA* 87

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 87

I.2 – Résultats et discussion 90

I.3 – Conclusion 94

II. CARACTÉRISATION DES POPULATIONS D'HÉMOCYTES 95

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 95

II.2 – Résultats et discussion 99

II.3 – Conclusion 108

CHAPITRE III 111

I. RECHERCHE DE PATHOGÈNES NATURELS CHEZ *A. VULGARE* 113

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 113

I.2 – Résultats et discussion 117

I.3 – Conclusion 119

II. LE PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE *L. IVANOVII* 121

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 121

II.2 – Résultats et discussion 122

II.3 – Conclusion 125

III. LE PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE l'IIV-31 ET SON INTERACTION AVEC *WOLBACHIA* 126

III.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 126

III.2 – Résultats et discussion 133

III.3 – Conclusion 139

CHAPITRE IV 141

I. VARIATION DU PRIMING IMMUNITAIRE CONTRE *S. ENTERICA* SELON L'ÂGE, LE SEXE ET LA PRESENCE OU NON DE *WOLBACHIA* 143

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental 143

I.2 – Résultats et discussion 146

I.3 – Conclusion 153

II. POURQUOI ET COMMENT LES SYMBIOTES PROTECTEURS INFLUENCENT LE PRIMING IMMUNITAIRE PATHOGÉNIQUE CHEZ LES INVERTÉBRÉS 157
II.1 – Contexte et objectifs 157
II.2 – Article de synthèse 158
II.3 – Discussion 181
II.4 – Conclusion 185
SYNTHÈSE GÉNÉRALE 188
I. BILAN DES RÉSULTATS PRINCIPAUX 190
II. PERSPECTIVES 195
II.1 - Compléter l'approche phénoménologique 195
II.2 – Quid des mécanismes du priming immunitaire chez *A. vulgare* ? 197
II.3 – Approfondir la valeur sélective du priming immunitaire 199
II. 4 – Et pour l'influence de *Wolbachia* sur le priming immunitaire d'*A. vulgare* ?.. 201
III. APPORT DE LA THÈSE 202
RÉFÉRENCES 206
ANNEXE 1 236
ANNEXE 2 248
ANNEXE 3 239
ANNEXE 4 240
DOCUMENTS SUPPLÉMENTAIRES 298
BILAN PERSONNEL 304

INTRODUCTION GÉNÉRALE

« *Quiconque prétend s'ériger en juge de la vérité et du savoir s'expose à périr sous les éclats de rire des dieux, puisque nous ignorons comment sont réellement les choses et que nous n'en connaissons que la représentation que nous en faisons*. »

- Albert Einstein -



Photo : *Armadillidium vulgare* femelle. Crédit : Cybèle Prigot-Maurice

I. L'IMMUNITÉ

I.1 – Histoire et concepts fondamentaux

Qui parle de « priming immunitaire » parle d'abord d'immunité. Le terme immunité provient du latin « *immunitas* », qui désigne être exempté, dispensé. Etymologiquement, l'immunité se définit comme une protection accordée à certaines personnes face à une condamnation, un devoir, ou une corvée (Moulin, 1983). Alors que l'immunité n'était utilisée que dans un cadre juridique (*immunitis*, pour « exempter de charges »), Van Swieten l'utilise en 1775 pour désigner l'exemption de la variole à l'égard des anciens malades (Moulin, 1983). Parallèlement, Robert Koch démontre que les microbes (observés et étudiés depuis les années 1660 ; Gest, 2004 ; Opal, 2010) sont responsables de différentes maladies infectieuses. Durant cette période, plusieurs scientifiques dont Edward Jenner, découvrent que l'inoculation de la vaccine (*i.e.* la variole de la vache) chez l'Homme réduit de près de 98% la mortalité induite par la variole de l'Homme (Opal, 2010). Mais ce n'est qu'à la fin du 19ème siècle qu'apparaît dans le dictionnaire le terme « immunité » au sens biologique, définissant alors « l'exemption des maladies » (Moulin, 1983). Nous retrouvons des articles stipulant que « l'immunité est cette propriété particulière que possèdent soit certaines espèces animales, soit certains individus, à la suite d'une première attaque, d'être réfractaires à une maladie donnée » (Moulin, 1983). Cette nouvelle facette sémantique se confirme dans les années 1880 avec les travaux de Louis Pasteur sur la vaccination contre le choléra : les individus préalablement inoculés avec une souche de *Vibrio cholerae* atténuée sont « immunisés » face à une infection ultérieure (Moulin, 1983).

Toujours à la fin du 19ème siècle, Elie Metchnikoff observe pour la première fois la phagocytose chez la daphnie (*Daphnia magna*) : certaines cellules sont capables de « dévorer » et détruire des éléments étrangers, notamment bactériens (Metchnikoff, 1884 ; Moulin, 1983 ; Beck & Habicht, 1996). Il propose alors la théorie cellulaire de l'immunité, selon laquelle les cellules phagocytaires seraient le pilier de la défense contre les pathogènes. Cette découverte lui vaudra le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908, qu'il partagera avec Paul Ehrlich pour sa théorie humorale de l'immunité (Moulin, 1983 ; Beck & Habicht, 1996). Paul Ehrlich est le premier à parler de système « clef-serrure » pour illustrer le mécanisme d'antigène-anticorps (*cf.* Introduction, partie I.3), permettant aux cellules immunitaires de reconnaître spécifiquement des molécules microbiennes (antigènes) grâce à leur récepteurs cellulaires membranaires et solubles (anticorps). De nombreux autres biologistes ont agrémenté ces théories (Fig. 2 ; Kaufmann, 2008). Même si les identifications

moléculaires manquaient en raison des limites technologiques, ces théories ont amorcé la compréhension de l'immunité. Bien plus tard, elles seront considérées complémentaires et feront émerger la dichotomie du système immunitaire que nous connaissons actuellement (l'immunité innée *vs* l'immunité acquise), dont je reparlerais un peu plus tard (*cf.* Introduction, partie I.3, I.4, I.5 ; Fig. 2 ; Kaufmann, 2008). C'est ainsi, sous l'aile de la microbiologie et de la biologie cellulaire, qu'ont émergé les prémices de l'immunologie : la science biologique visant à étudier les mécanismes de défense d'un organisme contre des agents pathogènes (*e.g.* virus, bactéries, champignons et parasites eucaryotes).

L'immunologie est un domaine de recherche récent dans l'histoire des Sciences. Elle devient une discipline à proprement parlé vers 1930, mais son institutionnalisation ne se concrétise qu'à partir des années 1960 (Söderqvist & Stillwell, 1999). Les immunologistes se penchent alors sur l'essence même de l'immunité. Franck Macfarlane Burnet propose la théorie de la discrimination du soi et du non-soi, permettant au système immunitaire de n'importe quel organisme d'établir sa propre cohésion : les cellules issues d'un organisme se reconnaissent entre elles (*i.e.* du « soi ») et peuvent discriminer celles qui ne font pas partie de ce même organisme (*i.e.* du « non-soi » ; Burnet, 1969). Il appuie sa théorie par des expériences de transplantations intraspécifiques, démontrant que le système immunitaire des organismes pluricellulaires n'est pas seulement capable de reconnaître et rejeter des éléments étrangers (issus de greffes), mais surtout d'apprendre à les rejeter plus efficacement après plusieurs « invasions » (Medawar, 1944 ; Medawar, 1945).

Les capacités de discrimination et d'apprentissage du système immunitaire ont majoritairement été étudiés, et le sont toujours, au travers des interactions entre les hôtes macroscopiques (considérés comme organismes pluricellulaires dans ce manuscrit) et les organismes microscopiques pathogènes (Moulin, 1983 ; Opal, 2010). Et pour cause, l'étude des micro-organismes a des racines historiques bien plus anciennes (milieu du 15ème siècle) et l'émergence de l'immunologie est principalement liée aux maladies infectieuses dont les études prennent elles-mêmes leur origine dans la microbiologie (Opal, 2010). Les micro-organismes procaryotes (bactéries, archaea, virus) sont les premiers organismes vivants apparus sur terre il y a 3.7 milliards d'années (Staley et al., 1996 ; Woese, 1994) alors que les organismes pluricellulaires (métazoaires) sont apparus il y a 600 millions d'années (Cooper & Alder, 2006). Les micro-organismes sont à la base de tous les processus vivants (en initiant la photosynthèse entre autres) et sont même à l'origine de toute forme de vie eucaryote (Staley et al., 1996 ; Woese, 1994).

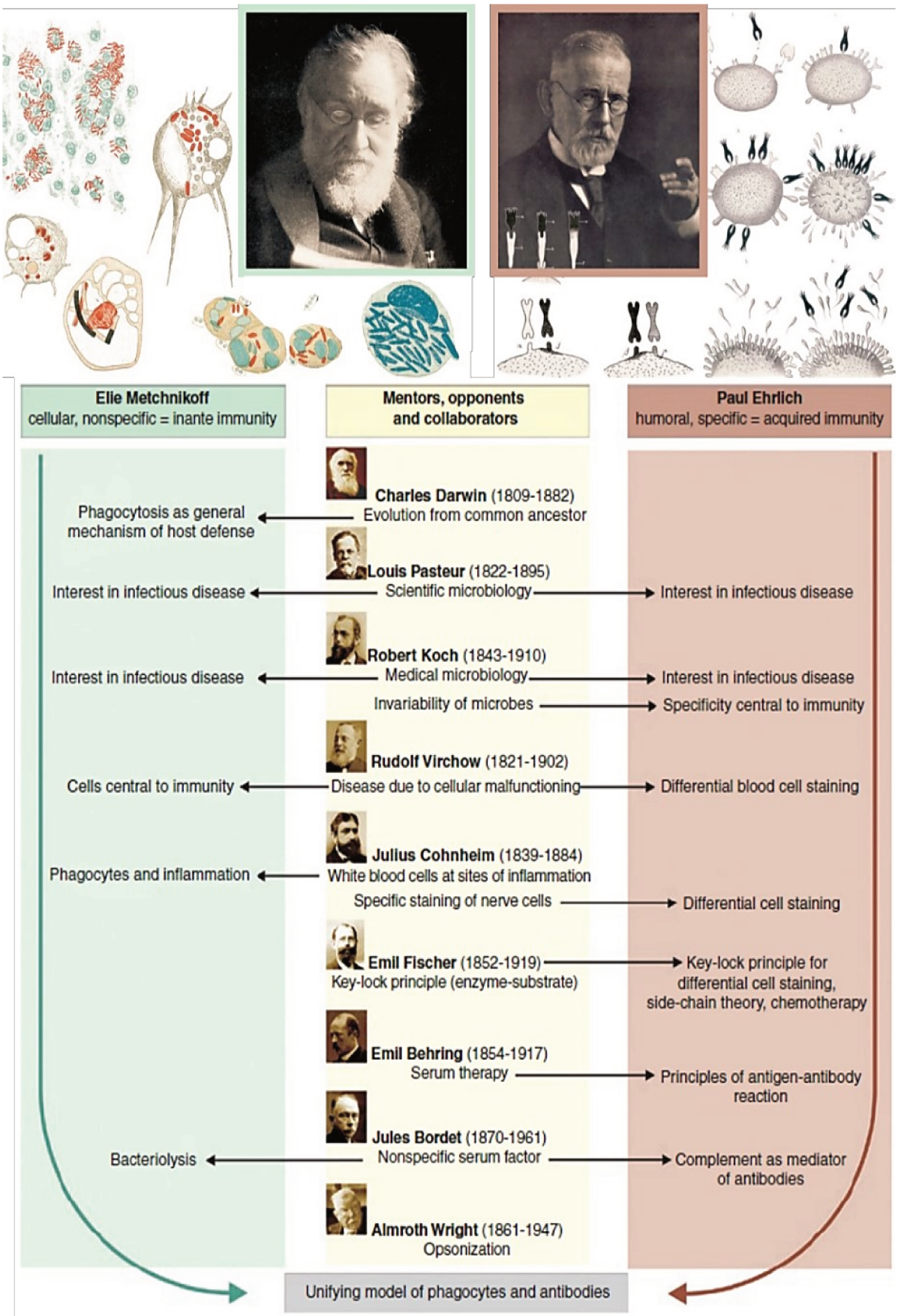


Figure 2. Principaux biologistes ayant amorcé l'immunologie actuelle et leurs travaux respectifs, supportant la théorie cellulaire et/ou la théorie humorale de l'immunité. Photos et schéma tirés de Kaufmann, 2008.

Bien que la diversité microbienne (au sens large) que nous connaissons soit énorme comparée à celle des plantes et animaux, il est estimé que seulement 1% est décrit. Le nombre de micro-organismes au sein des écosystèmes est incalculable : un seul gramme de sol contient entre 10 et 20 millions de bactéries, 500 000 champignons, 50 000 algues unicellulaires et 30 000 protozoaires (*i.e.* eucaryotes unicellulaires), sachant qu'ils sont tout autant retrouvés dans l'air, l'eau, et en association avec les animaux et les plantes (Gross et al., 1995). Les études phylogénétiques portant sur l'ensemble des métazoaires apparues vers les années 1950 montrent que la vision centrée que nous avons sur le monde visible à l'œil nu n'est qu'une infime partie de ce qui existe (Woese, 1994). Tous les organismes pluricellulaires, chez qui l'immunité a été étudiée en premier lieu, vivent en permanence dans un environnement lourdement peuplé de microbes (pathogènes ou non) et ce, depuis leur propre émergence (Woese, 1994 ; Staley et al., 1996 ; Sompayrac, 2019).

Étudier l'immunité revient donc à déterminer comment les organismes hôtes maintiennent leur intégrité en interaction permanente avec les micro-organismes et évoluent en ce sens. L'intégrité définit « l'état d'une chose qui demeure intacte ». Cette chose, qui est ici un organisme, devient conceptuellement une unité (Pradeu, 2010). Des réflexions philosophiques ont alors émergé de cette déduction : si une unité du vivant se maintient intacte grâce à son système immunitaire, il peut donc être perçu comme l'acteur principal définissant un individu (Pradeu, 2010). Du fait de sa capacité de discrimination du soi et du non-soi, le système immunitaire aurait ainsi été un prérequis au développement des organismes multicellulaires, à leur reproduction sexuée (en termes de compatibilité sexuelle), et donc à la pérennité des espèces et à leur spéciation (Danilova, 2006 ; Dzik, 2010). Mais comme disait Burnet : « le temps est venu d'insister sur l'importance du 'soi' et du 'non-soi' pour l'immunologie et de rechercher la manière dont la reconnaissance de la différence peut se faire » (Burnet, 1969). Au cours des deux derniers siècles, l'essor des technologies permettant d'étudier les éléments microscopiques, la biologie moléculaire et la génétique ont considérablement élargi la compréhension des mécanismes immunitaires et leur évolution.

I.2 – Le système immunitaire : reconnaître, accepter, résister ou tolérer

Au même titre qu'aucun organisme n'est isolé de micro-organismes, aucun organisme n'est dépourvu d'immunité. Les capacités immunitaires sont aussi vieilles que l'apparition des organismes eux-mêmes (Beck & Habicht, 1996 ; Danilova, 2006). Le système immunitaire est présent chez tous les êtres vivants, incluant les animaux, les plantes, les unicellulaires eucaryotes et les bactéries (Buchmann, 2014). Par définition, « le système immunitaire est l'ensemble des organes, tissus, cellules et molécules assurant l'immunité d'un organisme » (Encyclopédie Larousse, 2021). Il surveille et contrôle en permanence, à tout endroit du corps, la présence d'éléments du « non-soi » (*i.e.* élément étranger ou exogène) qui pourrait déstabiliser l'homéostasie de l'organisme en question (*cf.* Introduction, partie I.3 ; Chaplin, 2010). Pour maintenir la cohésion du soi à l'échelle de l'individu, le système immunitaire ignore ou reconnaît activement ses propres composants. Sa caractéristique première est de détecter des marqueurs moléculaires, indiquant la nature de l'élément rencontré. Ces marqueurs sont soit (1) du soi « normal », (2) du soi « anormal » ou bien (3) du non-soi (Medzhitov & Janeway, 2002).

Toutes les cellules d'un hôte ont à leur surface des molécules spécifiques du soi, encodées de manière innée dans le génome de l'hôte. Ces molécules se lient à des récepteurs membranaires dit « inhibiteurs » des cellules immunitaires, qui répriment les réponses immunitaires qui pourraient être mises en œuvre contre l'hôte lui-même (Medzhitov & Janeway, 2002). Nous parlons alors d'allo reconnaissance ou d'histocompatibilité. Certaines molécules du soi, comme l'acide sialique présent dans certaines glycoprotéines par exemple, inhibent les protéines immunitaires circulantes qui normalement lysent les cellules auxquelles elles se fixent (Austen & Fearon, 1979). La reconnaissance du soi s'établit également à l'échelle intracellulaire : le niveau de méthylation de l'ADN hôte est souvent bien plus élevé que celui de l'ADN microbien (bactérien ou viral), l'indiquant ainsi comme un élément du soi ; autant pour les organismes pluricellulaires (Vertébrés, invertébrés) que certaines bactéries (Danilova, 2006). Pour citer Medzhitov et Janeway (2002), les molécules du soi sont comme des « mots de passe moléculaires », permettant de conserver les propres composants de l'hôte.

Ces molécules du soi sont encodées dans le génome de l'hôte. Elles ne peuvent donc être produites par des éléments étrangers. La diminution de la quantité ou l'absence de ces molécules du soi indique au système immunitaire que l'élément rencontré est un élément du

soi « anormal » ou bien du « non-soi » (Medzhitov & Janeway, 2002). Le soi « anormal » correspond généralement à une cellule sénescente, endommagée, infectée ou cancéreuse qui présente moins de molécules du soi à sa surface *via* un changement de composition membranaire (Danilova, 2006). Chez la souris par exemple, les cellules sanguines ayant une sous-production du récepteur du soi CD47 sont rapidement phagocytées et éliminées de la circulation générale par les cellules immunitaires (Oldenborg et al., 2000). La détection du soi « anormal » est une capacité essentielle, qui permet à l'organisme de nettoyer les débris cellulaires et assurer son renouvellement. La détection d'un élément du non-soi se fait alors par l'absence de marqueurs du soi, mais surtout par la détection d'autres marqueurs moléculaires propres aux micro-organismes, ce qui déclenche une réponse immunitaire contre l'élément considéré comme étranger (*cf*. Introduction, partie I.3).

Avant de développer les bases fondamentales d'une réponse immunitaire, il est important de préciser que le système immunitaire ne va pas exclusivement lutter et éliminer le « non-soi ». Puisque les micro-organismes ont initialement été associés aux maladies, le système immunitaire a longtemps été perçu comme un strict défenseur (Janeway, 1989 ; Read et al., 2008). À la fin du 17ème siècle, plusieurs biologistes se sont aperçus que les organismes hôtes sont en interactions durables avec des micro-organismes sans qu'aucun dommage ne soit causé aux partenaires, un phénomène nommé symbiose (De Bary, 1879 ; Frank, 1877). La symbiose se définit comme un continuum d'interaction incluant aussi bien des associations bénéfiques (réciproques ou non) entre un hôte et les micro-organismes qu'il héberge (*i.e.* symbioses bénéfiques, mutualistes ou commensales) que des interactions non-réciproques et nocives pour l'hôte en interaction avec des microbes pathogènes (*i.e.* symbioses parasitaires ; Bourtzis & Miller, 2003 ; Brown et al., 2012 ; Sachs et al., 2011). L'observation de telles interactions durables a révolutionné la compréhension de l'immunité, puisqu'elles démontrent que les organismes hôtes sont capables d'héberger un nombre considérable de micro-organismes non pathogènes, bien plus nombreux que leurs propres cellules (Casadevall & Pirofski, 2000 ; Ciancio, 2016). Le système immunitaire est donc aussi capable de tolérer la présence de micro-organismes, sans nécessairement les éliminer (Ayres & Schneider, 2012 ; Eguileor & Ottaviani, 2011 ; Nyholm & Graf, 2012).

Le système immunitaire repose sur deux grandes stratégies d'action : la résistance et la tolérance. La résistance consiste à éliminer et réduire la quantité d'éléments étrangers. La tolérance, quant à elle, réduit l'impact des infections et les dommages qui en découlent en tolérant la présence de micro-organismes (Ayres & Schneider, 2012 ; Moreno-García et al., 2014). Comme disaient Read et al. (2008), les mécanismes de résistance sont sûrement mieux

décrits car ils sont plus facilement observables, mais la tolérance est tout autant exprimée et apporte des capacités intrinsèques complémentaires. Les principes de « résistance » et de « tolérance » sont primordiaux dans la compréhension du système immunitaire (Read et al., 2008). L'hôte répond de manière appropriée à la gravité de l'intrusion qu'il subit, en discriminant le « dangereux » du « non dangereux » (Matzinger, 2002, 2007; Nicholson, 2016) ; *cf*. Introduction, partie I.3). Par exemple, les effets délétères des pathogènes stimulent des réponses inflammatoires chez l'hôte sous forme de signaux libérés par les cellules altérées (*e.g.* les Damage Associated Molecular Patterns, DAMPs). Selon un certain seuil, la quantité de signaux inflammatoires déclenche une stratégie de résistance ou de tolérance (Nyholm & Graf, 2012 ; Moreno-Garcia et al., 2014 ; Ayres & Schneider, 2012).

La tolérance du système immunitaire a probablement été sélectionnée au cours de l'évolution pour plusieurs raisons. D'une part, les hôtes sont en contact permanent avec des micro-organismes, dont la plupart ne sont pas pathogènes (Bourtzis & Miller, 2003). Sachant que la mise en place d'une réponse immunitaire demande une certaine énergie pour produire les effecteurs immunitaires, résister systématiquement à tout élément étranger serait trop coûteux en termes d'énergie (Ayres & Schneider, 2012). L'énergie d'un individu à un instant donné est limitée, donc l'utilisation de cette énergie dans la réponse immunitaire réduit celle dédiée à la reproduction ou la croissance par exemple (Ayres & Schneider, 2012). De plus, les réponses immunitaires n'exemptent pas l'individu de dommages collatéraux. Chaque réponse immunitaire est associée à la perte de cellules immunitaires mais aussi à des effets cytotoxiques envers les propres cellules de l'hôte (McCarville & Ayres, 2018 ; Schneider & Ayres, 2008 ; Seal et al., 2021). La résistance peut donc entraîner des conséquences plus néfastes sur les traits d'histoire de vie des individus (*e.g.* sur la fécondité, la croissance, la durée de vie, etc) que de tolérer une infection latente (Read et al. 2008). D'autre part, la présence de certains microbes au sein de l'hôte est bénéfique (parfois même obligatoire) pour l'organisme qui les héberge. Étant donné les bénéfices qu'ils apportent (*e.g.* nutritionnels, reproductifs ou même protecteurs contre des pathogènes), certains mécanismes de tolérance immunitaire vis-à-vis de ces microbes sont activement sélectionnés chez les hôtes. La tolérance du système immunitaire est soit active, soit passive : dans le premier cas, le système immunitaire reconnaît les éléments étrangers mais limite les réponses immunitaires ; dans le deuxième cas, il ne les reconnaît pas, grâce à une compartimentalisation des microbes au sein de l'hôte ou bien en limitant les récepteurs des marqueurs du non-soi à certains endroits (Ayres & Schneider, 2012). C'est notamment le cas lors de symbioses mutualistes issues de

longues coévolutions entre l'hôte et les microbes, un sujet dont je reparlerai plus tard lorsque j'aborderai le priming immunitaire (*cf*. Introduction, partie III ; Chapitre IV, partie II).

Quoi qu'il en soit, la plupart des éléments étrangers qui entrent en contact avec un organisme hôte sont reconnus par le système immunitaire. Selon la nature de ces éléments, des stratégies de tolérance et/ou de résistance sont initiées.

Dans la partie suivante, je présenterai la base du fonctionnement de la réponse immunitaire contre des pathogènes, en me focalisant sur les tendances générales des organismes eucaryotes pluricellulaires (invertébrés ou Vertébrés). J'évoquerai brièvement celle des bactéries au sein de la partie plus évolutive (*cf*. Introduction, partie I.4).

I.3 – Bases fondamentales du système immunitaire

La première ligne de « défense » du système immunitaire est l'immunité « innée ». Elle est présente chez tous les organismes vivants, se déclenche rapidement, à tout moment et dans toutes les parties du corps (Danilova, 2006). En conditions naturelles, les premiers contacts entre un élément étranger et l'organisme se produisent généralement au niveau des cellules épithéliales (*e.g.* cuticulaires/cutanées, digestives ou respiratoires), qui constituent une première barrière immunitaire dite « physique » (Chaplin, 2010 ; Bosch et al., 2009), même si de nombreux microbes sont naturellement présents au-delà de cette barrière. Il existe une multitude de types de cellules immunitaires chez les animaux. Ces cellules sont produites par des organes spécifiques (corps gras, organes hématopoïétiques et organes lymphoïdes chez les invertébrés ; organes lymphoïdes et moelle osseuse chez les Vertébrés) au sein desquels elles prolifèrent et se différencient à partir de cellules souches (Janeway, 2001 ; Müller et al., 2008 ; Rusaini & Owens, 2010 ; Smith, 2016).

Ces cellules détectent la présence d'éléments étrangers de manière extracellulaire ou intracellulaire, grâce à des récepteurs dit « germ-line encoded », c'est à dire génétiquement codés de manière innée depuis les cellules germinales à la base du développement (Medzhitov & Janeway 2002 ; Müller et al., 2008). Ces récepteurs, nommés PRRs (pour Pattern Recognition Receptors), sont surtout présents à la surface ou à l'intérieur des cellules immunitaires mais peuvent aussi être des protéines circulantes (Medzhitov & Janeway, 2002 ; (Feldhaar & Gross, 2009). Ils ont la particularité de reconnaître des éléments microbiens structuraux provenant de divers micro-organismes : les MAMPs (pour Microbial Associated Molecular Patterns). Pour les bactéries, ces « patterns » sont généralement des molécules

membranaires, qui, sous de fortes pressions de sélection, ne sont que très peu sujettes à des modifications au cours de l'évolution (Mackey & McFall, 2006). Ce sont par exemple les LPS (pour LipoPolySaccharides) des bactéries à gram (-), les PGN (pour PeptidoGlycaNes) des bactéries à gram (+) ou encore les flagellines, molécules constituant les flagelles (Akira et al., 2006). Les MAMPs peuvent aussi être des composés fongiques, des toxines microbiennes ou encore du matériel génétique peu méthylé de virus (Akira et al., 2006 ; Danilova, 2006). Les PRRs peuvent détecter spécifiquement les mêmes types de MAMPs rencontrés ou bien répondre à différents types de microbes (Akira et al., 2006 ; Kawasaki & Kawai, 2014). Au sein des TLR (pour Toll-Like Receptors ; une sous-catégorie de PRRs) par exemple, TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des LPS, TLR5 est plutôt spécialisé pour les flagellines, tandis que TLR2 reconnaît à la fois les PNG et les lipoprotéines (Bonizzi & Karin, 2004 ; Kawasaki & Kawai, 2014).

La liaison d'un MAMP à un PRR déclenche deux processus intimement liés : une réaction immunitaire puis une réponse immunitaire. La réaction immunitaire consiste en l'activation de cascades de signalisation à l'intérieur des cellules. Il existe une multitude de cascades de signalisation (Cui et al., 2014). Chacune d'entre elles est sollicitée différemment selon le microbe rencontré, ce qui active (ou inhibe) divers gènes de l'immunité dans le noyau cellulaire (Chaplin, 2010). Parmi toutes les cascades de signalisation, les mieux décrites sont sûrement les voies Toll et IMD, retrouvées aussi bien chez les invertébrés que chez les Vertébrés (*cf*. Introduction, partie I.4 ; Buchon et al., 2014 ; Feldhaar & Gross, 2008 ; Huang & Ren, 2020 ; Sheehan et al., 2018). Toll et IMD sont principalement activées par des bactéries à gram (+) ou gram (-), respectivement. L'activation de ces voies induit le recrutement de divers enzymes et protéines, qui, à leur tour, déclenchent la production d'effecteurs immunitaires tels que certains peptides antimicrobiens ou encore des médiateurs inflammatoires (Shehaan et al., 2018). Cette production d'effecteurs immunitaires ou bien la mise en place de capacités immunitaires (*e.g.* phagocytose) constituent ce que nous appellons la réponse immunitaire. En d'autres termes, l'activation d'une voie de signalisation (*i.e.* la réaction immunitaire) déclenche des réponses immunitaires. Les réponses immunitaires sont principalement portées par les cellules de l'immunité. Deux grandes catégories de réponses immunitaires sont décrites dans la littérature : la réponse cellulaire et la réponse humorale (Fig. 3, page suivante).

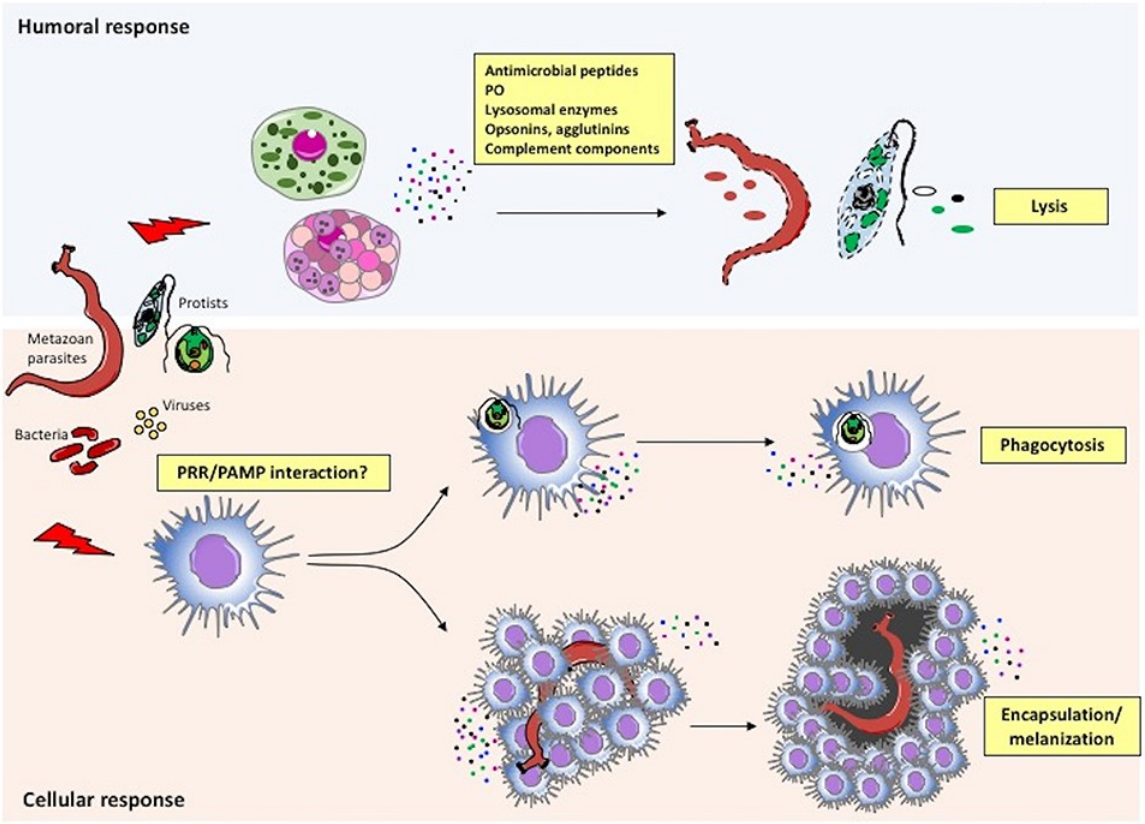


Figure 3. Schéma simplifié de la réponse immunitaire cellulaire et humorale chez les invertébrés. Schéma tiré de Mellilo et al., 2018.

La réponse cellulaire concerne les activités propres qu'effectuent les cellules immunitaires. L'activité cellulaire majeure est la phagocytose (Buchmann, 2014). Elle consiste à développer une extension cellulaire afin d'engloutir un élément étranger et le digérer au sein d'un phagosome (Danivola, 2006 ; Buchmann, 2014 ; Müller et al., 2008). Cette digestion se réalise grâce à un pH acide, des enzymes et des composés cytotoxiques, tel que les ROS (pour Reactive Oxygen Species) ou les RNI (pour Reactive Nitrogen Intermediate ; Danilova, 2006 ; Bogdan, 2001). La phagocytose est effectuée par les eucaryotes unicellulaires comme les amibes, mais aussi par les cellules immunitaires des Vertébrés, apparus plus tardivement au cours de l'évolution. Elle serait à l'origine un processus de nutrition, ayant fait émerger certaines symbioses obligatoires, comme celles des cellules eucaryotes avec les mitochondries et les chloroplastes (Danilova, 2006). De nombreux types cellulaires sont capables de phagocyter, comme les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques des Vertébrés ainsi que certains types d'hémocytes (amoebocytes, coelocytes, hyalinocytes) chez les invertébrés (Danilova, 2006 ; Akira et al., 2006).

Parfois, la phagocytose ne suffit pas à éliminer un pathogène, surtout si son mode de réplication est intracellulaire. La mort cellulaire programmée (*i.e.* apoptose) peut alors être considérée comme une réponse immunitaire cellulaire (Chaplin, 2010 ; Smith, 2010). Les cellules infectées, en tant que potentielles sources de contamination interne, entrent en apoptose, deviennent du soi « anormal » et sont phagocytées par des cellules immunitaires saines (Li et al., 2004). Les cellules immunitaires sont aussi capables de s'agglutiner autour d'un foyer d'infection pour former une capsule cellulaire, appelée encapsulation/nodulation chez les invertébrés ou granulome chez les Vertébrés (Müller et al., 2008 ; Dubovskiy et al., 2016 ; Pagán & Ramakrishnan, 2018). Cette réponse cellulaire se produit lorsque l'élément étranger est de taille trop importante pour être phagocyté (Müller et al., 2008). Les cellules immunitaires adhèrent les unes aux autres grâce à des communications moléculaires *via* des glycoprotéines de type cytokine, puis elles libèrent des composés toxiques (*e.g.* opsonines, C-lectine ; Müller et al., 2008 ; Brown et al., 2018) qui recouvrent la surface des éléments étrangers. Ces molécules aident à dégrader les éléments étrangers plus rapidement et empêchent les pathogènes intracellulaires de pénétrer à l'intérieur des cellules (Müller et al., 2008). Nous parlons alors d'opsonisation (*i.e.* les molécules toxiques tapissent la surface des pathogènes), un processus qui relève à la fois de la réponse cellulaire mais aussi de la réponse dite « humorale » (Müller et al., 2008).

La réponse humorale consiste en la production de composés/molécules antimicrobiens par les cellules immunitaires (Fig. 3). À partir de précurseurs intracellulaires, ces composés sont produits et/ou et stockés dans des granules, puis libérés dans le milieu extracellulaire. Nous retrouvons notamment les ROS et les RNI (Dzik, 2010). Ces molécules cytotoxiques sont issues de l'activité d'enzymes antimicrobiennes, communément regroupées dans la catégorie des NOX (pour Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) OXidase ; (Nauseef, 2008). D'autres enzymes participent à la réponse immunitaire, comme celles de la voie du complément chez les Vertébrés ou encore la phénoloxydase chez les invertébrés (Danilova, 2006). La voie du complément consiste en la production de protéines (*e.g.* C3) qui, une fois clivée par une enzyme (*e.g.* C3 convertase), s'agglutinent autour de membranes cellulaires afin de les lyser *via* la formation de pores (Danilova, 2006). La phénoloxydase, quant à elle, produit des pigments cytotoxiques de type quinone ayant le même rôle immunitaire (Dzik, 2010). Typiquement produite par les hémocytes des invertébrés, les produits de la phénoloxydase sont aussi impliqués dans la mélanisation de la cuticule, ou la réparation des tissus endommagés (Cerenius & Söderhäll, 2004; Nappi & Christensen, 2005). La réponse humorale concerne aussi la coagulation et la

cicatrisation. Cependant, les composés les plus connus de la réponse humorale sont les peptides antimicrobiens dont plus de 900 types sont décrits (Dzik, 2010 ; Danilova, 2006 ; Bulet et al., 2004). Les peptides antimicrobiens sont aussi bien produits par des organismes eucaryotes que procaryotes (Bulet et al., 2004). En tant qu'antibiotiques naturels, ils jouent un rôle clef dans les relations symbiotiques (mutualiste ou parasitaires) entre les hôtes et les micro-organismes, mais aussi entre les micro-organismes au sein d'un même hôte (Bruno et al., 2019 ; Bulet et al., 2004). Grâce à leur conformation moléculaire, certains peptides antimicrobiens altèrent les membranes cellulaires des micro-organismes cibles en créant des pores (Bruno et al., 2019 ; Bulet et al., 2004). D'autres recouvrent la surface de la cellule cible et altèrent la bicouche lipidique de leur membrane (Brogden, 2005; Danilova, 2006 ; Bulet et al., 2004). Les peptides antimicrobiens peuvent avoir un large spectre d'actions contre divers micro-organismes, ou agir plus spécifiquement contre un type de micro-organisme en particulier (Bruno et al., 2019 ; Müller et al., 2008 ; Bulet et al., 2004).

Les réponses immunitaires citées précédemment sont majoritairement dressées contre les bactéries, les eucaryotes microscopiques et les champignons pathogènes. Pour lutter contre des virus, les Vertébrés et les invertébrés disposent d'un mécanisme immunitaire similaire : le système d'ARN interférence (RNAi ; Meister & Tuschl, 2004; Danilova, 2006 ; Schuster, et al., 2019). Brièvement, lorsque du matériel génétique est détecté par les cellules immunitaires, il est clivé par une protéine antivirale (Dicer-2), sous forme de petits fragments appelés siRNA (pour small interfering RNA) ou miRNA (pour micro-RNA). Ces fragments sont ensuite intégrés dans des complexes protéiques, puis, grâce à leurs séquences nucléotidiques complémentaires de celles de l'ARN viral, ils inhibent l'expression des gènes et/ou détruisent directement l'ARN viral par clivage (Meister & Tuschl, 2004 ; Danilova, 2006 ; Beckage, 2008 ; Schuster et al., 2019).

Les cellules de l'immunité sont en communication permanente avec leur semblable. La détection d'éléments étrangers *via* l'immunité innée libère des protéines « alertes », permettant de recruter des effecteurs supplémentaires au niveau du site d'infection (Chaplin, 2010 ; Danilova, 2006). Nous parlons plus généralement de médiateurs inflammatoires. Ce sont par exemple les cytokines, les chémokines, mais aussi les DAMPs, qui eux sont libérés lors de dommages cellulaires ou l'apoptose (Bonizzi & Karin, 2004 ; Buchmann, 2014). Les cellules de l'immunité innée (les macrophages entre autres) vont également porter, à leur surface, les MAMPs des éléments étrangers qu'elles ont rencontrés, faisant office de signal. Chez les Vertébrés à mâchoire, l'ensemble de ces signaux active l'immunité dite « adaptative » (Beck & Habicht, 1996 ; Chaplin, 2010).

L'immunité adaptative (au sens mécanistique du terme) est exprimée par des cellules spécialisées, les lymphocytes B et T (Bonilla & Oettgen, 2010). Ces cellules ont des voies de signalisation activant des gènes immunitaires particuliers. En effet, ces gènes se réarrangent somatiquement, grâce à des recombinaisons génétiques, pour produire des milliards de récepteurs différents. Ces récepteurs peuvent être membranaires (les BCR des lymphocytes B, les TCR des lymphocytes T), ou solubles (*i.e.* les anticorps ou immunoglobulines des lymphocytes B ; Chaplin, 2010 ; Bonnilla & Oettgen, 2010). Au départ produits aléatoirement, ces récepteurs se lient spécifiquement à des antigènes, des molécules protéiques du non-soi tels que les MAMPs des pathogènes par exemple. C'est le système « clef-serrure » dont parlait Ehrlich (*cf.* Introduction, partie I.1). Grâce à la multitude d'isoformes d'anticorps produits, l'immunité adaptative permet de discriminer non seulement différents types de microbes (*e.g.* bactéries à gram (+) ou gram (-)), mais aussi des souches différentes d'un même microbe (Bonnilla & Oettgen, 2010). Ces cellules sont capables de réponses immunitaires cellulaire et humorale.

La caractéristique la plus importante de l'immunité adaptative est que l'information d'une précédente liaison à un antigène est conservée à long terme (parfois plusieurs années), sous forme d'un stock de cellules phénotypiquement différenciées dans les ganglions immunitaires (Fig. 4 ; Chaplin, 2010). Ce stock se forme par la sélection clonale des lymphocytes, qui prolifèrent avec le même anticorps à leur surface (Sompayrac, 2019). Lors d'une seconde exposition, les cellules latentes sont recrutées pour l'élément étranger auquel elles sont dédiées. C'est ce que nous appelons la « mémoire immunitaire » (Fig. 4). Pour faire simple, les lymphocytes B vont directement reconnaître les antigènes par leurs recepteurs membranaires, tandis que les lymphocytes T s'activent après la reconnaissance d'antigènes portés à la surface de cellules présentatrices d'antigènes (Chaplin, 2010 ; Sompayrac, 2019 ; Fig. 4). Puisque la mémoire immunitaire dépend des précédentes rencontres avec des micro-organismes, elle est propre à chaque individu. Bien que ce processus soit plus long à se mettre en place comparé à une réponse immunitaire innée, il est plus efficace et surtout spécifique. C'est-à-dire que la réponse immunitaire sera exclusivement adressée contre le même pathogène reconnu lors la première infection (Brehélin & Roch, 2008), pour mieux résister ou tolérer l'infection (Akira et al., 2006). La mémoire immunitaire a suscité beaucoup de préoccupations durant les dernières décennies, puisqu'elle est le mécanisme principal sur lequel repose la vaccination (Clem, 2011). Sa découverte a amorcé celle de l'immunité (*cf.* Introduction, partie I.1) et son exploitation a permis d'améliorer drastiquement la santé publique *via* l'immunisation contre de nombreux pathogènes humains (Bloom, 2011).

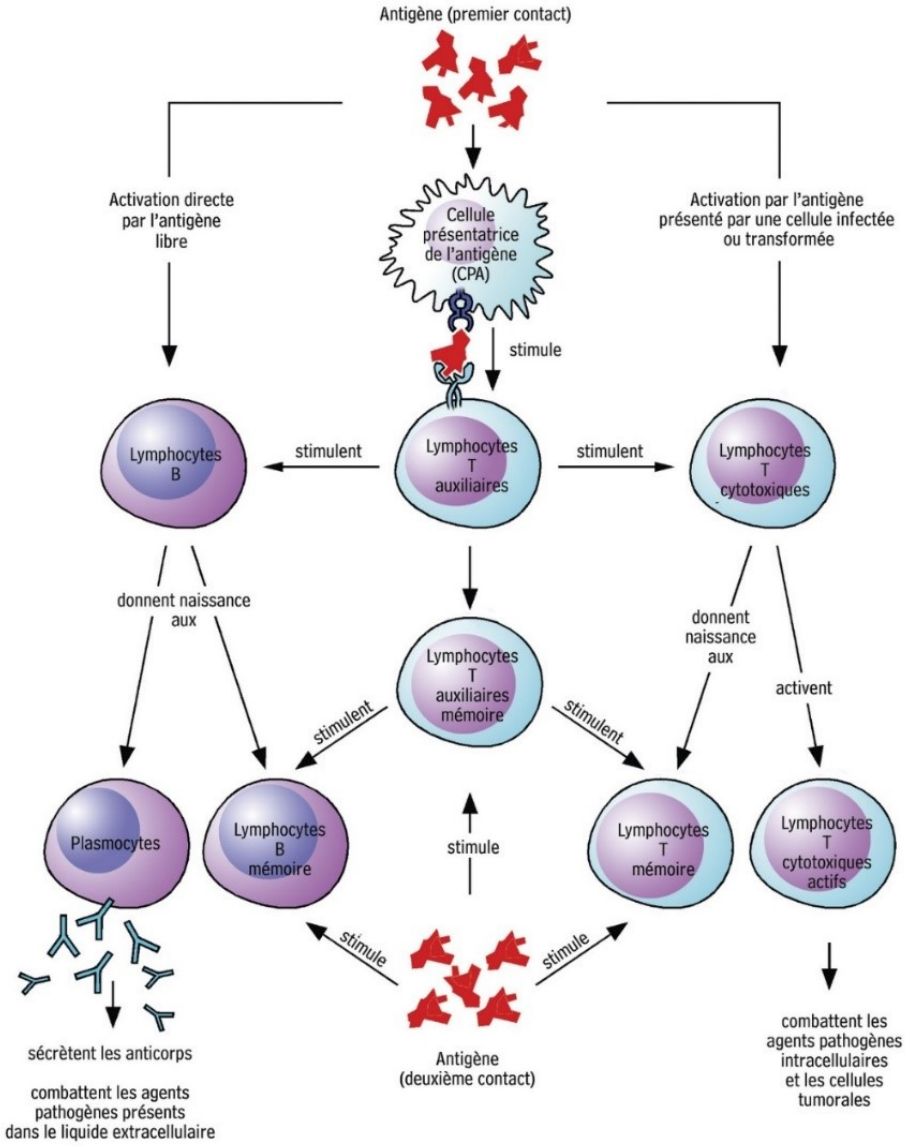


Figure 4. Schéma simplifié de la réponse immunitaire adaptative des Vertébrés à mâchoires, reposant sur l'activation et la prolifération de lymphocytes B et T. Schéma tiré de L'italien et al. (2008) dans Immunohématologie, page 40.

Lorsqu'une infection/invasion est maîtrisée, que ce soit par l'immunité innée et/ou adaptative, les molécules immunostimulantes des éléments étrangers sont de moins en moins nombreux et les médiateurs inflammatoires de moins en moins produits, ce qui réduit progressivement les réponses immunitaires (Marrack et al., 2010). Ces dernières sont plus ou moins durables selon la gravité de l'infection et dépendent du type de lutte (résistance ou tolérance). Néanmoins, compte tenu de la présence permanente d'antigènes du non-soi au sein des organismes hôtes, nous estimons que les réactions immunitaires (*i.e.* l'activation ou l'inhibition des voies signalétiques) fonctionnent en permanence (Pradeu, 2007).

Jusqu'à lors, j'ai parlé de système immunitaire et de réponse immunitaire au singulier. Cependant, le système immunitaire doit plutôt être perçu comme un réseau multifactoriel regroupant un ensemble de réponses immunitaires qui s'effectuent parfois au même moment mais à différents endroits, et vice-versa (Danilova, 2006 ; Cooper & Alder, 2006). Les réponses cellulaires et humorales sont intimement liées et agissent simultanément, au même titre que l'immunité innée et l'immunité adaptative sont indissociables, bien qu'elles aient longtemps été décrites séparément (Chaplin, 2010 ; Elrod-Erickson et al., 2000 ; Medzhitov & Janeway, 1997) ; *cf*. Introduction, partie I.3, I.4). Grâce à la détermination des mécanismes immunitaires au cours du siècle dernier, les recherches en immunologie ont pris des perspectives évolutionnistes. Pour citer Beck et Habicht (1996), « une question centrale en immunologie comparative est : combien de ces caractéristiques – ou des caractéristiques similaires – apparaissent dans d'autres groupes d'organismes plus anciens ? »

I.4 – L'évolution du système immunitaire

Le système immunitaire est conceptuellement divisé en deux grandes catégories : (1) l'immunité innée, qui est non spécifique, non-clonale, donc sans « mémoire » et codée génétiquement depuis la lignée germinale et (2) l'immunité adaptative, qui est induite et repose sur la sélection clonale des lymphocytes ayant une très haute spécificité, avec un effet mémoire de l'antigène précédemment rencontré, permettant des réponses anticipatoires (Cooper, 2012). Cette dichotomie du système immunitaire prend ses racines à partir des théories cellulaires et humorale de l'immunité (*cf*. Introduction, partie I.1), mais surtout d'après les mécanismes selon lesquels l'immunité innée et l'immunité adaptative reposent (*cf*. Introduction, partie I.3).

L'immunité innée est présente chez tous les êtres vivants. Pour preuve, les organismes procaryotes produisent des peptides antimicrobiens (Danilova, 2006) et luttent contre l'intrusion de bactériophages ou de virus grâce à un système similaire à l'ARN interférence (CRISPR, pour Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats) ou l'apoptose (Danilova 2006 ; Grissa et al., 2007 ; Barrangou et al., 2007 ; Marraffini & Sontheimer, 2010). Aussi, la phagocytose est accomplie aussi bien par les eucaryotes unicellulaires, que les métazoaires invertébrés (tuniciers, vers, éponges, crustacés, insectes), les poissons, amphibiens, reptiles et mammifères (Danilova, 2006). Vous l'aurez ainsi compris : hormis les lymphocytes et leur système de recombinaison somatique, tous les composants

immunitaires des Vertébrés ont leurs homologues chez les invertébrés (Müller et al., 2008). L'immunité adaptative telle que je l'ai décrite n'est observée que chez les Vertébrés à mâchoire, c'est-à-dire pas plus d'1% des espèces animales (Sompayrac et al., 2019 ; Danilova, 2006). Ce système de défense ne représente donc qu'une fraction des mécanismes immunitaires connus et ne peut fonctionner sans immunité innée : il n'y a pas de spécificité d'antigène sans que les cellules de l'immunité innée (macrophages, monocytes etc…) donnent d'instructions à l'immunité adaptative (Kauffman, 2008).

Deux questions centrales se posent alors dans les recherches fondamentales en immunologie : comment et pourquoi les Vertébrés à mâchoire ont-ils développé cette immunité adaptative ? L'immunité adaptative est apparue il y a 500 millions d'années, une période associée au « big bang immunologique » (*i.e.* l'initiation du réarrangement des gènes qui ont permis le développement de l'immunité adaptative ; Flajnik, 2014 ; Fig. 5). Cette apparition est relativement récente sur l'échelle évolutive, puisque l'immunité innée est aussi vieille que la pluricellularité, soit plusieurs milliards d'années. Pour savoir comment l'immunité adaptative a émergé, les immunologistes ont comparé l'immunité entre les espèces (Cooper, 2012).

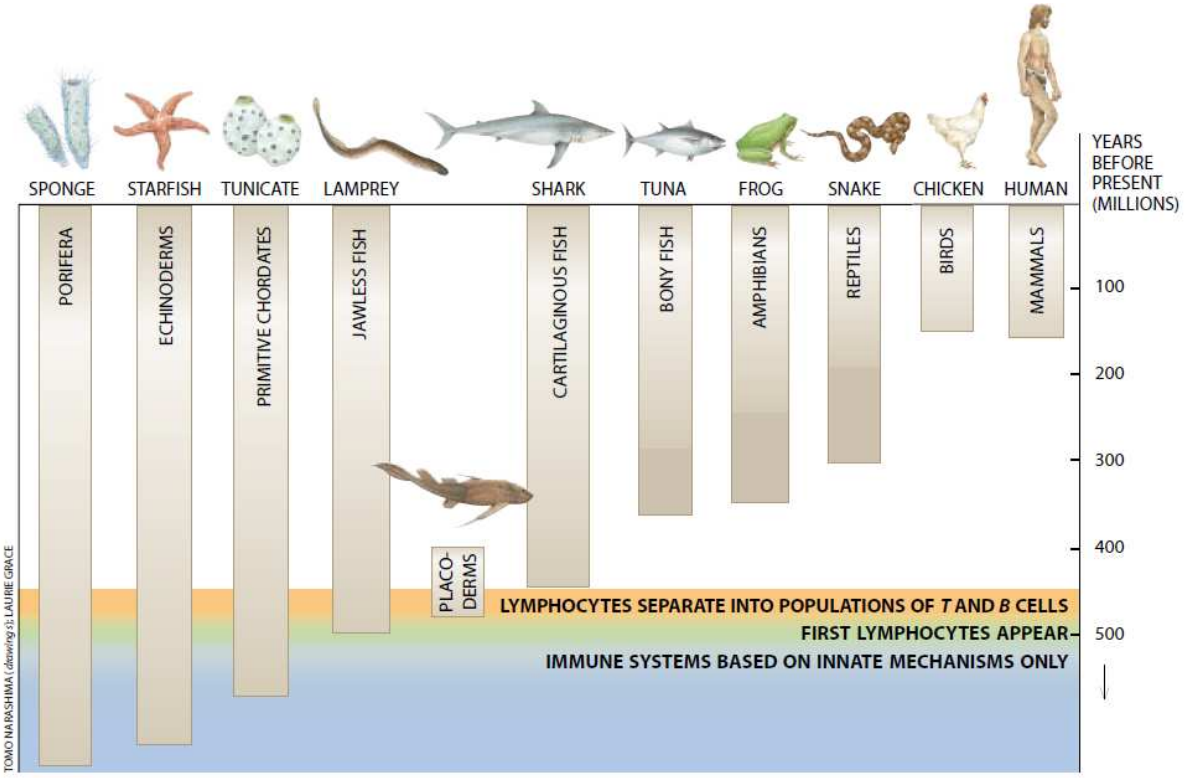


Figure 5. Schéma simplifié de la répartition de l'immunité innée et adaptative au sein des grands groupes d'animaux. Schéma tiré de Beck & Habicht, 1996.

Chez les organismes apparus avant les Vertébrés, des éléments clefs permettant la différenciation des deux systèmes immunitaires ont été découverts. Dans les années 1990, Jules Hoffman et son équipe découvrent, chez la drosophile, un récepteur de l'immunité innée appelé « Toll ». Ils décryptent alors la voie de signalisation associée et démontrent quelques années plus tard que les Vertébrés utilisent ce même système pour leurs réponses immunitaires *via* les TLR, pour Toll-Like Receptors. Cette découverte fût une étape majeure de la compréhension de l'évolution de l'immunité, ce qui leur vaudra le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2011, conjointement au généticien Bruce Beutler et à l'immunologiste Ralph Steinman (Jouvin Marche, 2011 ; O'Neill et al., 2013). Les TLRs sont présents chez les organismes pluricellulaires les plus anciens, les mollusques, crustacés, insectes et Vertébrés (Lemaitre & Hoffmann, 2007 ; Buchmann, 2014). Aussi, les invertébrés ont déjà des composants basiques du système du complément des Vertébrés, avec des protéines similaires aux protéines C3 (*cf*. Introduction, partie I.3 ; Janeway, 1989 ; Müller et al., 2008 ; Buchmann, 2014). Chez les éponges, des molécules semblables aux cytokines des lymphocytes sont particulièrement surexprimées lors de la reconnaissance du non-soi (Dzik, 2010). Des gènes homologues à RAG1 et RAG2, en partie responsables de la recombinaison somatique des anticorps des Vertébrés à mâchoire, sont présents chez les oursins, anémones et hydres, où ils s'expriment dans les cœlomocytes (Litman et al. 2007 ; Flajnik, 2014 ; Fugmann, 2018). Ces gènes homologues, même si leurs fonctions sont peu connues, seraient issus d'un élément transposable d'origine virale, intégré dans le génome de ces hôtes. Ils auraient ensuite été secondairement perdus et auraient évolués indépendamment chez les Vertébrés, permettant l'émergence de la diversité des récepteurs des lymphocytes (Litman, 2007 ; Cooper & Alder, 2006 ; Travis, 2009). Chez les poissons sans mâchoire, nous retrouvons des protéines aux motifs répétés riches en leucine (LRRs pour Leucine Rich Repeat) semblables aux récepteurs des lymphocytes (Buchmann, 2014). RAG1 et RAG2 sont présents chez les requins, où ils génèrent une grande diversité de récepteurs « germline encoded » (Buchmann, 2014).

L'attirail de l'immunité adaptative (*e.g.* immunoglobulines, lymphocytes et réseau de cytokines) s'est probablement développé à partir de duplications géniques et de recombinaisons des exons issues des premiers Vertébrés sans mâchoire, mais l'origine de la diversification des récepteurs immunitaires était présente bien avant l'apparition de l'immunité adaptative (Buchmann, 2014 ; Litman, 2007 ; Dzik, 2010 ; Loker et al., 2004). L'émergence de l'immunité adaptative est la conséquence évolutive de la modification d'éléments immunitaires déjà présents au sein de l'immunité innée (Buchmann, 2014). Le

système immunitaire s'est développé progressivement, en modifiant peu à peu les fonctions primaires qui permettaient aux organismes plus ancestraux de vivre dans un environnement hostilement peuplé de microbes (Dzik, 2010 ; Rast et al., 2006) Le système immunitaire repose sur les mêmes règles que l'évolution du développement des organismes : il n'y a pas d'apparition brutale de nouveaux mécanismes. Les divers moyens de défenses sont un peu comme des blocs de construction : l'évolution n'a pas remplacé des effecteurs immunitaires par d'autres plus « performants », mais elle additionne et modifie les défenses au fur et à mesure de l'apparition d'organismes de plus en plus complexes (Danilova, 2006). Le système immunitaire des organismes pluricellulaires doit redoubler d'efforts pour surveiller l'ensemble du corps, comparé à celui des organismes unicellulaires (Danilova, 2006). Certains mécanismes ont été améliorés, d'autres ont acquis de nouvelles fonctions ou ont parfois même été éliminés. Par exemple, certains hémocytes des invertébrés (homologues aux macrophages des Vertébrés) ont pour fonction la phagocytose (Buchmann, 2014). Contrairement aux hémocytes phagocytant, les macrophages sont aussi capables de réparer les tissus, alors que ces deux types cellulaires sont issus d'une même fonction primaire. Cet exemple démontre que les aspects fonctionnels peuvent s'additionner dans des lignées évolutives différentes (Buchmann, 2014).

Comme n'importe quel processus biologique, la sélection du système immunitaire repose sur la théorie de l'évolution de Darwin. Il existe une variation de l'immunité entre les individus d'une espèce. Les individus qui ont les meilleures stratégies de défenses contre les pathogènes ont une mortalité plus faible, augmentent leur chance de se reproduire et de transmettre leurs stratégies de défenses à leur descendance. Ainsi, si ces stratégies de défenses sont avantageuses (*e.g.* survie, reproduction) et héréditaires, alors elles sont sélectionnées (Cooper, 2012). Tous les mécanismes immunitaires, aussi « basiques » et « complexes » soient-ils, sont la conséquence directe d'une perpétuelle course à l'armement entre les organismes hôtes et les micro-organismes qu'ils rencontrent (Danivola, 2006 ; Buchmann, 2014). Les pathogènes, mais aussi les micro-organismes non pathogènes (*i.e.* symbiotes au sens large), évoluent vers des stratégies d'invasion, tandis que les hôtes évoluent vers un système immunitaire de plus en plus performant, pour mieux résister – ou mieux tolérer – les microbes. Les mécanismes immunitaires sont le résultat de pressions de sélection constantes imposées par les micro-organismes, qui eux-mêmes dépendent de nombreux facteurs, tel que l'habitat ou l'alimentation (Ghosh et al., 2011). L'ensemble des processi immunitaires décrits peuvent être contournés par des pathogènes (Danilova, 2006). Certains pathogènes sont capables d'inhiber les voies signalétiques de l'immunité et/ou de

changer leurs marqueurs moléculaires (Sukhithasri et al., 2013). Par exemple, une espèce de trypanosome produit plus de 800 variants de protéines de surface, en utilisant un système de recombinaisons de l'ADN (Berriman et al., 2005). Si les marqueurs moléculaires des microbes peuvent être modifiés, alors avoir une grande diversité de récepteurs permet de reconnaître plus efficacement n'importe quelle intrusion, et c'est le cas de l'immunité adaptative. L'innovation majeure qu'est l'immunité adaptative des Vertébrés à mâchoire provient d'une sélection évolutive, résultant probablement de leur plus grande dispersion dans l'environnement et de leur installation dans de nouvelles niches écologiques, les exposant à des micro-organismes de plus en plus divers. La spécificité et la capacité mémoire de l'immunité adaptative permettent aux Vertébrés d'utiliser moins de ressources énergétiques face aux pathogènes rencontrés, comparé à l'immunité innée (Travis, 2009).

Ainsi, l'immunité adaptative n'est pas une nouveauté indépendante de l'immunité innée (Cooper & Alder, 2006). Elle est une capacité supplémentaire, développée sous les pressions de sélection que les organismes Vertébrés ont subi lors d'invasions microbiennes. L'immunité adaptative ne peut s'opérer sans immunité innée (Chaplin, 2010) et certains précurseurs des récepteurs de l'immunité adaptative sont présents chez les invertébrés (Dzik et al., 2010). Dans ce cas, pourquoi les invertébrés n'auraient-ils pas, eux aussi, développés des mécanismes anticipatoires, spécifiques, avec une mémoire et une réponse finement discriminatoire ? Selon Loker et al. (2004), la réponse à cette question réside dans l'étude de l'immunité innée. D'une part, tous les effecteurs de l'immunité innée (*i.e.* ARN interférence, peptides antimicrobien, phagocytose, ROS, RNI, phénoloxydase, etc) sont extrêmement performants. D'autre part, les réponses immunitaires des invertébrés sont sûrement beaucoup plus complexes qu'elles ne paraissent et bien d'autres mécanismes ne sont peut-être pas encore connus (Loker et al., 2004). Des recherches approfondies sur l'immunité innée (des invertébrés et des Vertébrés) ont d'ailleurs révélé des caractéristiques similaires à celles de l'immunité adaptative.

I.5 – La « mémoire immunitaire innée » et le bouleversement de la dichotomie immunité innée *vs* immunité adaptative

La dichotomisation du système immunitaire, reposant sur la spécificité de reconnaissance des pathogènes (*i.e.* capacité à reconnaître et discriminer les mêmes pathogènes d'une première et d'une seconde exposition) et la mémoire immunitaire des lymphocytes, est un fait soutenu depuis l'avènement de l'immunologie. En 1965, Youmans et Youmans observent que des souris injectées avec des LPS augmentent leur résistance face à *Mycobacterium tuberculosis* (agent pathogène de la tuberculose*)* injecté 7 à 14 jours plus tard (Youmans & Youmans, 1965). Alors que le BCG (pour Bacille Calmette-Guérin, un vaccin établi contre la tuberculose) déclenche une mémoire immunitaire spécifique contre *M. tuberculosis*, plusieurs études démontrent qu'il confère aussi une protection contre des infections ultérieures causées par *Staphylococcus aureus*, *Schistosoma mansoni*, *Candida albicans, Yersinia pestis,* ou encore le virus de la variole (Blok et al., 2015 ; Kaufmann et al., 2018 ; Palmieri et al., 2021). Les immunologistes se sont alors demandé : comment est-ce possible que l'immunité adaptative, si précise qu'elle puisse être dans la reconnaissance d'un pathogène donné, protège contre une seconde infection de manière non spécifique ?

Ces protections croisées ne sont pas médiées par les lymphocytes, mais par des réponses immunitaires « adaptatives » provenant des cellules de l'immunité innée (Aaby et al., 2014 ; Blok et al. 2015 ; Netea & Van der Meer, 2017). Dans le cas particulier du BCG, l'effet protecteur du vaccin est lié à l'activité des monocytes et des NK-cells qui, après la vaccination, réagissent plus rapidement et plus efficacement à une infection hétérologue (*i.e.* qui utilise un pathogène différent de la première infection ; Xing et al., 2020). Ces cellules ont de plus forts taux d'expression de récepteurs membranaires (Kleinnijenhuis et al., 2012 ; Xing et al., 2020), une plus grande activité inflammatoire (Palmieri et al., 2021) et ce, durant plusieurs mois après la vaccination (Fig. 6 ; Mourits et al., 2018 ; Xing et al., 2020). L'immunité innée porte donc elle aussi des caractéristiques « adaptatives ».

Les cellules de l'immunité innée des Vertébrés (*i.e.* macrophages, monocytes et NK-cells) sont « entrainées » *via* une reprogrammation cellulaire issue de la première stimulation (Borghesi & Milcarek, 2007 ; Saeed et al., 2014). Cette reprogrammation repose sur des modifications épigénétiques et métaboliques, tels que des changements de structure de la chromatine et des histones, la méthylation de l'ADN ou encore une augmentation de la glycolyse. Par conséquent, les cellules de l'immunité innée qui sont « entrainées »

augmentent ou diminuent leurs réponses immunitaires face à la seconde exposition (Fig. 6 ; Netea et al., 2016 ; Netea & Van der meer, 2017 ; Palmieri et al., 2021 ; Blok et al., 2015 ; Xing et al., 2020 ; Gardiner & Mills, 2016 ; Xing et al., 2020). Cette reprogrammation persiste sur toute la durée de vie de la cellule, ce qui influence la seconde réponse immunitaire indépendamment de l'immunité adaptative (Crișan et al., 2016).

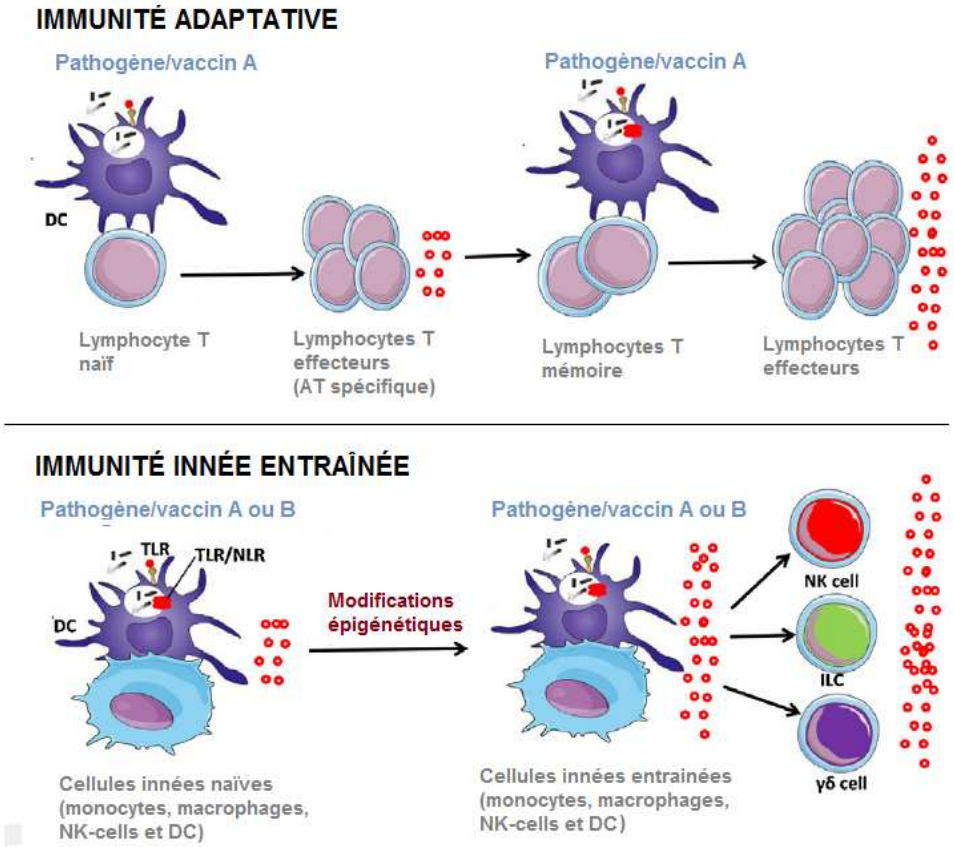


Figure 6. Comparaison de la mémoire immunitaire adaptative et innée. AT signifie antigène, DC signifie cellules dendritiques. Schéma modifié et tiré de Gardiner & Mills, 2016.

Ainsi, les cellules « entrainées » génèrent une protection permettant à l'individu de faire face à un large panel de pathogènes distincts de la première infection (Blok et al., 2015 Xing et al., 2020 ; Mourits et al., 2018 ; Netea et al., 2016). Dans certains cas, cette forme de « mémoire immunitaire innée » peut être aussi spécifique que l'immunité adaptative. Par exemple, la reconnaissance de certains haptènes (*i.e.* élément constitutif d'un antigène) par les NK-cells des Vertébrés induit une tolérance spécifique lors d'une seconde exposition, persistant jusqu'à 4 semaines après la première exposition (O'Leary et al., 2006).

Chez les invertébrés, des phénomènes similaires sont observés alors que ces organismes ne présentent qu'une immunité innée (Beckage, 2008). Chez certaines espèces, les individus ayant été exposés à des molécules immunostimulantes, des pathogènes inactivés ou des doses non létales de pathogènes vivants, sont mieux protégés contre une infection

létale ultérieure (Kurtz, 2005 ; Milutinović & Kurtz 2016). Cette protection, phénoménologiquement similaire à une mémoire immunitaire, est mise en évidence par de meilleurs taux de survie à la seconde infection et une amélioration des capacités immunitaires (*i.e.* phagocytose, production de peptides antimicrobiens, changement de proportion des populations de cellules, etc. ; Melillo et al., 2018). Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster)* par exemple, une première stimulation avec une dose non létale de *Streptococcus pneumoniae* augmente la survie des individus de 75% face à une seconde dose létale avec cette même bactérie, comparée aux individus n'ayant pas reçu de primo-injection (Pham et al., 2007). La protection de *D. melanogaster* est spécifique, elle persiste durant toute la vie de l'individu et implique une meilleure activité phagocytaire des hémocytes (Pham et al., 2007). Bien que les mécanismes précis sur lesquels repose cette protection soient variables et encore mal compris, cette dernière peut être aussi bien spécifique que non spécifique selon les espèces, et divers effecteurs immunitaires sont impliqués (Kurtz, 2005 ; Melillo et al., 2018 ; Cooper & Eleftherianos, 2017 ; *cf*. Introduction, partie II.2).

Les capacités adaptatives de l'immunité innée ne s'arrêtent pas aux invertébrés. Chez les végétaux, pourtant dépourvus de cellules immunitaires circulantes, une première infection locale provoque la libération de molécules signales (*e.g.* acide salicylique, jasmonate, nitric oxide ; Quintin et al., 2014), qui déclenche une résistance généralisée dans l'ensemble des tissus de la plante. Ce phénomène, démontré vers les années 1930, est médié par des reprogrammations épigénétiques des cellules végétales (remodelage de la chromatine et méthylation de l'ADN), stimulant l'expression de gènes antimicrobiens (Fu & Dong, 2013). Les plantes inoculées avec des pathogènes atténués (*i.e.* vaccinées) sont protégées sur de longues périodes (plusieurs semaines voire plusieurs mois) contre des infections ultérieures par d'autres pathogènes (champignons, bactéries, virus, etc. ; Fu & Dong, 2013). Ce processus est considéré comme une forme de mémoire immunitaire innée, avec une réponse anticipatoire et dépendante des infections antérieures (Quintin et al., 2014). Nous retrouvons également cette « mémoire immunitaire innée » chez certaines bactéries. Par exemple, le système CRISPRs (*cf.* Introduction, partie I.3) leur permet non seulement de reconnaître et dégrader de l'ADN viral, mais aussi d'intégrer les fragments d'ADN étrangers dans le génome bactérien (Marraffini & Luciano, 2010 ; Barrangou et al., 2007). Certaines bactéries peuvent ainsi « garder en mémoire » la rencontre avec un virus ou un bactériophage, et lutter plus efficacement lors de la prochaine intrusion.

Même si les invertébrés, plantes et bactéries n'ont pas d'immunité adaptative au sens mécanistique du terme, ils sont capables de réponses immunitaires anticipées semblables à

une mémoire immunitaire. Quel que soit le modèle utilisé, les cellules de l'immunité innée conservent le souvenir d'une infection passée, de manière plus ou moins spécifique, et réagissent en conséquence lors d'une seconde infection (Crisan et al., 2016 ; Palmieri et al., 2021). La mémoire immunitaire n'est donc pas seulement restreinte à l'immunité adaptative (Fig. 7). Une faille conceptuelle s'ouvre alors au sujet de l'immunité innée et adaptative. Si les organismes n'ayant qu'une immunité innée disposent de capacités immunitaires anticipatoires similaires à celles des Vertébrés, alors comment devrions-nous les considérer ? Burnet, en 1969, s'était d'ailleurs déjà interrogé à ce sujet : « est-ce que la reconnaissance immunitaire, parfois suivie d'une capacité mémoire, est innée ou acquise ? » (Pradeu, 2007).

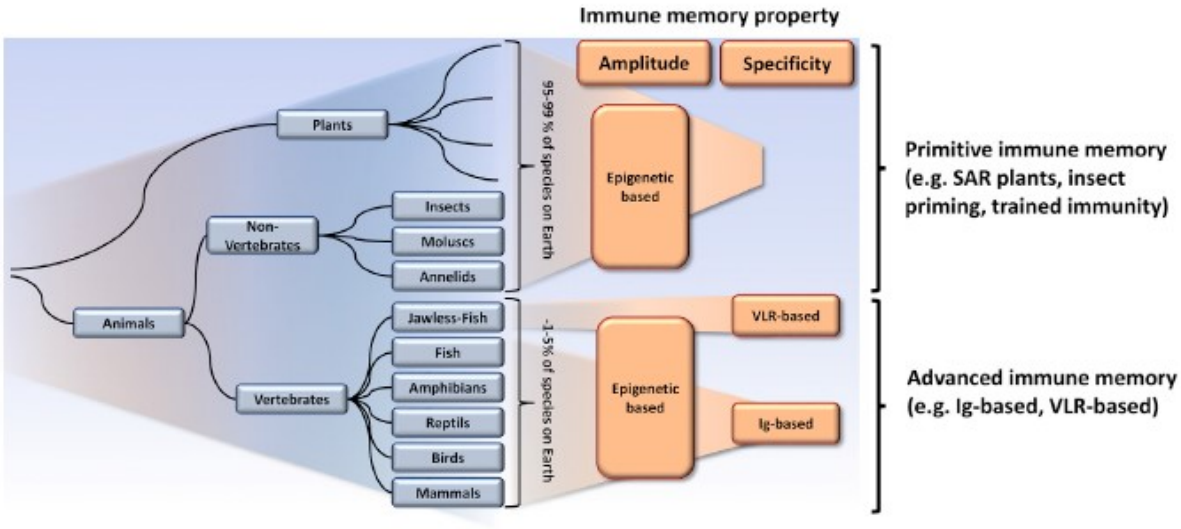


Figure 7. Évolution de la mémoire immunitaire et mécanismes généraux associés (VLR-based : basé sur les récepteurs variables des lymphocytes ; Ig-based : basé sur les immunoglobulines). Schéma tiré de Netea et al., 2019.

Toute la difficulté de la réponse à cette question réside dans la définition que nous attribuons aux termes « acquise » et « adaptative » (Little & Kraaijeveld, 2004 ; Kurtz, 2005), qui n'ont sensiblement pas le même sens selon le point de vue mécanistique ou évolutif (Prigot-Maurice et al., 2022).

D'un point de vue mécanistique, l'immunité adaptative est « adaptée » au pathogène rencontré, car les lymphocytes acquièrent l'information de chaque pathogène et produisent une multitude d'anticorps hautement spécifiques. Les lymphocytes sont clonés puis stockés dans des organes immunitaires, apportant une mémoire à long terme (Palmieri et al., 2021). Ces cellules spécialisées n'ont jamais été observées chez les invertébrés. Ainsi, parler de « mémoire immunitaire » pour l'immunité innée est inapproprié, car elle ne repose pas sur les mêmes mécanismes (même s'ils sont encore peu connus) que l'immunité adaptative. La «

mémoire » de l'immunité innée peut être une modification persistante de la réactivité des cellules immunitaires causée par des modifications épigénétiques par exemple (*cf.* Introduction, partie II.2). De plus, une première rencontre avec un pathogène peut protéger contre d'autres types de pathogènes, démontrant que le degré de discrimination de l'immunité innée est parfois moindre que celui de l'immunité adaptative (Netea et al., 2011). Au sens mécanistique du terme, la « mémoire immunitaire innée » n'est donc pas systématiquement « adaptée » aux pathogènes rencontrés.

Or, du point de vue évolutif, le terme « adaptatif » réfère à une capacité d'adaptation du système immunitaire. Que les mécanismes immunitaires soient différents ou similaires, la conséquence phénoménologique est la même : les organismes sont mieux protégés face à une seconde infection, grâce à une seconde réponse immunitaire « adaptée », plus rapide, plus efficace et parfois même spécifique (Palmieri et al., 2021 ; Moret et al., 2019). À partir du moment où la protection résultante est acquise au cours de la vie de l'individu et qu'elle améliore les capacités de survie et/ou de reproduction des individus, elle est adaptative, qu'elle provienne de l'immunité innée ou de l'immunité adaptative.

Au-delà de cette différence d'opinion, s'ajoute la difficulté à classifier ce processus immunitaire. Les cellules de l'immunité innée appartiennent à l'immunité innée puisque leurs fonctions sont génétiquement codées depuis la lignée germinale et sont conservées chez la plupart des organismes vivants. Or, puisque leurs fonctions immunitaires sont améliorées face à une seconde infection, elles appartiennent également à l'immunité adaptative au sens mécanistique. Néanmoins, la mémoire immunitaire innée n'est pas classifiable dans l'immunité adaptative, car il n'y a pas d'expansion clonale de ces cellules et de recombinaisons somatiques des gènes. Pour estomper cette difficulté sémantique, plusieurs termes sont aujourd'hui utilisés pour décrire cette « mémoire immunitaire innée » : nous parlons de « trained immunity » pour les Vertébrés (Netea et al., 2011 ; Netea & Van der meer, 2017), de « priming immunitaire » pour les invertébrés et de « résistance systémique acquise » (SAR) pour les plantes (Netea et al., 2011 ; Quintin et al., 2014). L'apparition de ces termes dans le lexique montre que la dichotomie du système immunitaire n'est qu'un moyen simplifié que nous utilisons pour parler d'immunité (Netea & Van der meer, 2017), mais sa démarcation est loin d'être aussi simple.

Contrairement à la façon dont elles ont longtemps été décrites, l'immunité innée et l'immunité adaptative ne sont pas deux processus distincts. La diversification des récepteurs immunitaires est sûrement une capacité ubiquiste au sein des espèces animales, et non pas strictement portée par l'immunité adaptative (Cooper, 2012 ; Xing et al., 2020). Netea et Van

der Meer (2017) suggèrent que la mémoire immunitaire innée est un processus ancien. Puis, l'immunité adaptative et son nouveau mécanisme de reconnaissance conférant une mémoire immunitaire plus performante et plus spécifique, auraient été activement sélectionnés chez les Vertébrés. La spécificité de l'immunité entrainée des Vertébrés aurait alors diminuée au cours de l'évolution (Netea et al., 2011). La capacité « mémoire » de l'immunité innée serait comme un « chaînon manquant », reliant l'immunité innée à l'immunité adaptative (Netea et al., 2011). Dans sa globalité, l'immunité est un continuum de mécanismes, qui ne sont « ni noirs, ni blancs », mais suivent une multitude de nuances de gris (Cooper, 2012). Toutes les capacités adaptatives du système immunitaire (immunité entrainée, priming immunitaire, SAR, CRISPR et mémoire immunitaire des lymphocytes) montrent que l'évolution a apporté différentes solutions pour répondre au même phénomène : l'intrusion répétée des mêmes éléments du non-soi (Cooper, 2012). Pour citer un des propos de Klein (1989), il serait plus pertinent d'oublier ce que nous avons appris de l'immunité des Vertébrés et commencer une nouvelle recherche sans idées préconçues, pour comprendre comment les invertébrés se défendent contre les pathogènes, maintiennent l'intégrité de leur corps et distinguent le soi du non-soi (Klein, 1989).

Ce changement conceptuel au sujet de l'immunité n'a pris de l'ampleur que depuis la fin du 20ème siècle, lorsque les mécanismes de l'immunité entrainée des Vertébrés ont été explorés. Pourtant, la découverte du priming immunitaire chez les invertébrés est aussi ancienne que la découverte de l'immunité elle-même.

II. LE PRIMING IMMUNITAIRE DES INVERTÉBRÉS

II.1 – Racines historiques

[Partie partiellement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2022]

La découverte du système immunitaire provient de l'observation de l'immunité adaptative *via* la vaccination (fin du 19ème siècle ; *cf*. Introduction, partie I.1). En raison des intérêts pour la santé publique, les recherches en immunologie se sont principalement focalisées sur la mémoire immunitaire des mammifères. Néanmoins, plusieurs travaux portant sur la « résistance acquise » des insectes sont réalisés à cette même période.

Les premières traces écrites de ces travaux remontent à 1895, date à laquelle Kowalevsky remarque que les individus du genre *Scolopendrae* sont très susceptibles à la bactérie *Bacillus anthracis* (Wagner, 1961). Or, certains d'entre eux sont capables de survivre à l'infection et ont une capacité phagocytaire plus élevée (Kowalevsky, 1895 ; Wagner, 1961). En 1911, d'Herelle observe que parmi des criquets inoculés oralement avec une souche atténuée de *Coccobacillus acridiorum*, 25% d'entre eux expriment une « immunité acquise » face à une seconde infection avec la même bactérie vivante. Les travaux les plus reconnus sur la résistance acquise des invertébrés se situent entre 1920 et 1940. Ils ont majoritairement été réalisés par l'équipe de Metalnikoff à l'Institut Pasteur (Metalnikoff, 1920 ; Wagner, 1961), où Chorine, Toumanoff et Zernoff, ont conduit plusieurs expériences chez diverses espèces d'insectes, telles que l'abeille, la piéride de l'aubépine, du choux, la fausse teigne de la cire, ou encore la lithosie applatie (Wagner, 1961). D'après leurs observations, une chose est sûre : une primo-injection avec une faible dose de pathogènes vivants, atténués ou des substances microbiennes, déclenche un état de résistance chez ces individus qui montrent une meilleure survie à une seconde infection normalement létale (Wagner, 1961). Ils nomment cette résistance acquise « l'immunisation » : un processus immunitaire protégeant certains insectes d'une infection létale en les stimulant préalablement avec des injections homologues (*i.e.* avec le même pathogène pour les deux injections) ou hétérologues (*i.e.* avec des pathogènes différents à chaque infection ; Paillot, 1920 ; Metalnikoff & Gaschen, 1921 ; Ishimori, 1924 ; Chorine, 1929). Le priming immunitaire est donc découvert dans les années 1950 et certains immunologistes déclarent même que cette résistance ressemble à l'immunité acquise non-spécifique observée chez les mammifères à cette même époque, soit l'immunité entrainée dont j'ai parlé précédemment (Wagner, 1961).

Dans les années 1950, les mécanismes expliquant l'immunisation des invertébrés sont très peu connus. Hormis une augmentation de la phagocytose à la seconde infection, l'autre hypothèse possible porte sur les molécules antibactériennes de l'hémolymphe, capables de lyser efficacement les bactéries et inhiber leur croissance. Par exemple, Glaser (1925) met en évidence que certaines substances antibactériennes sont 10 fois plus élevées dans l'hémolymphe des criquets après un vaccin de *Bacillus poncei*, comparés aux individus non vaccinés. Toutefois, ces composés bactéricides peuvent très bien provenir des hémocytes responsables de la phagocytose (Glaser, 1925). D'après Wagner (1961), les techniques de microbiologie à cette époque sont très diverses et les méthodes expérimentales pas toujours fiables, ce qui rend difficile l'interprétation de ces premiers résultats.

À cette époque, aucune observation d'anticorps, de lymphocytes ou recombinaisons somatiques n'avait été faite. Il était donc inconcevable de penser que les invertébrés puissent être pourvus d'une mémoire immunitaire. Cette idée reçue a notamment été appuyée par plusieurs expériences n'ayant pas montré d'immunisation chez certaines espèces (Metchnikoff, 1905 ; Couvreur 1923 ; Zernoff, 1934), même si ces contres exemples semblent s'expliquer par des biais méthodologiques. De plus, la protection conférée par les vaccins est souvent très hétérogène selon les espèces : les biologistes de l'époque montrent (comme aujourd'hui d'ailleurs) qu'elle varie selon le type de pathogène, sa virulence, la dose administrée, le délai entre les infections et la voie d'infection (orale ou par injection). À cause de ce manque d'homogénéité et de démonstrations mécanistiques, l'immunisation des invertébrés est ainsi « jetée aux oubliettes », laissant un grand silence dans les recherches en immunologie durant quelques dizaines d'années. Dans les années 1970-80, plusieurs études se penchent sur les rejets de greffes chez les invertébrés (Cooper, 1969 ; Netea et al., 2011). Chez les éponges, les coraux, les vers de terres et les blattes, une seconde allogreffe issue d'un donneur génétiquement différent effectuée quelques jours après la première est rejetée beaucoup plus rapidement (Hildemann et al., 1977 ; Hildemann et al., 1979 ; Cooper & Roch, 1986 ; Hartman & Karp, 1989). Ces résultats démontrent que l'immunité innée des invertébrés est capable de mémoire à reconnaissance spécifique. Les recherches au sujet de « l'immunisation » des invertébrés, accompagnées par les découvertes grandissantes sur l'immunité entrainée, suscitent alors de nouveau l'attention de la communauté scientifique. Les expériences réalisées à la fin du 20ème, début du 21ème, parlent alors de « priming immunitaire » et non plus d'immunisation (*cf.* Introduction, partie I.5). Grâce aux technologies nouvelles, certains mécanismes sur lesquels reposent le priming immunitaire commencent à être élucidés (Milutinović et al., 2016 ; Lanz-Mendoza & Garduño, 2018).

II.2 – Connaissances actuelles des mécanismes du priming immunitaire

[Partie partiellement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2022]

Le priming immunitaire est défini comme un processus par lequel les individus améliorent leurs capacités immunitaires suivant une première infection, conduisant à une meilleure protection lors d'une seconde exposition par le même – ou différents – pathogène(s) (Kurtz, 2005 ; Contreras-Garduño et al., 2016 ; Lanz-Mendoza & Garduño, 2018). Depuis les années 1950, ce processus est observé chez pas moins de 40 espèces différentes d'invertébrés, issues d'écosystèmes terrestres ou aquatiques (Milutinović et al., 2016). Il s'exprime aussi bien durant les stades larvaires qu'à l'état adulte (Contreras-Garduño et al., 2016 ; Khan et al., 2016 ; Sheehan et al., 2018 ; Tetreau et al., 2019), et dépend de nombreux facteurs. La force de protection du priming immunitaire est influencée par l'âge et le sexe des individus, la manière dont ils sont infectés (*e.g.* système digestif ou injection dans l'hémolymphe), le composé et le dosage utilisés pour la première stimulation immunitaire, le type de pathogène (*e.g.* bactérie à gram (+) ou gram (-), virus, nématodes), leur virulence, etc (Daukšte et al., 2012 ; Tate & Rudolf, 2012 ; Tidbury et al., 2012 ; Best et al., 2013 ; Khan et al., 2016 ; Mondotte et al., 2018 ; Prigot-Maurice et al., 2021).

Le priming immunitaire est souvent mis en évidence par de meilleurs taux de survie face à une seconde infection (Tab. 1). La première stimulation immunitaire permet aux individus d'améliorer leurs capacités de survie de 10 à 100% comparé aux individus non stimulés, avec une durée de protection entre les deux infections allant de quelques jours à plusieurs mois selon les espèces (Tab.1). Divers stimulants sont utilisés pour déclencher la première réponse immunitaire, comme des pathogènes vivants, inactivés (*e.g.* à la chaleur, ou traitement chimique comme le formaldéhyde) ou bien des composés non-vivants issus des parois bactériennes, fongiques ou virales (*e.g.* LPS, PNG ; Bergin et al., 2006 ; Kelly & Kavanagh, 2011 ; Chang et al., 2018).

Tableau 1. Exemples de priming immunitaire contre des pathogènes chez les invertébrés en termes d'amélioration des capacités de survie (liste non exhaustive). Tableau tiré de Prigot-Maurice et al., 2022.

Taxa	Host species	Pathogens used	First pathogenic exposure	Second letal exposure	Route of infection	Individual's state	Time between infections	Increase of survival	Time post letal injection	References
Cnidarian	*E. pallida*	*V. corallilyticus*		*V. corallilyticus*	Balneation		2 weeks	30%	10 days	Brown & Rodriguez, 2015
							4 weeks	30%	10 days	
Coleopteran	*T. castaneum*	*S. aureus*	Formaldehyde	*S. aureus*	Thoracic pricking	Adult	20 days	25%	14 days	Dhinaut et al., 2017
		B.thuringiensis	Formaldehyde	*B.thuringiensis*	Thoracic pricking	Adult	20 days	20%	14 days	
		E. coli	Formaldehyde	*E. coli*	Thoracic pricking	Adult	20 days	15%	14 days	
	T. castaneum	*B.thuringiensis "bts"*	Spore-culture supernatant	*B.thuringiensis "bts"*	Oral exposure	Larvae	5 days	20%	8 days	Futo et al., 2017
		B.thuringiensis "btt"	Spore-culture supernatant	*B.thuringiensis "btt"*	Oral exposure	Larvae	5 days	30%	8 days	
	T. castaneum	*B.thuringiensis "bt1"*	Heat killed	*B.thuringiensis "bt1"*	Thoracic pricking	Larvae	8 days	70%	17 days	Roth et al., 2009
		B.thuringiensis "bt2"	Heat killed	*B.thuringiensis "bt2"*	Thoracic pricking	Larvae	8 days	35%	17 days	
		B. subtilis	Heat killed	*B. subtilis*	Thoracic pricking	Larvae	8 days	25%	17 days	
	T. molitor	*M. brunneum*	Living (low dose)	*M. brunneum*	Injection in haemolymph	Larvae	10 days	20%	45 days	Contreras-Guarduno et al., 2019
	T. molitor	*B.thuringiensis*	Living (low dose)	*B.thuringiensis*	Injection in haemolymph	Larvae	10 days	30%	10 days	Medina-gomez et al., 2018
	T. molitor	LPS	LPS	*M. anisopliae*	Deeping	Larvae	4 days	25%	40 days	Moret & Siva-jothy, 2003
							7 days	30%	40 days	
Mollusks	*C. gigas*	Poly:IC	Poly:IC	OsHV-1	Injection in haemolymph	Juvenil	10 days	100%	10 days	Lafont et al., 2020
	C. gigas	Poly:IC	Poly:IC	OsHV-1	Injection in haemolymph	Juvenil	1 days	75%	10 days	Lafont et al., 2017
							14 days	60%	10 days	
							28 days	60%	10 days	
							56 days	60%	10 days	
							126 days	20%	10 days	
Crustacean	*L. vannamei*	*V. alginolyticus*	Heat killed	*V. alginolyticus*	Injection in haemolymph	Adult	7 days	25%	7 days	Lin et al., 2013
	L. vannamei	*V. alginolyticus*	Formalin-killed	*V. alginolyticus*	Injection in haemolymph	Adult	7 days	40%	7 days	
	A. vulgare	*S. enterica*	Living (low dose)	*S. enterica*	Injection in haemolymph	Adult	7 days	25%	7 days	Prigot-Maurice et al., 2019
Dipteria	*D. melanogaster*	DCV virus	UV (312nm) 15 min	DCV virus	Injection in haemolymph	Larvae to adult	8 days	20%	12 days	Mondotte et al., 2018
	D. melanogaster	*S. pneumoniae*	Heat killed	*S. pneumoniae*	Injection in haemolymph	Adult	1 days	20%	30 days	Pham et al., 2007
							3 days	15%	30 days	
							7 days	10%	30 days	
							10 days	15%	30 days	
							14 days	20%	30 days	
	Ae. Aegypti	*E.coli*	Living (low dose)	*E.coli*	Injection in haemolymph	Larvae to adult	1 days	45%	20 days	Moreno Garcia et al., 2015
Hymenoptera	*P. plantaginis*	*S. marcescens*	Living (low dose)	*S. marcescens*	Oral exposure	Larvae	5 days	60%	5 days	Mikonranta et al., 2014
	G. mellonella	LPS	LPS	*P. luminescens TT01*	Injection in haemolymph	Larvae	2 days	70%	3 days	Wu et al., 2015
	G. mellonella	*B. thuringiensis*	Living (low dose)	*B. thuringiensis*	Injection in haemolymph	Larvae	3 days	20%	1 days	Taszlow et al., 2017
	G. mellonella	*A. fumigatus*	Living (low dose)	*A. fumigatus*	Injection in haemolymph	Larvae	1 days	30%	3 days	Fallon et al., 2011
	C. pennsylvanicus	*S. marcescens*	Heat-killed	*S. marcescens*	Injection in haemolymph	Larvae	3 days	30%	8 days	Rosengaus et al., 2016
	B. terrestris	*P. alvei*	Living (low dose)	*P. alvei*	Injection in haemolymph	Adult	8 days	20%	7 days	Sadd & Schmid Hempel, 2006.
							22 days	30%	7 days	
	B. terrestris	*P. larvae*	Living (low dose)	*P. larvae*	Injection in haemolymph	Adult	8 days	45%	7 days	
							22 days	50%	7 days	
	B. terrestris	*P. fluorescens*	Living (low dose)	*P. fluorescens*	Injection in haemolymph	Adult	8 days	45%	7 days	
							22 days	20%	7 days	

Netea et al. (2011) suggèrent que deux grands types de mécanismes distincts sont impliqués dans le priming immunitaire. Après la première infection, il y aurait une diversification somatique et spécifique et/ou un autre type de réponse (spécifique ou non), reposant sur l'amélioration durable des fonctions immunitaires sans pour autant demander une diversification des récepteurs (Netea et al., 2011). Dans la littérature, trois mécanismes du priming immunitaire sont décrits (Fig. 8 ; Coustau et al., 2016 ; Moret et al., 2018).

(1) La « sustained immune response » ou réponse immunitaire soutenue. Ce mécanisme correspond à l'expression durable de la première réponse immunitaire, qui persiste jusqu'à la seconde infection. La protection résultante provient des capacités immunitaires déjà améliorées au moment où la seconde infection survient, que l'immunostimulant soit éliminé de l'hôte ou non (Mikonranta et al., 2014 ; Lafont et al., 2020). C'est une réponse immunitaire de type quantitative, qui, grâce au maintien de son activité, protège l'organisme contre une infection ultérieure. La réponse immunitaire soutenue fait intervenir l'activité phénoloxydase (Vertyporokh & Wojda, 2020), la production de ROS (Mikonranta et al., 2014), l'activité antimicrobienne (Dhinaut et al., 2018), la phagocytose (Roth et Kurtz, 2009), ou encore une surexpression de certains récepteurs immunitaires (Steiner, 2004).

(2) La « recalled immune response » ou réponse bimodale. Dans ce cas, le système immunitaire se souvient du pathogène rencontré lors de la première exposition et répond plus efficacement lors de la seconde infection. Ce mécanisme implique que le pathogène (ou l'immunostimulant) soit totalement éliminé entre les deux infections et que la réponse immunitaire revienne à la normale entre les deux infections (*i.e.* extinction de la réponse). Ce mécanisme est démontré chez le moustique *Anopheles albimanus* contre *P. berghei*, *via* une transcription bimodale de peptides antimicrobiens (Contreras-Garduño et al., 2015). Ce mécanisme de priming immunitaire est semblable à l'immunité adaptative des Vertébrés.

(3) L'« immune shift » ou changement immunitaire. Il consiste en un changement d'effecteurs immunitaires utilisés à chaque infection (Pinaud et al., 2016 ; Greenwood et al., 2017). Ce mécanisme a été démontré chez l'escargot d'eau douce *Biomphalaria glabrata* contre *Schistosoma mansoni* : la première infection déclenche une réponse immunitaire cellulaire, puis la seconde infection déclenche une réponse humorale (Pinaud et al., 2016). Dans ce cas, l'individu adapte son système de défense en utilisant un autre effecteur immunitaire probablement plus performant contre le même pathogène.

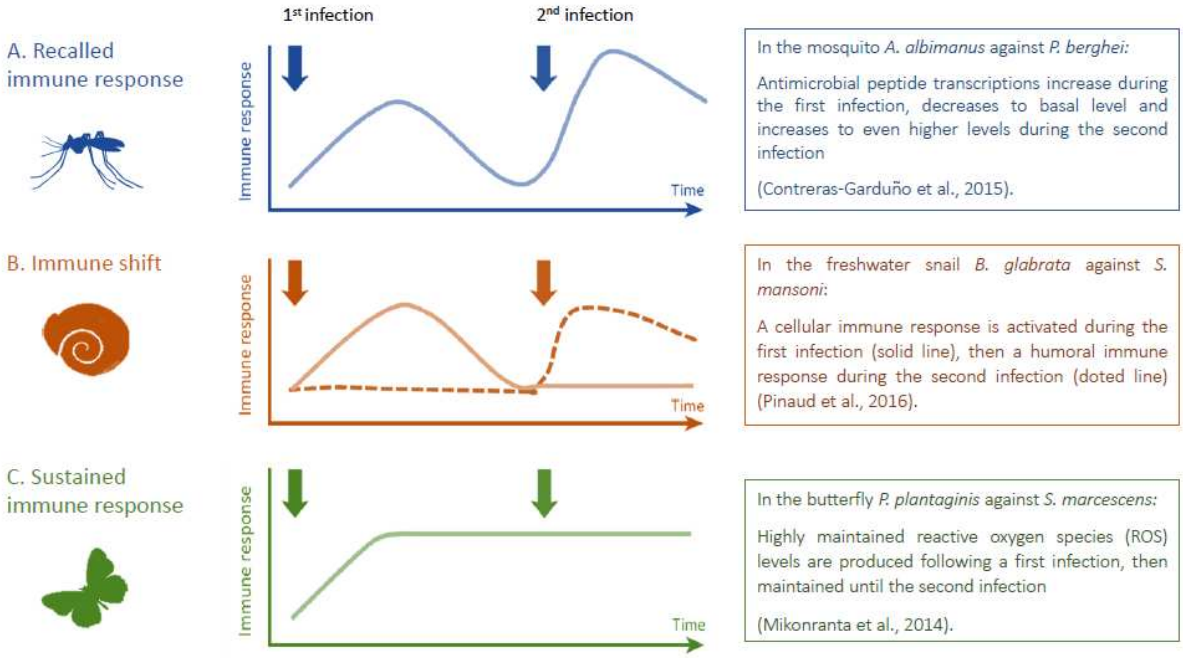


Figure 8. Illustration des différents mécanismes du priming immunitaire chez les invertébrés et leurs exemples associés. Schéma modifié à partir de Coustau et al. (2016) et publié dans Prigot-Maurice et al. (2022).

Le priming immunitaire repose soit sur une tolérance, soit une résistance accrue lors la seconde infection. Par exemple, les larves de drosophile primo-injectées avec le DVC virus améliorent leur tolérance contre ce même virus rencontré à l'état adulte (Mondotte et al., 2018). À l'inverse, des drosophiles primo-injectées avec *S. pneumoniae* améliorent leur résistance durablement jusqu'à la prochaine rencontre avec cette même bactérie, grâce à l'amélioration de la phagocytose (Pham et al., 2007). Selon les espèces, le priming immunitaire se déclenche contre certains pathogènes, mais pas contre d'autres (Brehélin & Koch, 2008). Il peut être spécifique à la souche rencontrée lors de la première exposition (*e.g.* Sadd & Schmid-Hempel, 2006 ; Roth & Kurtz, 2009 ; Roth et al., 2009 ; Wu et al., 2015 ; Taszłow et al., 2017) ou bien apporter une protection non spécifique contre un large panel de pathogènes différents (Faulhaber & Karp, 1992 ; Bergin et al., 2006 ; Eleftherianos et al., 2006 ; Meriggi et al., 2019).

Souvent, la réponse immunitaire soutenue est attribuée à une protection non spécifique, contrairement à la réponse bimodale et le changement immunitaire, qui reposent sur un stockage de l'information d'une précédente rencontre. Cependant, l'attribution de cette capacité discriminatoire n'est pas si simple. Pour reprendre l'exemple de Prakash et Khan (2022), les Diptericins et la Drosocin, deux peptides antimicrobiens produits chez la drosophile, s'attaquent spécifiquement à *Providencia rettgeri* et *Enterobacter cloacae*

(Hanson et al., 2019 ; Prakash & Khan, 2022). De ce fait, si la réponse immunitaire soutenue implique ce genre de peptide, alors elle peut être aussi spécifique qu'une réponse bimodale (Prakash & Khan, 2022). Dans l'étude de Faulhaber et Karp (1992), le priming immunitaire chez la blatte *Periplaneta americanum* contre *Pseudomonas aeruginosa* est d'abord non spécifique (*i.e.* il est aussi induit par d'autres bactéries), puis devient spécifique à *P. aeruginosa* au bout de 4 jours après la première stimulation. Ce résultat suggère que la spécificité peut s'acquérir au bout d'un certain temps, et que les mécanismes du priming immunitaire ne sont sûrement pas exclusifs. Ils pourraient s'exprimer simultanément au sein d'un même individu, apportant à la fois des réponses immunitaires spécifiques et non-spécifiques.

Néanmoins, que la spécificité soit portée par une réponse soutenue, une réponse bimodale ou un changement immunitaire, la question résultante de ces observations reste la même : comment les invertébrés peuvent-ils discriminer si finement les pathogènes et se souvenir d'une précédente rencontre alors qu'ils n'ont pas d'anticorps ?

En ce qui concerne les infections virales, le système d'ARN interférence des invertébrés peut engendrer un priming immunitaire spécifique contre certains virus, en stockant des vestiges de l'ADN viral dans des exosomes (Mondotte et al., 2018, 2020 ; Gourbal et al., 2018). Ce système est relativement similaire à CRISPR, utilisé par les organismes procaryotes (*cf.* Introduction, partie I.5). Toutefois, l'une des découvertes les plus importantes est que certaines espèces d'invertébrés produisent des protéines/récepteurs hypervariables avec une grande diversité d'isoformes (Tab. 2)

Tableau 2. Exemples de candidats de récepteurs hautement diversifiés de l'immunité innée des invertébrés (liste non exhaustive). Pour revue : Fugmann et al., 2018.

Espèce	**Molécule**	**Référence**
S. purpuratus (échinoderme)	SpTransformer	(Rast et al., 2006 ; Hibino et al., 2006)
C. intestinalis (tunicier)	Variable Region Containing Chitin-Binding Proteins (VCBPs)	(Dishaw et al., 2011)
D. melanogaster (diptère)	Secondary viral small-interfering RNA (vsRNAs)	(Tassetto et al., 2017)
A. queenslandica (spongiaire)	Nod Like Receptors (NLR)	(Degnan et al., 2009)
B. glabrata (mollusque)	Fibrinogen-Related Proteins (FREPs)	(Adema et al., 1997 ; Moné et al., 2010)
D. melanogaster (diptère) *A. gambiae* (diptère) *L. vannamei* (crustacé)	Down Syndrome cell adhesion molecules (DSCAMs)	(Chiang et al., 2013)

Parmi ces protéines/récepteurs hypervariables, les plus étudiés sont sûrement les Down Syndrome Cell Adhesion Molecules (Dscams) et les Fibrinogen-Related Proteins (FREPs). Ces protéines de surfaces et carbohydrates solubles, respectivement, sont toutes deux affiliées à la superfamille des immunoglobulines (Zhang & Loker, 2003 ; Watson et al., 2005 ; Hanington & Zhang, 2011 ; Cerenius & Söderhäll, 2013 ; Armitage et al., 2015 ; Ng & Kurtz, 2020). Elles sont retrouvées chez de nombreuses espèces d'insectes et de crustacés (Crayton et al., 2006 ; Dong et al., 2006 ; Brites et al., 2008 ; Chou et al., 2009). L'importance portée à ces molécules est qu'elles sont impliquées dans les réponses immunitaires (Hanington & Zhang, 2011 ; Hertel et al., 2005). Elles sont exprimées au niveau des hémocytes et peuvent se lier à différents MAMPs (*e.g.* bactériens, fongiques ou même de trématodes parasites) au sein d'un même individu (Adema et al., 1997 ; Watson et al., 2005 ; Dong et al., 2006 ; Moné et al., 2010). Chez la crevette *Liptopenaeus vannamei*, l'expression des Dscams est surexprimée après une infection par le White Spot Syndrome Virus (Chiang et al., 2013), et lorsque qu'elle est réprimée avant cette infection, les individus ont des taux de mortalité plus élevés (Fu et al., 2016). Chez *B. glabrata*, trois gènes spécifiques associés aux FREPs sont exprimés lors d'une infection avec des LPS ou des bactéries à gram (+) (Adema, 2015). De plus, les individus résistants à *S. mansoni* surexpriment une famille spécifique de FREPs, comparés aux individus non résistants (Hertel et al., 2005).

Ces molécules se diversifient somatiquement en dizaine de milliers d'isoformes grâce à l'épissage alternatif des gènes, des sauts d'exons ou encore la conversion de gènes, similairement à la production d'anticorps chez les Vertébrés (Watson et al., 2005 ; Dong et al., 2006 ; Zhang & Locker, 2003 ; Beckage, 2008). Certaines études suggèrent que les modifications épigénétiques sont surexprimées durant l'évolution d'un priming immunitaire spécifique (Ferro et al., 2019 ; Netea et al., 2020). La plasticité du priming immunitaire pourrait ainsi reposer sur des changements quantitatifs de l'expression des gènes *via* des processus épigénétiques, tel que la méthylation de l'ADN, l'acétylation des histones ou encore les micro-ARN (Morandini et al., 2016). Bien que les Dscams et les FREPs soient supposés être impliqués dans la spécificité du priming immunitaire (Zhang et al., 2020), des études complémentaires démontrant le lien de cause à effet sont requises pour confirmer le rôle de ces protéines dans la discrimination et la capacité mémoire du priming immunitaire (Armitage et al., 2015).

L'hypothèse selon laquelle les modifications épigénétiques permettent un priming immunitaire sont d'autant plus pertinentes que ces modifications sont connues pour être transmises aux générations suivantes (Vilcinskas, 2021). Il s'avère que le priming

immunitaire est parfois transgénérationnel (Roth et al., 2018). Chez certaines espèces, les parents transmettent à leurs descendants une protection immunitaire contre le(s) pathogène(s) qu'ils ont rencontrés, même si les descendants n'ont jamais été exposés à ce(s) pathogène(s) (Moret, 2006 ; Dubuffet et al., 2015 ; Pigeault et al., 2016 ; Ben-Ami et al., 2018 ; Bernier et al., 2019). Ce transfert d'immunité est soit une tolérance, soit une résistance accrue chez les descendants. Chez l'artémie, le priming immunitaire spécifique contre *Vibrio campbelli* augmente la résistance contre la même souche chez les trois générations successives (Norouzitallab et al., 2015). Chez *T. castaneum*, le priming immunitaire du père induit une augmentation de l'activité phénoloxydase chez les descendants (Roth et al., 2010 ; Eggert et al., 2014), alors que chez la drosophile, un inhibiteur de la réponse immunitaire, augmentant probablement la tolérance aux infections, est transmis aux générations suivantes lors de l'exposition à une guêpe parasitoïde, *Leptopilina heterotoma* (Bozler et al., 2020).

Le priming transgénérationnel peut être lié à un transfert de modifications épigénétiques mais aussi de protéines, d'activité antimicrobienne ou de composés microbiens (Freitak et al., 2014 ; Sadd & Schmid-Hempel, 2007 ; Vilcinskas, 2021 ; Zanchi et al., 2012 ; Gegner et al., 2019). Chez l'abeille, le priming transgénérationnel est causé par un transfert de fragments bactériens dans les œufs (Freitak et al., 2014; Salmela et al., 2015). D'après Gourbal et al. (2018), une autre explication serait le transfert de miRNAs, de petits fragments d'ADN impliqués dans la communication cellulaire, puisqu'ils sont aussi impliqués dans la régulation de l'immunité chez les insectes, crustacés et mollusques (Gourbal et al., 2018).

Dans son ensemble, le priming immunitaire est encore mal compris. Son expression dépend de nombreux facteurs, il repose sur différents mécanismes dont les bases génétiques sont peu connues. Il n'existe pas de tendance générale au sein du priming immunitaire et nous manquons de connaissances pour mieux comprendre son fonctionnement et son évolution. Ce problème d'hétérogénéité, qui entrave la compréhension de ce processus, provient en partie du sens attribué au terme « priming immunitaire ».

II.3 – Le problème sémantique et le grain de sel des symbiotes protecteurs

[Partie partiellement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2022]

Le terme « priming » vient de l'anglais « to prime », qui veut dire « amorcer ». Traduit littéralement, le priming immunitaire est un « amorçage immunitaire ». À ma connaissance, l'adjectif « primed » est utilisé pour la première fois en 1940 par Lewis, pour parler d'une personne ayant reçu une première injection d'un vaccin contre la diphtérie, une maladie respiratoire causée par le bacille de Löffler-Klebs (Tudor, 1941). Pourtant, la désignation de « priming immunitaire » pour parler de la mémoire immunitaire des invertébrés n'apparaît que vers les années 2000. Avant cette période, les scientifiques parlaient « d'immunisation » (*cf.* Introduction, partie II.1), de « responsive mode prophylaxis » (Moret & Siva-Jothy, 2003) ; de « tolérance » (Kurtz & Armitage, 2006), de « mémoire immunitaire innée » (Milutinović & Kurtz, 2016), ou encore de « potentiation » (Boraschi & Italiani, 2018). Compte tenu du débat conceptuel concernant la mémoire immunitaire innée (*cf.* Introduction, partie I.5), le terme « priming immunitaire » est aujourd'hui adopté. Il admet que l'immunité innée porte des caractéristiques adaptatives, et indique une protection accrue contre une seconde exposition, chez les invertébrés.

L'ensemble des informations précédentes montre une évidence : le priming immunitaire est un terme générique. Il est utilisé pour n'importe quel phénomène durant lequel les invertébrés améliorent leurs capacités immunitaires à la suite d'une première infection et sont ainsi mieux protégés face à une seconde infection (Kurtz, 2005 ; Contreras-Garduño et al., 2016 ; Lanz-Mendoza & Garduño, 2018). Nous parlons de priming immunitaire quel que soit le mécanisme sous-jacent et les effecteurs immunitaires responsables (Prigot-Maurice et al., 2022 ; Little & Kraaijeveld, 2004). Le terme « priming immunitaire » est même utilisé pour parler d'une protection accrue contre un pathogène lorsque les individus ont été précédemment soumis à un stress physique ou thermique (Browne et al., 2014; Mowlds et al., 2008; Wojda & Jakubowicz, 2007). Comparer des processus phénoménologiquement similaires alors qu'ils proviennent de mécanismes différents, empêche la clarification épistémologique de l'immunité des invertébrés.

Ce problème sémantique est d'autant plus accentué que nous parlons aussi de « priming immunitaire » concernant les symbioses défensives (Eleftherianos et al., 2013 ; Hamilton & Perlman, 2013 ; Clay, 2014 ; Oliver et al., 2014 ; Vorburger & Perlman, 2018). En effet, certains symbiotes, par leur simple présence, améliorent les capacités de survie et d'élimination des pathogènes de leur hôte, comparés aux hôtes asymbiotiques (*i.e.* sans

symbiotes, Gerardo & Parker, 2014). Cette protection médiée par les symbiotes résulte soit (1) d'une compétition entre les symbiotes et les pathogènes au sein de l'hôte qui représente la même niche écologique, soit (2) un priming immunitaire déclenché par les symbiotes (Kambris et al., 2009 ; Pan et al., 2012 ; Rancès et al., 2012 ; Clay, 2014 ; Oliver et al., 2014). Certains symbiotes protecteurs stimulent les réponses immunitaires de leur hôte, ce qui les protègent contre des virus, des parasites eucaryotes, des champignons ou encore des bactéries pathogènes (Tab. 3 ; Clay, 2014 ; Eppler et al., 2020 ; McLaren & Callahan, 2020). Les démonstrations les plus connues de ce type de priming immunitaire concerne la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* (*cf*. Introduction, partie III.3). Chez les drosophiles et les moustiques, sa présence augmente l'expression des gènes de l'immunité et dans certains cas, elle stimule la production de ROS chez son hôte, ce qui limite la réplication virale (Pan et al., 2012). La protection déclenché par la présence de *Wolbachia* est aussi observée contre des parasites eucaryotes et des bactéries (Kambris et al., 2009 ; Moreira et al., 2009 ; Hughes, 2011 ; Pan et al., 2012 ; Pinto et al., 2012 ; Rancès et al., 2012 ; Ye et al., 2013).

Tableau 3. Exemple de symbioses défensives déclenchées par des symbiotes protecteurs. Tableau tiré de Prigot-Maurice et al., 2022.

Host Taxa	Host species	Beneficial symbiont	Symbiont' state	Pathogens used	Route of infection	Increase of survival	Time post letal injection	Reference
Crustacean	*A. vulgare*	*Wolbachia wVulC*	Native	*S. enterica typhimurium*	Injection in haemolymph	50 to 80 %	7 days	Braquart-Varnier et al., 2015
				L. ivanovii		50 to 75 %	7 days	
	P. dilatatus	*Wolbachia wDil*	Native	*S. enterica typhimurium*		20%	7 days	
Dipterian	*A. aegypti*	*Wolbachia wMel*	Experimentally native	*E. carotovora*	Pricking or injection	25%	8 days	Ye et al., 2013
				S. enterica typhimurium		20%	2 days	
		Wolbachia wMelPop	Non-native, injected (or not)	*E. carotovora*		50%	7 days	
				B. cepacia		20%	6 days	
				S. enterica typhimurium		30%	3 days	
				M. marinum		40%	12 days	
	D. melanogaster	*Wolbachia wMelCS-like*	Experimentally native (remove with anti-	DCV (RNA virus)	Thoracic pricking	50%	10 days	Faria et al., 2018
	D. melanogaster	*Wolbachia*	Experimentaly native (remove with anti-	DCV (RNA virus)	Injection in haemolymph	60%	15 days	Teixeira et al., 2008
				Flock House virus (RNA virus)		70%	15 days	
				Iridovirus 6 (DNA virus)		-20%	40 days	
	A. aegypti	*Wolbachia*	Experimentaly native (remove with anti-	*E. cloacae*		20%	15 days	Pan et al., 2018
			biotics treatments)	*M. luteus*		25%	15 days	
				B. bassiana		20%	10 days	
	D. melanogaster	*Wolbachia wMelCS*	Experimentaly native (remove with anti-	DCV(RNA virus)	Injection in haemolymph	40%	8 days	Hedges et al., 2008
		Wolbachia wMelPop	biotics treatments)	DCV (RNA virus)	Injection in haemolymph	70%	8 days	
		Wolbachia wMelPop		CrPV (Cricket paralysis virus)	Injection in haemolymph	80%	8 days	
		Wolbachia wMelPop		FHV (Flock House virus)	Injection in haemolymph	100%	8 days	
	A. aegypti	*Wolbachia wMelPop*	Experimentaly native (remove with anti-	*E. carotovora*	Thoracic pricking	70%	4 days	Kambris et al., 2009
			biotics treatments)					
	A. aegypti	*Wolbachia wAlbB*	Experimentaly native (remove with anti-	DENV (virus)	Oral exposure	10%	26 days	Bian et al., 2010
			biotics treatments)					
Heteroptera	*R. pedestris*	*Burkholderia*	Non-native, injected (or not)	*E. coli*	Injection in haemolymph	30%	12 days	Kim et al., 2015
				S. aureus	Injection in haemolymph	40%	12 days	
Hemipteria	*A. pisum*	*R.insecticola*	Non-native, injected (or not)	*Pandora (Erynia) neoaphidis*	Injection in haemolymph	20 to 50 %	?	Scarborough et al., 2005
	A. mellifera	*S. alvi*	Non-native; injected (or not)	*S. marcenscens*	Oral exposure	45%	10 days	Horak et al., 2020

Néanmoins, puisque les hôtes symbiotiques peuvent être déjà « primés » par la présence permanente d'un symbiote, qu'en est-il de l'expression du priming immunitaire induit par une première rencontre avec un pathogène chez ces individus ? À ce jour, très peu d'études se sont intéressées à cette question (Rodrigues et al., 2010 ; Braak et al., 2013 ; Contreras-Garduño et al., 2016 ; Futo et al., 2016), alors que certaines d'entre elles ont montré que les symbiotes influencent le priming immunitaire issu de deux infections subséquentes par un pathogène (Rodrigues et al., 2010 ; Futo et al., 2016). Nous reviendrons sur ce sujet au sein du chapitre 4, mais pour éviter toute confusion dans ce manuscrit, nous devons distinguer :

(1) le priming immunitaire « pathogénique » qui correspond à un changement des capacités immunitaires lors d'une première exposition à une faible dose de pathogène vivant ou inactivé. La réponse immunitaire revient ensuite à la normale (réponse bimodale ou changement immunitaire) ou non (réponse immunitaire soutenue), et implique que le pathogène soit éliminé - ou non - entre les deux expositions. La protection mise en place peut être spécifique au pathogène rencontré, ou non.

(2) le priming immunitaire « symbiotique », qui lui est déclenché par la présence permanente d'un symbiote non pathogène. Ce symbiote provoque une modification soutenue des capacités immunitaires de l'hôte, le protégeant ainsi contre des pathogènes.

Quel que soit les types de priming immunitaire, leurs fonctionnements et les conséquences résultantes chez les organismes invertébrés relèvent certains intérêts, tant pour les recherches fondamentales que les recherches appliquées.

II.4 – Importance de l'étude du priming immunitaire

Depuis le début du 20ème siècle, les études sur la mémoire immunitaire innée s'accroissent de manière exponentielle (Fig. 9). Le nombre de publications incluant les mots clefs « innate », « immune » et « memory » sur la plateforme d'articles scientifiques PubMed en 2005 était d'une centaine, contre 3614 aujourd'hui (en date du 12.10.21 ; Fig. 9).

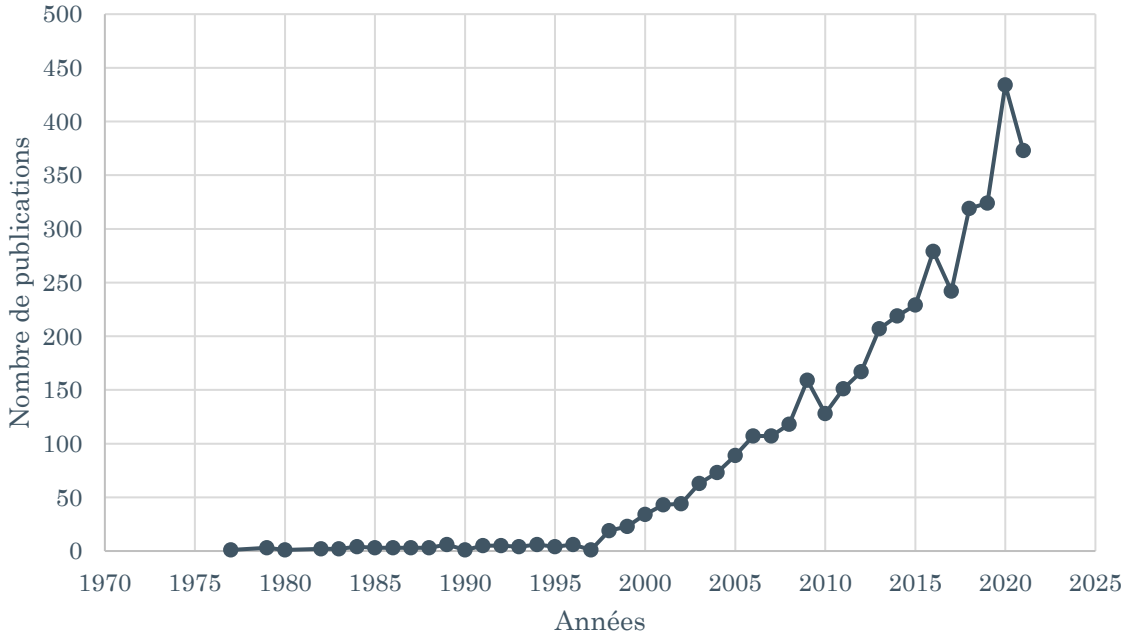


Figure 9. Nombre d'articles publiés sur la mémoire immunitaire innée, par année, de 1977 à 2021. Source des données : PubMed.

Les raisons pour lesquelles le priming immunitaire est un sujet de nouveau émergent en immunologie sont multiples. D'une part, le priming immunitaire complète les bases fondamentales sur lesquelles la vaccination a été fondée (Xing et al., 2020). Si une autre forme de mémoire immunitaire est possible *via* l'immunité innée, alors les mécanismes permettant la vaccination chez les Vertébrés ne sont peut-être pas exclusivement portés par l'immunité adaptative. D'après Xing et al. (2020), des recherches plus poussées sur la mémoire immunitaire innée permettraient d'améliorer l'efficacité des vaccins, puisque les mémoires immunitaires innée et adaptative n'ont ni les mêmes mécanismes, ni les mêmes spécificités, ni les mêmes durées de protection. Un vaccin stimulant ces deux types de mémoires immunitaires serait ainsi plus efficace pour diminuer l'apparition des maladies (Xing et al., 2020 ; Mourits et al., 2018 ; Bolk et al., 2015). Les vaccins à ARN interférence par exemple, qui consistent à injecter des gènes spécifiques des pathogènes ciblés, stimulent

à la fois la machinerie de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Leitner et al., 1999 ; Rowley & Pope, 2012). Des résultats très prometteurs de ce type de vaccin ont été obtenus chez les crevettes et les écrevisses contre leur ennemi naturel, le WSSV (Robalino et al., 2004 ; Kim et al., 2007 ; Mejía-Ruíz et al., 2011). Aussi, certaines maladies inflammatoires chroniques sont liées à un dysfonctionnement de l'immunité entrainée chez les Vertébrés (Mourits et al., 2018 ; Crisan et al., 2016). Comprendre les raisons pour lesquelles l'immunité entrainée se déclenche anormalement permettrait d'établir des soins appropriés aux patients concernés (Crisan et al., 2016).

L'étude des invertébrés pour des applications en santé humaine parait anodine au premier abord, mais puisqu'ils n'ont qu'une immunité innée, il est plus simple de s'affranchir de l'effet des lymphocytes lors des expérimentations. Les invertébrés sont d'ailleurs souvent utilisés en tant que modèles biologiques pour étudier les pathogènes de l'Homme (Sheehan et al., 2020). Ils servent à évaluer l'efficacité de nouveaux agents antimicrobiens (Sheehan et al., 2020). Sachant que le priming immunitaire est un processus influencé par les stimulations immunitaires précédentes, il est essentiel de connaître son fonctionnement et la manière dont il évolue, puisqu'il pourrait modifier les effets observés sur des infections répétées (Sheehan et al., 2020).

Qui dit « mémoire immunitaire » chez les invertébrés, dit « possibilité de les vacciner ». Ainsi, le développement de vaccins chez ces organismes peut avoir un impact considérable dans l'élevage d'espèces d'intérêt sur qui reposent des enjeux économiques importants pour l'industrie alimentaire. La vaccination de ces espèces diminue les pertes causées par les pathogènes, tout en évitant d'utiliser des antibiotiques ou des traitements chimiques (Chang et al., 2018). Par exemple, le priming immunitaire est étudié chez l'huître du pacifique (*Crassostrea gigas*) contre un virus de la famille des herpès (OsHV-1 ; Green & Montagnani, 2013 ; Lafont et al., 2017 ; 2020) ainsi que chez les crevettes et les écrevisses (Chang et al., 2018). À l'inverse, le priming immunitaire est un problème dans le domaine de l'agriculture, notamment pour l'utilisation de biopesticides. Les biopesticides sont des substances contenant des micro-organismes pathogènes vivants et/ou leurs produits dérivés, ayant pour but de diminuer les populations d'insectes ravageurs. Des études portées sur le charançon rouge des palmiers (*Rhynchophorus ferrugineus*) et la chenille légionnaire d'Afrique (*Spodoptera exempta*), ont montré que ces espèces sont dotés d'un priming immunitaire transgénérationnel (Shi et al., 2014 ; Wilson et al., 2021). Compte tenu du développement de résistances immunitaires au sein des générations suivantes, les chercheurs mettent en garde l'utilisation de certains pathogènes en tant qu'agent de contrôle.

Une dernière raison pour laquelle le priming immunitaire est de plus en plus étudié concerne les maladies à transmission vectorielle. Certains insectes hématophages comme les moustiques, les tiques, mais aussi des mollusques d'eau douce sont souvent porteurs de pathogènes transmissibles à l'Homme. Ces vecteurs de maladies posent de grands problèmes de santé publique. Le virus de la Dengue (transmis par les moustiques) à une incidence de 50 millions de cas en moyenne par an, dont des dizaines de milliers de morts (World Health Organization, 2009). *Plasmodium*, le parasite responsable de la Malaria, transmise à l'Homme également par les moustiques, a causé 409 000 morts en 2019 (World Malaria Report 2020). Du fait de cette mortalité, de nombreux traitements chimiques contre les moustiques, ainsi que des campagnes de vaccination pour l'Homme sont menés depuis des dizaines d'années. Cependant, des résistances génétiques évoluent progressivement chez ces vecteurs et les pathogènes qu'ils portent (Knobler et al., 2003). De nouvelles techniques non chimiques ont été développées pour lutter contre ces transmissions, dont l'utilisation de la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* (Walker et al., 2011 ; Pan et al. 2012 ; Moreira et al., 2009 ; Rancès et al., 2012 ; Ye et al., 2013). Cette bactérie peut induire une symbiose défensive, parfois même un priming immunitaire « symbiotique » lorsqu'elle est implantée dans un hôte non natif (*cf*. Introducion, partie II.2, et Prigot-Maurice et al., 2022). Ainsi, plusieurs pathogènes pour l'Homme dont le virus de la Dengue, du Chikungunya, Zika, ou encore *Plasmodium*, voient leurs densités diminuées au sein des vecteurs, même si l'influence de *Wolbachia* pourrait aussi être en partie due à une compétition microbienne au sein de l'hôte (Moreira et al., 2009 ; Hedges et al., 2008 ; Bourtzis et al., 2014 ; Chegeni & Fakhar, 2019).

Pour approfondir ces recherches appliquées, il est d'abord nécessaire de mieux comprendre, fondamentalement, le priming immunitaire. Pour le comprendre, nous devons inévitablement nous concentrer sur des espèces d'invertébrés qui l'expriment. Or, le priming immunitaire n'est pas observé chez toutes les espèces et même chez celles qui l'expriment, la protection est parfois dirigée contre un pathogène en particulier, mais pas contre d'autres (Braak et al., 2013 ; González-Tokman et al., 2010 ; Reber & Chapuisat, 2012 ; Longdon et al., 2013 ; Duneau et al., 2016 ; Patrnogic et al., 2018). Deux questions émergent alors de ces observations : quels sont les forces sélectives qui déterminent l'émergence du priming immunitaire ? et chez quelles espèces serait-il préférablement sélectionné ?

II.5 – Conditions d'évolution du priming immunitaire chez les invertébrés

Un processus biologique est sélectionné au cours de l'évolution s'il est variable, encodé génétiquement (ou épigénétiquement) et héritable (*i.e.* transmis aux générations suivantes ; Moret et al., 2019), ce qui est le cas du priming immunitaire (*cf.* Introduction, partie II.2). Ce processus est retrouvé chez une multitude d'espèces de genre différents (*cf.* Introduction, partie II.2). Ainsi, il est efficace et adaptatif au sens évolutif du terme (Prakash & Khan, 2022 ; Tidbury et al., 2012 ; Moret et al., 2019). Grâce à son effet anticipatoire similaire à une vaccination, le priming immunitaire réduit la prévalence des infections, les effets délétères des pathogènes à la seconde exposition ainsi que leur transmission au sein des populations (Tate & Rudolf, 2012 ; Tidbury, 2012 ; Tate, 2016 ; Luu & Tate, 2017). Cependant, pour qu'il soit sélectionné, les bénéfices à l'exprimer doivent être supérieurs aux coûts (Moret et al., 2019).

Même si la survie des individus est augmentée face à une seconde infection, le priming immunitaire est un processus généralement coûteux (Contreras-Garduño et al., 2014 ; Rosengaus et al., 2017 ; Shikano, et al., 2016 ; Khan et al., 2018 ; Dhinaut et al. 2018 ; Moret, 2003). La production d'effecteurs immunitaires demande de l'énergie et modifie le métabolisme des individus (Ferro et al., 2019 ; Maya-Maldonado et al., 2021). Dans la mesure où l'énergie d'un individu est limitée, le priming immunitaire peut déstabiliser les ressources attribuées aux autres fonctions physiologiques et avoir des impacts négatifs sur les traits d'histoire de vie des individus qui l'expriment. Chez le moustique *Anopheles albimanus* par exemple, les femelles primo-injectées avec *P. berghei* ont un taux d'éclosion plus faible que les femelles non-injectées et celles qui n'arrivent pas à éliminer totalement *P. berghei* après la seconde infection ne se reproduisent pas du tout (Contreras-Garduño et al., 2014). Les coûts associés au priming immunitaire sont parfois même répercutés sur les générations suivantes (Contreras-Garduño et al., 2014 ; Dhinaut et al., 2018 ; Zanchi et al., 2011). Le priming immunitaire sélectionné sur plusieurs générations de *T. castaneum* conduit à une diminution de la survie des descendants (Ferro et al., 2019 ; Prakash et al., 2022) et chez *T. molitor*, les descendants issus d'une mère primo-injectées ont une durée de développement plus longue que ceux issus de mères non-injectées (Zanchi et al., 2011).

Selon les théories, les coûts du priming immunitaire seraient compensés lorsque que les individus et leurs descendants sont fréquemment exposés aux mêmes pathogènes (Mayer et al., 2016 ; Prakash et al., 2022 ; Best et al., 2013 ; Moret et al., 2019). Une expérience

d'évolution expérimentale sur *T. castaneum* montre qu'une seule forte dose de *B. thuringiensis* injectée aux individus de chaque génération pendant 11 générations, génère la sélection d'un priming immunitaire spécifique à la même souche bactérienne (Khan et al., 2017). À l'inverse, lorsque les individus sont injectés avec une première dose de *B. thuringiensis* inactivés puis une seconde dose de bactéries vivantes, le priming immunitaire émergeant dans les générations suivantes est moins spécifique, mais accorde une plus grande résistance/tolérance en termes de survie (Khan et al., 2017). Aussi, la sélection du priming immunitaire serait d'autant plus forte que les pathogènes ont une virulence élevée. Chez *T. castaneum* par exemple, la sélection d'un priming immunitaire sur 14 générations se produit spécifiquement avec la souche la plus virulente de *B. thuringiensis* (Ferro et al., 2019) et les bénéfices tirés de l'expression d'un priming immunitaire sont plus importants dans les populations naturelles où les individus sont plus sensibles aux pathogènes (Khan et al., 2018). Si le priming immunitaire est sélectionné lorsque les individus ont de forte probabilité de rencontrer les mêmes pathogènes, alors il devrait préférentiellement émerger chez des espèces respectant certaines caractéristiques biologiques, à savoir :

(1) Une longue durée de vie.

Théoriquement, les individus qui vivent longtemps ont plus de chances d'être exposés plusieurs fois aux mêmes pathogènes comparés aux individus de courte durée de vie (Best et al., 2013 ; Moret et al., 2019 ; Pigeault et al., 2016 ; Little & Kraaijeveld, 2014). Ces derniers peuvent mourir avant même d'être exposés une seconde fois aux mêmes pathogènes (Best et al., 2013 ; Little & Kraaijeveld2014). Néanmoins, parmi les espèces « phares » chez qui le priming immunitaire est observé, les durées de vie sont très variables (Tab. 4).

Tableau 4. Durée de vie approximative totale en conditions expérimentales des espèces chez qui le priming immunitaire est souvent étudié.

Espèce	**Durée de vie**	**Référence**
Tribolium castaneum	18 à 36 mois	Sokoloff, 1972
Tenebrio molitor	4 à 24 mois	Cotton, 1927, Urs & Hopkins, 1973
Biomphalaria glabrata	9 à 18 mois	Toledo & Fried 2011
Galleria mellonella	4 semaines à 6 mois	Kumar & Khan, 2018
Drosophila melanogaster	1 à 2 mois	Helfand et al., 2003
Anopheles gambiae	15 à 30 jours	Towson, 1993
Caenorhabditis elegans	12 à 20 jours	Schaffitzel & Hertweck, 2006

Chez *C. elegans* ou *A. gambiae*, la courte longévité (comparée à celles des autres espèces, Tab. 4) va à l'encontre de cette première supposition théorique. Cependant, *C. elegans* est un bactérivore du sol, en contact permanent avec des milliers de microbes. *Aedes aegypti* exprime un priming immunitaire contre le virus de la Dengue et du Chikungunya (Vargas et al., 2020 ; Mondotte et al., 2020), avec qui il entre fréquemment en contact lors des prises alimentaires. Ainsi, il serait plus pertinent de prendre en compte la durée de vie relative au temps d'exposition (Little & Kraaijeveld, 2014), sachant que les risques de réinfections par les mêmes pathogènes sont d'autant plus importants que les individus vivent dans des environnements riches en pathogènes (Corby-Harris & Promislow, 2008).

(2) Un mode de vie grégaire ou social.

Les contacts réguliers entre les congénères augmentent les risques de transmission des pathogènes entre les individus (Wilson & Cotter, 2009). Les individus pourraient ainsi se « primer » entre eux par contact direct entre les individus ou *via* les déjections par exemple. Si les générations se chevauchent au sein d'un(e) même groupe/colonie, les descendants restent en contact avec les pathogènes auxquels les parents ont été exposés, ce qui favoriserait également la sélection d'un priming transgénérationnel (Moret et al., 2019 ; Pigeault et al., 2016 ; Little & Kraaijeveld, 2014).

(3) Des faibles capacités de dispersion.

Les pathogènes ont une dispersion limitée et sont généralement adaptés aux hôtes qu'ils rencontrent (Pigeault et al., 2016). Ainsi, les individus qui persistent dans les mêmes foyers de contamination seraient plus enclin à rencontrer les mêmes pathogènes au cours de leur vie (Pigeault et al., 2016 ; Moret et al., 2019) et donc de développer un priming immunitaire spécifique. À l'inverse, les chances de rencontrer les mêmes pathogènes dans des habitats différents sont moindres, favorisant alors la sélection d'un priming immunitaire non spécifique (Little & Kraaijeveld, 2014 ; Moret et al., 2019). Chez le criquet *Chorthippus biguttulus* par exemple, les individus placés dans un nouvel environnement ont une activité phagocytaire réduite comparés aux individus restant dans leur environnement initial, ce qui serait due à une plus faible fréquence d'exposition aux pathogènes locaux (Kurtz et al., 2002). De plus, une faible capacité de dispersion augmente la sélection du priming immunitaire transgénérationnel, puisque les descendants restent dans les mêmes niches écologiques où sont présents les pathogènes que leurs parents ont rencontrés (Pigeault et al., 2016).

Pour récapituler, le priming immunitaire est un processus coûteux, dont les bénéfices sont plus importants lorsque les individus sont sujets à des infections répétées durant leur vie. De ce fait, son émergence serait favorisée lorsque les individus ont une longue durée de vie et/ou sont fréquemment en contact avec des pathogènes, sont grégaires avec des générations chevauchantes et ont de faibles capacités de dispersion. Bien que ces conditions propices à l'émergence du priming immunitaire soient aujourd'hui largement acceptées, nous manquons encore de données empiriques pour les valider (Pigeault et al., 2016). Parmi les espèces d'invertébrés utilisées en recherche fondamentale, les isopodes terrestres portent toutes les caractéristiques pouvant favoriser l'émergence et le maintien d'un priming immunitaire.

III. LES ISOPODES TERRESTRES, UN MODÈLE APPROPRIÉ POUR L'ÉTUDE DU PRIMING IMMUNITAIRE

III.1 – Biologie en accord avec le priming immunitaire

Les isopodes terrestres, communément appelés cloportes, sont regroupés dans le sous-embranchement des Crustacés, sous-ordre des Oniscidés, qui comporte des espèces exclusivement terrestres. Les isopodes terrestres sont principalement étudiés pour comprendre la transition du milieu aquatique au milieu terrestre (*i.e.* terrestrialisation ; Alikhan, 1995 ; Devigne et al., 2011) ainsi que l'évolution des arthropodes (Glenner et al., 2006 ; Lukhtanov & Kuznetsova, 2010). Aujourd'hui, près de 4000 espèces sont décrites, réparties dans presque tous les écosystèmes terrestres, même désertiques (Sfendourakis & Taiti, 2015). Du fait de leur origine aquatique, les isopodes terrestres sont extrêmement sensibles à la dessiccation (Hornung, 2011). Ils ont ainsi développé de nombreuses adaptations écologiques, morphologiques, et comportementales leur permettant la conquête du milieu terrestre (Hornung, 2011 ; Broly et al., 2013 ; Thiel & Watling, 2015)

L'espèce la plus commune en Europe est le cloporte commun *A. vulgare* (Fig. 10). Comme la plupart des isopodes terrestres, il vit dans des sols humides, à l'abri de la lumière et de la chaleur. De régime alimentaire détritivore, il se nourrit principalement de matière végétale en décomposition (Zimmer, 2002). Son milieu de vie est donc naturellement très riche en termes de diversité et de quantité microbiennes, avec pas moins de 10^6 bactéries par

gramme de sol (Ranjard & Richaume, 2001 ; Torsvik et al., 1990). *A. vulgare* participe activement à l'enrichissement de cette densité microbienne grâce à ses déjections contenant un microbiote capable de dégrader les composants d'origine végétale (Zimmer, 2002 ; Bredon et al., 2018 ; Bredon et al., 2021). La présence de ces bactéries particulières serait d'ailleurs l'une des raisons expliquant la coprophagie chez ces organismes (Zimmer, 2002 ; Bredon et al., 2018 ; Bredon et al., 2021).

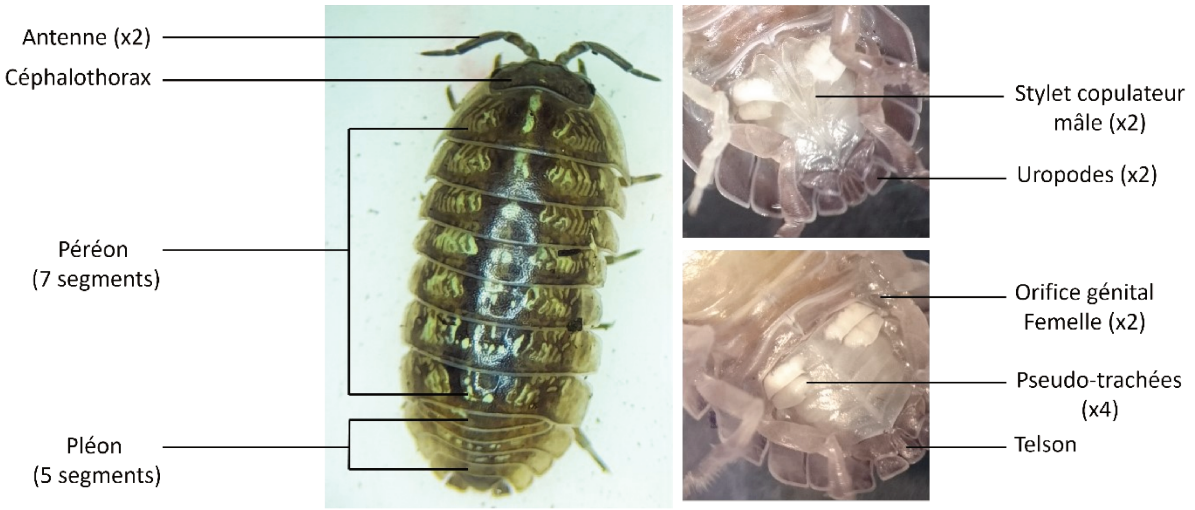


Figure 10. Anatomie générale et système reproducteur d'*A. vulgare*. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice

Face au problème de la dessiccation, les isopodes terrestres, dont *A. vulgare*, ont développé une cuticule relativement imperméable et acquis un instinct grégaire : ils vivent en groupe pouvant aller jusqu'à des milliers d'individus (Hornung, 2011 ; Broly et al., 2013). Ce comportement limite les déperditions en eau en créant un microclimat humide (Broly et al., 2013). La survie des individus dépend étroitement de l'agrégation avec les congénères et ce comportement favorise la rencontre des partenaires pour la reproduction (Broly et al., 2013). Au sein de ces groupes, il est très fréquent d'observer plusieurs générations. L'âge des individus se détermine généralement par leur taille (Lawlor, 1976). *A. vulgare* est un « indeterminate grower », c'est-à-dire qu'il grandit tout au long de sa vie, grâce à des mues successives survenant tous les deux à trois mois selon les conditions environnementales (Thiel & Watling, 2015 ; Brody et al., 1983 ; Depeux et al., 2020). Plus les individus sont vieux, plus ils ont effectué de mues et plus ils sont grands. Les nouveau-nés (aussi appelés mancas) ne mesurent pas plus d'1 mm, contre 2 à 3 cm pour certains adultes (Brody et al., 1983). Dans les populations naturelles d'*A. vulgare,* la majorité des individus vit jusqu'à 1

an, 13% survivent jusqu'à 2 ans et certains atteignent exceptionnellement l'âge de 3 ans (Paris & Pitelka, 1962 ; Warburg et al., 1984).

La grégarité et le chevauchement des générations chez *A. vulgare* vont de paire avec ses faibles capacités de dispersion, car elles sont étroitement liées aux degrés d'humidité dont ils ont besoin (Hornung, 2011 ; Broly et al., 2013). Les individus sont souvent restreints à rester dans les mêmes abris, où ils s'agrègent de manière stable dans le temps (Zimmer, 2004).

La distance de dispersion chez cet organisme est estimée à quelques centaines de mètres maximum (Den Boer, 1962 ; Paris, 1965). Pour des raisons reproductives, les mâles *A. vulgare* dispersent plus loin à la recherche des femelles, qui elles, ont tendance à rester en groupe lors de la période de reproduction, vers mars-avril jusqu'à septembre (Howard, 1980 ; Caubet et al., 2008 ; Broly et al., 2013 ; Durand et al., 2019).

Le système d'appariement principal chez *A. vulgare* est la promiscuité (*i.e.* un mâle féconde plusieurs femelles, qui peuvent être fécondées par plusieurs mâles ; Lefebvre, 2002 ; Valette et al., 2017). Les mâles sont dotés de deux stylets copulateurs et les femelles de deux orifices génitaux (Fig. 10). Après l'accouplement, les spermatozoïdes sont stockés dans les spermathèques des femelles. Les œufs produits dans les ovaires transitent dans les canaux où ils sont fécondés (Lefebvre, 2002). Les femelles peuvent aussi pondre des œufs non fécondés, nous parlons alors de « pontes blanches ». Les œufs sont ensuite déposés dans une poche ventrale développée lors la mue précédente : le marsupium (Lefebvre, 2002 ; Thiel, 2003 ; Appel et al., 2011). Le marsupium est lui aussi un vestige de leur origine aquatique : rempli de liquide protecteur, il apporte les nutriments nécessaires à l'embryogénèse des petits pendant la gestation (Thiel, 2003). Environ 1 mois après l'oviposition, les mancas sortent du marsupium, se nourrissent directement des ressources environnementales et effectuent leur première mue, ils deviennent alors des pullis. Ils se reproduisent à leur tour vers l'âge de 6 mois environ, à raison d'une, deux, et exceptionnellement trois portées par an pour les femelles (Lefebvre, 2002).

Bien que toutes ces caractéristiques biologiques soient associées à la conquête des milieux terrestres, elles sont aussi propices à l'émergence d'un priming immunitaire (*cf.* Introduction, partie II.5). Le soin maternel très poussé des femelles envers leurs descendants, semblable à la viviparité, semble être une caractéristique biologique favorable au priming immunitaire transgénérationnel (Roth et al., 2018). De la même manière qu'un placenta, le liquide marsupial permettrait le transfert de molécules et/ou de composés bactériens aux

descendants (Sadd & Schmid-Hempel, 2007 ; Zanchi et al., 2012 ; Freitak et al., 2014 ; Salmela et al., 2015), qui seraient ainsi eux-mêmes protégés contre les pathogènes rencontrés par la mère. Toutefois, pour étudier le priming immunitaire chez ces organismes, il parait d'abord important de rappeler brièvement les connaissances acquises sur son immunité.

III.2 – L'immunité des isopodes terrestres

Chez les isopodes terrestres, les hémocytes sont produits par les organes hématopoïétiques, divisés en six lobes sphériques répartis de chaque côté du vaisseau dorsal et du septum péricardique (Coutant, 1977 ; Braquart-Varnier et al., 2015a ; Chevalier et al., 2011). Les organes hématopoïétiques ont une zone centrale et une zone périphérique, permettant un gradient de maturation des hémocytes (Coutant, 1977 ; Chevalier et al., 2011). Ces derniers migrent progressivement vers la périphérie de l'organe où ils sont ensuite libérés dans la circulation générale par diapédèse (Chevalier et al., 2011). Chez les crustacés, les hémocytes portent à leur surface des PRRs (*cf.* Introduction, partie I.3) et assurent la plupart des activités immunitaires cellulaires et humorales (Chevalier et al., 2011 ; 2012 ; Johansson et al., 2000). La production d'hémocytes se fait tout au long de la vie de l'animal, mais surtout lors de stimulations immunitaires suivant une blessure, une infection ou encore la mue, afin d'assurer leur renouvellement et compenser la perte en cellules (Söderhäll, 2016).

Trois types d'hémocytes sont décrits chez *A. vulgare* : les hémocytes hyalins, semi-granulaires et granulaires (Fig. 11 ; Chevalier et al., 2011 ; Coutant, 1977). Les hémocytes hyalins ont un cytoplasme clair et un noyau important (Chevalier et al., 2011). Leur fonction principale est la phagocytose, comme chez la plupart des crustacés (Chevalier et al., 2011 ; Herbinière, 2005 ; Smith & Söderhäll, 1983 ; Söderhäll et al., 1986 ; Johansson et al., 2000). Les hémocytes granulaires et semi-granulaires quant à eux sont pourvus des granules intracytoplasmiques plus ou moins nombreuses et grossières (Fig. 11 ; Chevalier et al., 2011). Elles contiennent les précurseurs nécessaires à la réponse immunitaire humorale (Battistella et al., 1996 ; Chevalier et al., 2012 ; Johansson et al., 2000). Les hémocytes granulaires et semi-granulaires sont donc majoritairement impliqués dans les processus d'encapsulation, de coagulation et de mélanisation, même si les hémocytes semi-granulaires sont capables de phagocyter (Coutant, 1977 ; Chevalier et al., 2011).

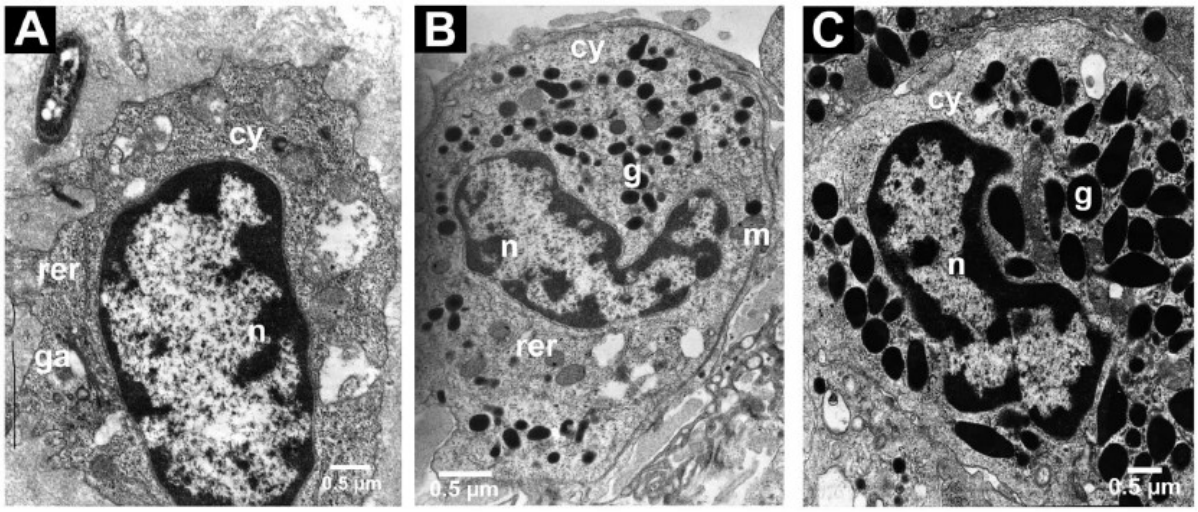


Figure 11. Hémocytes (A) hyalin, (B) semi-granulaire et (C) granulaire d'*A. vulgare*, observés en microscopie électronique à transmission. Photos tirées de Chevalier et al., 2011.

D'après Söderhäll et Cerenius (1992), les granules contiennent les précurseurs nécessaires à la cascade d'activation de la phénoloxydase. La phénoloxydase oxyde les composés de type phénol en quinone, formant spontanément la mélanisation (Söderhäll & Cerenius, 1992). La mélanisation se compose de molécules très réactives, permettant de cicatriser les blessures et inhiber la croissance bactérienne (Söderhäll & Cerenius, 1992). Elle est utilisée en tant qu'opsonine lors d'encapsulations (Söderhäll & Cerenius, 1992 ; Sugumaran, 2001 ; Cerenius et al., 2008). Une des particularités des isopodes est que l'hémocyanine, une protéine multimérique ayant pour fonction le transport de l'oxygène dans l'hémolymphe, semble assurer une fonction homologue à celle de la phénoloxydase (Jaenicke et al., 2009). Chez *A. vulgare*, le clivage de l'hémocyanine libère également des protéines antifongiques (Herbinière, 2005).

À l'intérieur des granules sont également stockés des peptides antimicrobiens (Becking et al., 2020 ; Herbinière et al., 2005). Chez les isopodes terrestres, 3 familles principales de peptides antimicrobiens sont actuellement décrites : les Crustines et les ALFs (pour Anti-Lipopolysaccharide Factors) et les Armadillidines qui leurs sont propres (Becking et al., 2020 ; Chevalier et al., 2012). Découverte en 2005 dans le laboratoire EBI, l'Armadillidine a été extraite pour la première fois des hémocytes d'*A. vulgare* (Herbinière et al., 2005 ; Verdon et al., 2016). Son activité antimicrobienne a un spectre d'action très large et fonctionne avec de très faibles doses, aussi bien sur des bactéries à gram (+) qu'à gram (–) (Verdon et al., 2016). Les granules des hémocytes contiennent probablement aussi

des ROS et des RNI, issus d'activités enzymatiques (Chevalier et al., 2012 ; Chung et al., 2012 ; Kankamol & Salaenoi, 2018 ; Dolar et al., 2020).

À ma connaissance, aucun article n'a été publié sur les mécanismes antiviraux des isopodes terrestres. Cependant, Chevalier et al. (2012) ont détecté la présence d'un système d'ARN interférence chez *A. vulgare via* une analyse transcriptomique. Aussi, nous savons qu'une infection par l'IIV-31 (pour Invertebrate IridoVirus 31, un virus spécifique aux isopodes terrestres) chez *P. scaber* diminue drastiquement le nombre d'hémocytes et leur viabilité, ainsi que la production de phénoloxydase et de RNI (Dolar et al., 2020). Chez les crustacés, il semble que la réponse antivirale soit en partie médiée par la voie Toll, mais aussi par d'autres processus/composants tels que l'apoptose, les ALFs, les cytokines ou encore l'hémocyanine (Liu et al., 2009 ; Sagi et al., 2013 ; Hauton, 2017 ; Sánchez-Paz & Muhlia-Almazán, 2020). Néanmoins, lorsque nous nous intéressons aux isopodes terrestres, nous ne pouvons faire l'impasse sur *Wolbachia.* Cette bactérie endosymbiotique influence en grande partie leur reproduction, leur physiologie et leur système immunitaire.

III.3 – La symbiose à *Wolbachia* et son impact sur l'immunité des isopodes terrestres

Wolbachia est responsable de la plus grande pandémie de l'histoire des invertébrés, puisqu'elle est présente chez près de 50 à 75% des espèces d'arthropodes connus, incluant les insectes, les acariens, les crustacés ainsi que certains nématodes (Werren & Windsor, 2000 ; Hilgenboecker et al., 2008 ; Werren et al., 2008). C'est une alpha proteobactérie à gram (-), intracellulaire obligatoire (*i.e.* vivant à l'intérieur des cellules de son hôte) proche du genre Rickettsia (O'Neill et al., 1992 ; Bourtzis & Miller, 2003). Au sein de son hôte, (incluant *A. vulgare) Wolbachia* colonise l'ensemble des tissus (*e.g.* muscles, chaîne nerveuse, glandes salivaires, hémolymphe, etc) et plus particulièrement les ovaires (Genty et al., 2014 ; Sicard et al., 2014). *Wolbachia* est majoritairement transmise verticalement (*i.e.* de la mère aux descendants ; Werren, 1995), même s'il est suggéré que des transferts horizontaux (*i.e.* entre des congénères) soient survenus au cours de l'évolution (Cordaux et al., 2012 ; Rigaud & Juchault, 1995 ; Sicard et al., 2014). Au-delà d'être ubiquiste, *Wolbachia* est surtout étudiée en tant que parasite de la reproduction (Stouthamer et al., 1999). Chez certaines espèces, elle provoque une incompatibilité cytoplasmique des gamètes, de la parthénogénèse, inhibe le développement des mâles (*i.e.* male killing) ou encore la féminisation des mâles génétiques en femelles phénotypiques fonctionnelles (Stouthamer et

al, 1999). Cependant, *Wolbachia* peut aussi être impliquée dans des relations mutualistes, où elle joue un rôle primordial dans la nutrition ou la reproduction par exemple (Dedeine et al., 2001 ; Taylor et al., 2005 ; Werren et al., 2008 ; Hosokawa et al., 2010 ; Landmann et al., 2012)

Wolbachia est très répandue dans les populations naturelles d'isopodes terrestres (Bouchon et al., 1998 ; Cordaux et al., 2012). D'après Bouchon et al. (1998), au moins 40 espèces hébergent *Wolbachia*, avec un pourcentage d'individus infectés par espèce variant de 11 à 100%. Chez *A. vulgare*, trois souches principales de *Wolbachia* sont retrouvées, *w*VulC et *w*VulM et *w*VulP (Cordaux et al., 2004 ; Verne et al., 2007) et induisent toutes trois une féminisation. En interagissant avec les circuits hormonaux, *Wolbachia* inhibe le développement de la glande androgène responsable du déterminisme du sexe mâle chez cette espèce (Herran et al., 2020 ; 2021). Par conséquent, le sex-ratio des populations symbiotiques est fréquemment déstabilisé vers une majorité de femelles (Martin et al., 1973 ; Juchault et al., 1992 ; Rigaud et al., 1991 ; 1977 ; 1999).

Wolbachia est un facteur important à prendre en compte pour étudier l'immunité des isopodes terrestres. Chez *A. vulgare*, *Wolbachia* est présente à l'intérieur des organes hématopoïétiques, et 40% des hémocytes circulants la contienne (Braquart-Varnier et al., 2015b ; Chevalier et al., 2011). De plus, *Wolbachia* modifie les capacités immunitaires d'*A. vulgare* (Fig.12 ; Braquart-Varnier et al., 2015b ; Chevalier et al., 2012 ; Pigeault et al., 2014 ; Sicard et al., 2010). Elle tend à diminuer l'immunocompétence des vieux individus *via* une réduction du nombre d'hémocytes et de l'activité phénoloxydase, ce qui engendre une septicémie naturelle plus importante chez les individus symbiotiques (Braquart-Varnier et al., 2008 ; Sicard et al., 2010).

A contrario, *Wolbachia* induit la surexpression des gènes de l'immunité dans les tissus immunitaires et protège *A. vulgare* contre certains pathogènes (Braquart-Varnier et al., 2015b ; Chevalier et al., 2012). Les individus symbiotiques infectés par *Listeria ivanovii* ou *Salmonella enterica* (deux bactéries pathogènes intracellulaires facultatives) ont une meilleure survie comparée à celle des individus asymbiotiques (Braquart-Varnier et al., 2015b). Ces deux bactéries pathogènes voient leurs charges diminuer au sein des hôtes lorsque *Wolbachia* est présente (Braquart-Varnier et al., 2015b). L'association *A. vulgare*/*Wolbachia* demeure ainsi un excellent modèle pour étudier l'influence d'un symbiote protecteur sur l'expression du priming immunitaire contre des pathogènes (Prigot-Maurice et al., 2021 ; Prigot-Maurice et al., 2022).

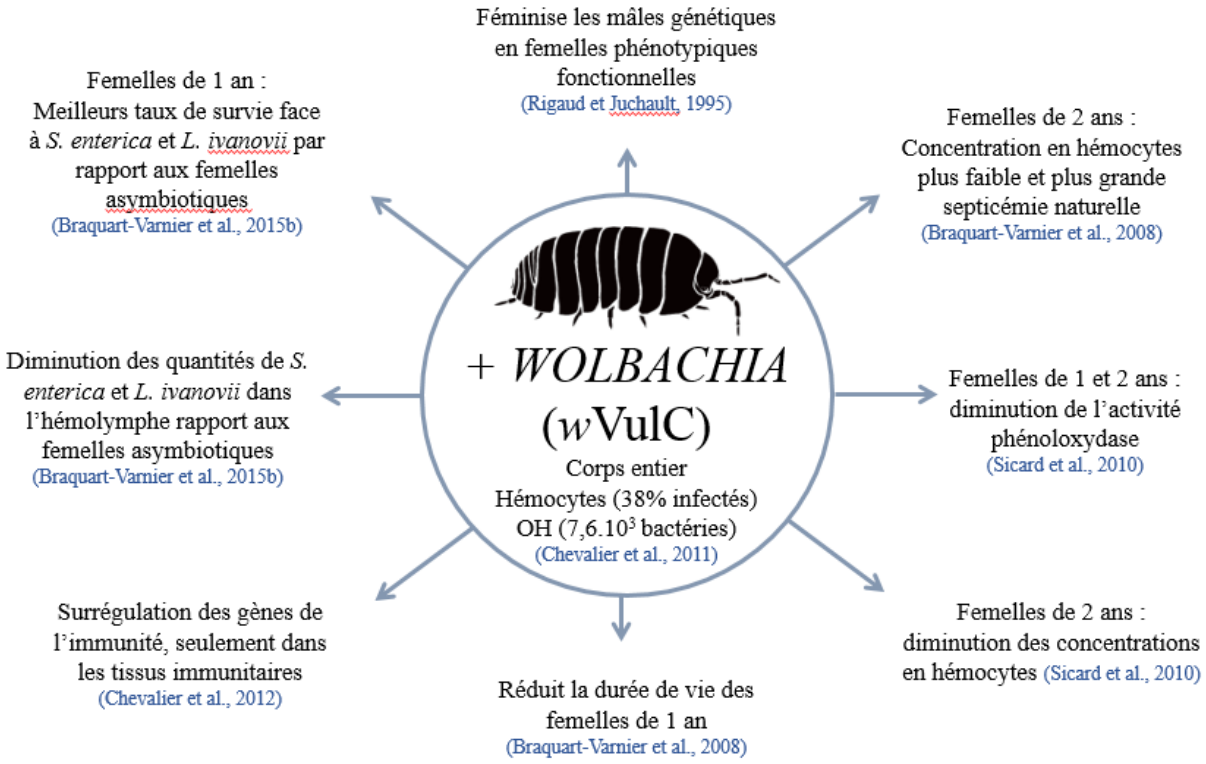


Figure 12. Synthèse des différents effets de *Wolbachia* (*w*VulC) sur le système immunitaire de son hôte natif, *A. vulgare*.

IV. PROJET DE THÈSE

C'est dans ce contexte générale que j'ai étudié, au cours de ma thèse, le phénomène de priming immunitaire chez *A. vulgare*. Lorsque j'ai commencé ce projet, une seule publication concernant le priming immunitaire des isopodes terrestres avait été publiée sur une espèce différente, *P. scaber* (Roth et al., 2009). Très peu de pathogènes d'isopodes terrestres sont décrits dans la littérature, et seulement 4 études avaient exploré le priming immunitaire induit par des pathogènes en présence ou absence de symbiotes protecteurs (Futo et al., 2016 ; Rodrigues et al., 2010 ; Contreras-Garduno et al., 2015, Braak et al., 2013). Mon travail de recherche s'est alors construit autour de plusieurs questions, que je développerai dans les chapitres suivants.

Chapitre 1 : *A. vulgare* est-il doté d'un priming immunitaire ?

(1) Contre *Salmonella enterica ?* une bactérie pathogène. (Article 1, Annexe 1)

(2) Quel est le coût reproductif de ces infections avec *S. enterica* ? (Article 2, Annexe 2)

Chapitre 2 : Quelles sont les modalités d'expression de ce priming immunitaire ?

(1) Avec des *S. enterica* inactivées, à différentes doses ?

(2) La protection observée est-elle liée à des changements de populations d'hémocytes ?

Chapitre 3 : Le priming immunitaire d'*A. vulgare* s'exprime-t-il contre d'autres pathogènes ?

(1) Est-ce que certaines bactéries commensales d'*A. vulgare* sont pathogènes ?

(2) Contre *Listeria ivanovii* ? une autre bactérie pathogène.

(3.1) Contre son ennemi naturel l'IIV-31 ?

(3.2) Est-ce que *Wolbachia* protège *A. vulgare* contre l'IIV-31 ?

Chapitre 4 : Le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica*, peut-il être impacté par certains facteurs intrinsèques ?

(1) Tels que l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia* ? (Article 3, Annexe 3)

(2) Pourquoi et comment les symbiotes protecteurs influencent le priming immunitaire pathogénique chez les invertébrés ? (Article 4)

CHAPITRE I

A. vulgare est-il doté d'un priming immunitaire ?



Photo : Œufs et juvéniles sortis du marsupium d'une femelle *A. vulgare* (1er prix du jury photo de l'ISTIB, 2021). Crédit : Cybèle Prigot-Maurice

Prologue

Dans ce chapitre, nous avons mis en place une série d'expériences visant à démontrer le priming immunitaire chez *A. vulgare.* Pour cela, nous avons d'abord procédé à l'observation du phénomène, en s'intéressant à l'amélioration de la survie des individus primo-injectés, ou non, face à une infection létale par la bactérie pathogène *Salmonella enterica*.

Compte tenu de la demande énergétique de ce processus, nous avons tenté de mesurer les coûts du priming immunitaire contre *S. enterica,* en étudiant la reproduction des femelles chez qui le priming immunitaire avait été déclenché (ou non, pour les groupes témoins). Nous avons ainsi analysé l'impact du priming immunitaire sur les capacités reproductives (*i.e.* nombre de portées, nombre de petits, délais de reproduction) ainsi que sur l'état de sénescence des femelles.



Photos : Gauche : Colonies de *S. enterica*, Droite : Injection d'*A. vulgare*. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice

I. VALIDATION DU PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE *S. ENTERICA*

[Partie entièrement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2019 ; Annexe 1]

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Alors que les isopodes terrestres présentent toutes les caractéristiques favorables à l'émergence d'un priming immunitaire, nous n'avons que très peu d'informations sur ce phénomène chez ces organismes. Le seul article portant sur le priming immunitaire d'un isopode terrestre (*Porcellio scaber*) est celui de Roth et al. en 2009. Dans cette expérience, les individus ont reçu deux injections homologues ou hétérologues de différentes bactéries inactivées (deux souches de *B. thuringiensis* ou *E. coli* avec un intervalle de 14 jours entre les injections), afin de tester le degré de spécificité d'un potentiel priming immunitaire. Puis, leurs capacités phagocytaires ont été comparées à celles d'individus non-injectés ou stimulés avec du Ringer stérile (*i.e.* solution physiologique ; Roth et al., 2009). Les auteurs montrent que les individus primo-injectés ont une meilleure phagocytose contre *B. thuringiensis* lors d'expositions homologues avec la même souche. Ces résultats suggèrent que le priming immunitaire médié par la phagocytose pourrait être spécifique. Bien que cette étude nous apporte des informations encourageantes, les auteurs n'ont pas utilisé de pathogènes vivants, et n'ont donc pas testé la protection (en termes de survie) de ce priming immunitaire contre une seconde infection létale.

En s'appuyant sur ces résultats, la première étape de cette thèse était de valider le phénomène de priming immunitaire chez une espèce d'isopode terrestre dont le système immunitaire est mieux connu : *A. vulgare* (*cf.* Introduction, partie III.2). Sachant que très peu de pathogènes naturels d'isopodes terrestres sont décrits (Federici, 1984), nous avons utilisé la bactérie *Salmonella enterica typhimurium* (notée *S. enterica* dans la suite du texte). Cette bactérie intracellulaire facultative naturellement présente dans les sols est pathogène de divers Arthropodes (Murray, 1991 ; Andino & Hanning, 2015 ; Aballay et al., 2000 ; Brandt et al., 2004) et sa virulence est démontrée chez *A. vulgare* (Braquart-Varnier et al., 2015b). Nous avons utilisé des femelles de 1 an (+/- 2 mois), maintenues sur du terreau humide, nourries avec des carottes fraîches et des feuilles de tilleul réhydratées. Ces femelles étaient vierges et provenaient de plusieurs croisements génétiquement contrôlés, afin d'exclure le coût de la reproduction et l'effet génétique sur les résultats obtenus. Cette étude fait l'objet d'un article scientifique publié en 2019 dans *Journal of Invertebrates Pathology* (Prigot-

Maurice et al., 2019). Les détails concernant la méthode, les effectifs, ainsi que les analyses statistiques sont disponibles dans la publication présentée en Annexe 1.

Le but de cette expérience était d'examiner si les femelles préalablement exposées à *S. enterica* présentent de meilleurs taux de survie après une seconde infection létale par cette même bactérie, comparées à des femelles non injectées ou injectées avec du LB-Broth stérile (*i.e.* milieu de culture des bactéries). Étant donné que la durée de protection entre les deux infections est peu caractérisée et souvent variable (Little & Kraaijeveld, 2004 ; Milutinović & Kurtz, 2016 ; Browne et al., 2015), nous avons utilisé trois intervalles de temps entre les infections : 1 jour, 7 jours ou 15 jours (Fig. 13). Pour chaque infection, nous avons directement injecté des *S. enterica* vivantes dans l'hémolymphe des femelles, à faible dose non létale pour la première injection et à forte dose létale (*i.e.* DL_{50}, dose tuant 50% des individus en 7 jours) pour la seconde injection. Alors que la plupart des études utilisent des pathogènes inactivés pour la première stimulation (Milutinović & Kurtz, 2016 ; Chang et al., 2018), nous avons fait ce choix afin de déclencher une réponse immunitaire plus proche de celle qui pourrait s'effectuer en conditions naturelles (*i.e.* avec des pathogènes vivants). De ce fait, nous avons contrôlé la persistance de *S. enterica* dans l'hémolymphe des individus juste avant la seconde infection.

Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la concentration en hémocytes circulants et à leur viabilité (*i.e.* pourcentage de cellules vivantes ; Fig. 13, 1st experiment), ces paramètres pouvant réfléter la production, ou la perte, en hémocytes selon l'infection. Chez les Crustacés, les hémocytes sont le support de la plupart des activités immunitaires (Söderhäll & Cerenius, 1992 ; Lee & Söderhäll, 2002 ; Chevalier et al., 2012) et sont suspectés d'améliorer leurs fonctions lors du priming immunitaire (Gourbal et al., 2018). Afin de comprendre le type de protection potentielle (*i.e.* réponse soutenue ou bimodale), nous avons prélevé les hémocytes juste avant la seconde infection sur un lot de femelles différentes de celles utilisées pour l'analyse de survie (Fig. 13).

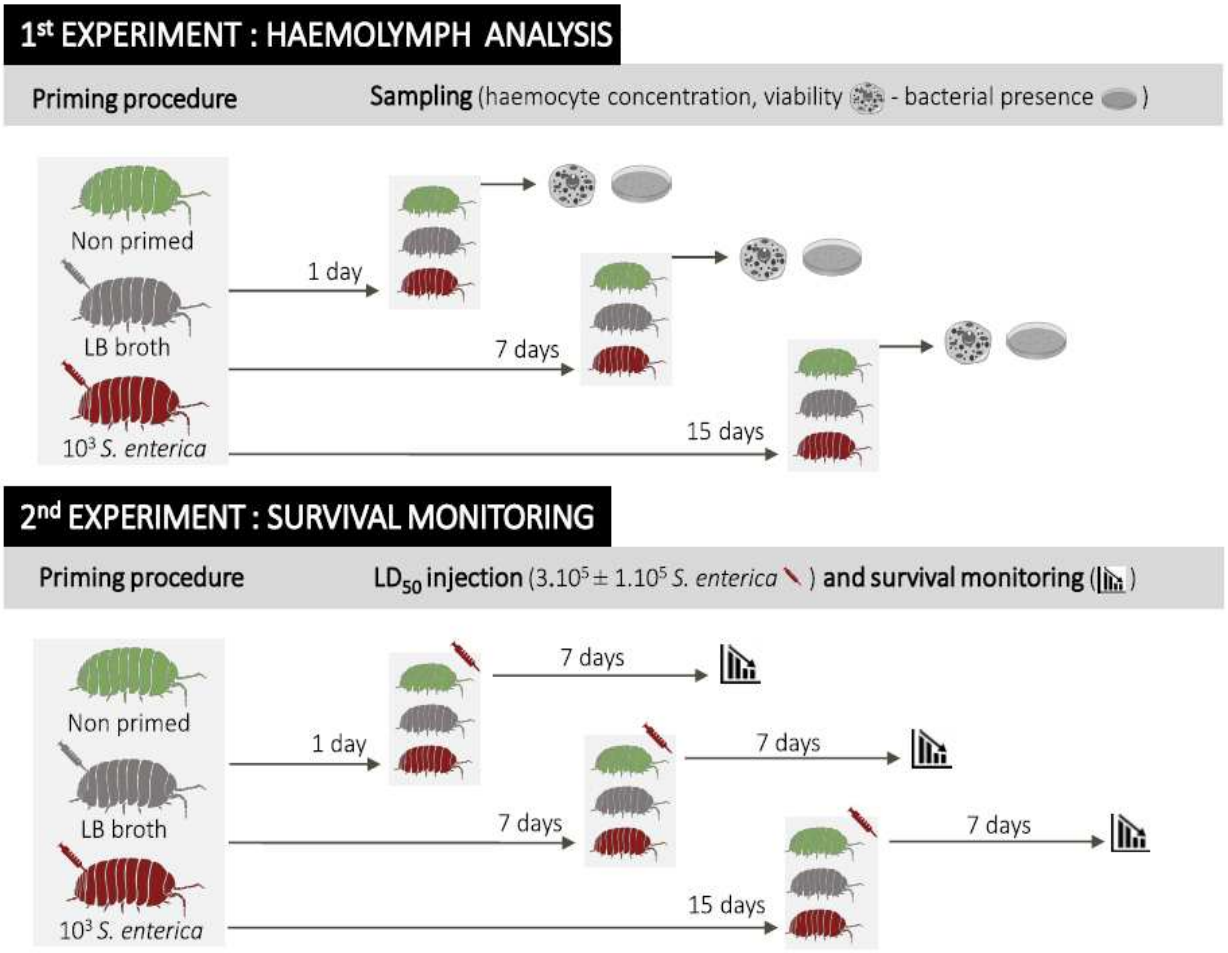


Figure 13. Schéma expérimental de l'expérience. Pour chacune des analyses (suivi d'hémocytes (1st experiment) et de survie (2nd experiment), 3 traitements ont été établis : des femelles primo-injectées avec *S. enterica*, du LB-broth stérile ou non-injectées. 1 jour, 7 jours ou 15 jours plus tard, nous avons soit (1) prélevé l'hémolymphe des femelles pour déterminer la concentration, la viabilité des hémocytes et la persistance de *S. enterica* dans l'hémolymphe ; soit (2) nous avons injecté une DL_{50} de *S. enterica* aux femelles et leur mortalité a été relevée tous les jours pendant 7 jours, afin de mesurer la survie. Schéma tiré de Prigot-Maurice et al., 2019.

I.2 – Résultats et discussion

Les femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont de meilleurs taux de survie face à la DL_{50} survenant 7 jours après la première infection, comparés aux femelles des traitements témoins (Fig. 14 ; Tab. 5 ; *cf.* Annexe 1). Il existe donc bien une capacité immunitaire de type « priming » chez les femelles *A. vulgare* contre *S. enterica.* Cependant, cette protection n'est pas observée pour les autres intervalles de temps (*i.e.* 1 jour et 15 jours ; Fig. 14 ; Tab. 5).

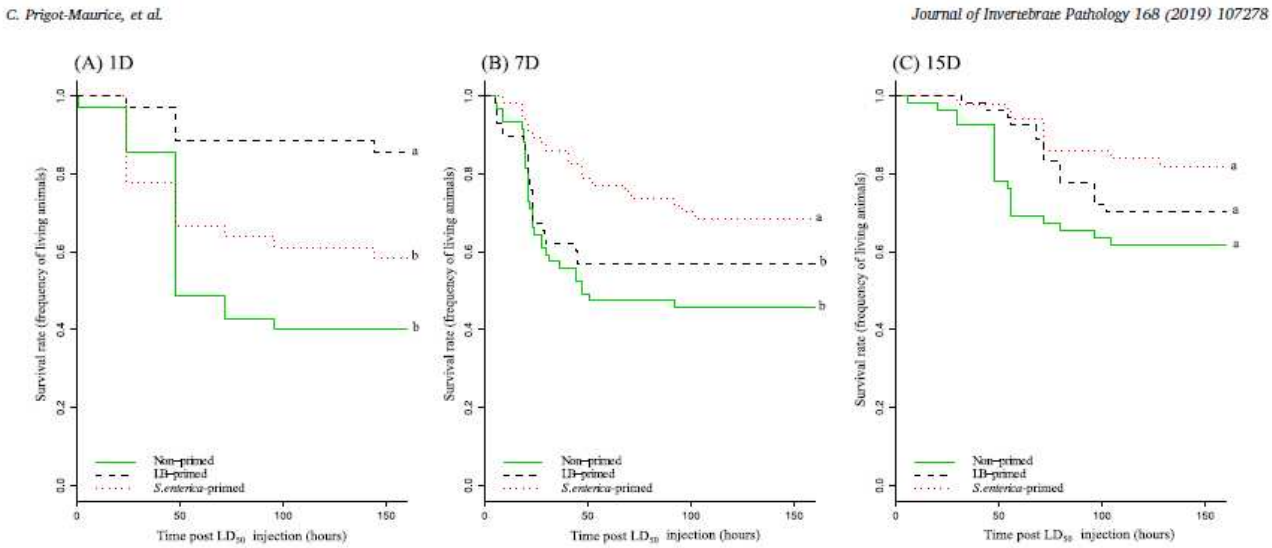


Figure 14. Taux de survie (%) des femelles *A. vulgare* suivant la DL_{50} survenant (A) 1 jour, (B) 7 jours ou (C) 15 jours après la première infection. Non-primed : non injectées ; LB-primed : primo-injectées avec du LB stérile ; *S. enterica*-primed : primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* pour 100 nL d'injection. Des lettres différentes indiquent des différences statistiques ($p<0.05$ selon un test de Tuckey). Figure tirée de Prigot-Maurice et al., 2019.

Tableau 5. Résultats statistiques des comparaisons de survie entre les différents traitements pour chaque intervalle de temps. Non-primed : non injectées ; LB-primed : primo-injectées avec du LB stérile ; *S. enterica*-primed : primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* pour 100 nL d'injection. Tableau tiré de Prigot-Maurice et al., 2019.

SURVIVAL RATE (frequency of living animals)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.412	0.324	0.411
S. enterica-primed/LB-primed	−1.103	0.450	**0.037***
LB-primed/Non-primed	1.515	0.435	**0.001****
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	1.208	0.296	**< 0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	1.030	0.316	**0.003****
LB-primed/Non-primed	0.178	0.274	0.792
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.858	0.413	0.095
S. enterica-primed/LB-primed	0.488	0.430	0.492
LB-primed/Non-primed	0.369	0.332	0.506

Values where $p \leq 0.05$ are given in bold. Stars indicate statistical differences between priming treatments with *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p \leq 0.001$.

Lorsque 1 jour sépare les deux infections, les femelles primo-injectées avec du LB ont de meilleurs taux de survie par rapport aux femelles primo-injectées avec *S. enterica* ou les femelles non injectées (Fig.14 ; Tab. 5). Nous supposons que la simple injection avec du LB génère une stimulation immunitaire, comme chez de nombreuses espèces de Crustacés (Cerenius & Söderhäll, 2011). Ainsi, lorsque la seconde dose de *S. enterica* est injectée dans l'hémolymphe des femelles 1 jour plus tard, le système immunitaire serait déjà prêt à combattre l'infection, augmentant ainsi la survie de ces femelles.

Bien qu'une blessure engendre souvent une perte en hémocytes chez les crustacés (Söderhäll et al., 2016), nous observons à l'inverse que les femelles injectées avec du LB ont une concentration en hémocytes similaire à celle des femelles non-injectées (Fig 15, Tab. 6). Il semblerait donc que le système immunitaire des femelles injectées avec du LB a probablement déjà compensé la perte en hémocytes. Les femelles primo-injectées avec *S. enterica*, en revanche, ont une concentration d'hémocytes circulants plus faible que celles des femelles ayant subi les autres traitements (Fig. 15, Tab. 6) et ont des taux de survie intermédiaires par rapport aux femelles primo-injectées avec du LB et aux femelles non-injectées.

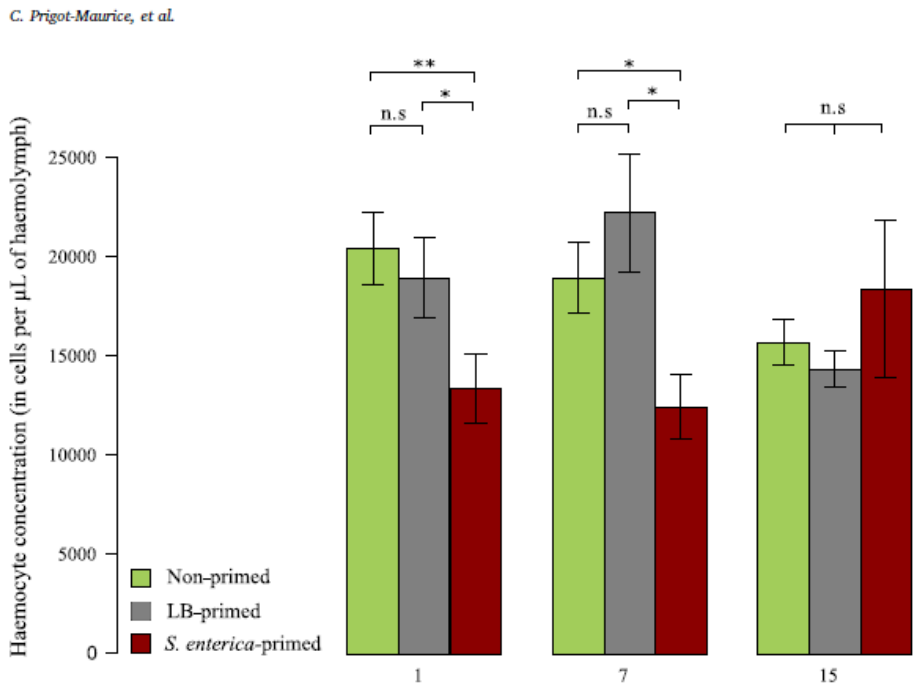


Figure 15. Concentration en hémocytes 1, 7 ou 15 jours après la première injection. Non-primed : non injectées ; LB-primed : primo-injectées avec du LB stérile ; *S. enterica*-primed : primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* pour 100 nL d'injection. Les étoiles indiquent des différences statistiques ($p<0.05$ selon un test de Tuckey). Figure tirée de Prigot-Maurice et al., 2019.

Tableau 6. Résultats statistiques des comparaisons du nombre d'hémocytes circulants et de la viabilité de ces hémocytes entre les traitements, pour chaque intervalle de temps. Tableau tiré de Prigot-Maurice et al., 2019.

HAEMOCYTE CONCENTRATION (number of cells per µL of haemolymph)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.600	0.188	**0.004****
S. enterica-primed/LB-primed	0.471	0.179	**0.023***
LB-primed/Non-primed	0.128	0.191	0.778
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.470	0.193	**0.043***
S. enterica-primed/LB-primed	0.515	0.196	**0.023***
LB-primed/Non-primed	−0.045	0.190	0.968
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.128	0.201	0.799
S. enterica-primed/LB-primed	0.053	0.215	0.966
LB-primed/Non-primed	0.075	0.192	0.919
HAEMOCYTE VIABILITY (frequency of living cells)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.269	0.056	**< 0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.177	0.054	**0.003****
LB-primed/Non-primed	−0.091	0.054	0.207
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.434	0.055	**< 0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.267	0.054	**< 0.001*****
LB-primed/Non-primed	−0.167	0.056	**0.008****
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.427	0.055	**< 0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.158	0.057	**0.016****
LB-primed/Non-primed	−0.269	0.057	**< 0.001*****

Values where $p \leq 0.05$ are given in bold. Stars indicate statistical differences between priming treatments with $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$.

Ces résultats ne paraissent pas étonnants, puisque ces femelles ont reçu une faible dose, puis une forte dose de *S. enterica* vivantes en peu de temps, d'autant plus que la quantité de *S. enterica* vivantes dans l'hémolymphe d'*A. vulgare* se multiplie par 400 en 24h (Braquart-Varnier et al., 2015b). Ainsi, il se pourrait que les femelles primo-injectées avec *S. enterica* n'aient pas assez de temps ou d'énergie pour compenser la perte en hémocytes face à l'importante quantité de *S. enterica* dans l'hémolymphe.

Les résultats observés à 1 jour post-injection pourraient être la conséquence de deux effets : un système immunitaire fraîchement stimulé chez les femelles primo-injectées au LB (*i.e.* « immune enhancement » ; Contreras-Garduño et al., 2016) et une déplétion trop importante chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica*. Pour corroborer avec Chang et al. (2018), cet intervalle de temps entre les deux infections est cependant trop court pour en déduire un quelconque priming immunitaire. Les effets pourraient être dus à une simple réponse immunitaire innée, durant laquelle les MAMPs du pathogène délivrés à la première infection saturent les récepteurs des hémocytes, ce qui nous empêche de distinguer un priming immunitaire d'une réponse immunitaire standard (Chang et al., 2018).

Lorsque 7 jours séparent les deux infections, les femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont toujours moins d'hémocytes que les femelles des autres traitements. Pourtant, à ce même intervalle de temps, elles ont de meilleurs taux de survie (Fig. 14 ; Tab. 5). Nous supposons que la stimulation immunitaire causée par l'injection de LB est revenue à la normale, et que la meilleure survie des femelles primo-injectées avec *S. enterica* pourrait être liée à un renouvellement des hémocytes. En effet, à tous les intervalles de temps, la viabilité des hémocytes des femelles primo-injectées avec *S. enterica* est plus élevée que celles des femelles qui ont subi les autres traitements (Fig. 16, Tab. 6). Cela pourrait refléter une activité hématopoïétique plus importante chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica*, libérant de nouveaux hémocytes dans la circulation générale. Cette hypothèse est notamment appuyée par les résultats observés à 15 jours post-injection : la viabilité des hémocytes est toujours plus élevée chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica*, mais leur concentration en hémocytes n'est plus différente par rapport à celle des femelles des autres traitements. Ce résultat montre que soit (1) le système immunitaire des femelles primo-injectées avec *S. enterica* compense la perte en hémocytes plus facilement (comparé à 1 jour ou 7 jours d'intervalle), soit (2) la perte en hémocytes est moins importante chez ces femelles (Fig. 16 ; Tab. 6).

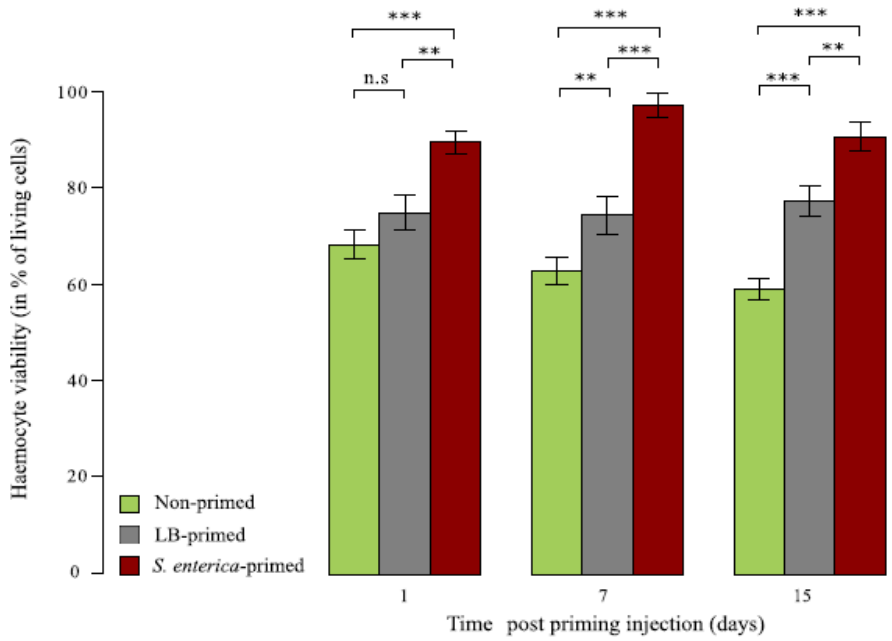


Figure 16. Viabilité des hémocytes 1, 7 ou 15 jours après la première injection. Non-primed : non injectées ; LB-primed : primo-injectées avec du LB stérile ; *S. enterica*-primed : primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* pour 100 nL d'injection. Les étoiles indiquent des différences statistiques ($p<0.05$ selon un test de Tuckey). Figure tirée de Prigot-Maurice et al., 2019.

L'effet protecteur du priming immunitaire disparaît lorsque 15 jours séparent les deux infections (Fig. 14, Tab. 5). Bien que les femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont des taux de survie environ 30% plus élevés que les femelles non-injectées, cette différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0.09$; Fig.14 ; Tab.5). Face à ce résultat, nous sommes confrontés soit à une impasse analytique liée au pouvoir statistique, soit à une réelle diminution de l'effet protecteur. Par ailleurs, il est important de noter que la survie des femelles non-injectées semble augmenter en fonction du temps écoulé entre la mise en condition expérimentale et l'injection de la DL_{50} (40% de survie à 1 jour, 45% à 7 jours et 60% à 15 jours post-injection). Ce biais expérimental pourrait s'expliquer par le stress nutritionnel des femelles durant l'expérience. En effet, les femelles n'ont pas été nourries entre les 2 infections. Ainsi, leurs capacités de tolérance/résistance face à la seconde infection pourraient être modifiées, réduisant ainsi l'écart de survie des différents traitements à 15 jours d'intervalle (Siva-Jothy & Thompson, 2002 ; Akoda et al., 2009 ; Ayres & Schneider, 2009 ; Ponton et al., 2013 ; Adamo, 2017). Chez la drosophile par exemple, une restriction alimentaire augmente la tolérance des individus face à une infection de *S. enterica* (Ayres & Schneider, 2009). Si ce phénomène est applicable à *A. vulgare*, alors il expliquerait l'augmentation progressive de survie des femelles non-injectées en fonction du temps, qui semble également avoir lieu chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica*.

Bien que nous n'ayons pas déterminé les réponses immunitaires associées au priming immunitaire à 7 jours (et potentiellement 15 jours) suivant la première infection, la viabilité des hémocytes toujours plus élevée chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica* indique que le mécanisme sous-jacent serait une réponse immunitaire soutenue (*cf.* Introduction, partie II.2). Cette hypothèse est d'autant plus probable que les *S. enterica* issues de la première injection sont toujours présentes dans l'hémolymphe des femelles 15 jours après l'injection (Prigot-Maurice et al., 2019). Alors que cette observation amène à s'interroger sur la validation du priming immunitaire, elle apporte une information importante : les femelles qui ont reçu une double dose de *S. enterica* vivantes sont capables de survivre aussi bien, même mieux, que les femelles qui n'ont reçu qu'une seule dose létale. Alors que les femelles devraient présenter des taux de mortalité élevée, une protection est mise en place sans nécessité l'élimination de *S. enterica*. Ces femelles sont donc capables de résister – ou de tolérer – une grande quantité de pathogène dans l'hémolymphe. Pour déterminer si leurs réponses immunitaires reposent sur une résistance ou une tolérance accrue de *S. enterica*, il serait envisageable de mesurer la quantité de *S. enterica* dans l'hémolymphe des femelles en fonction du temps, afin de voir si cette dernière diminue (*i.e.* résistance) ou reste stable (*i.e.*

tolérance ; Medzhitov et al., 2012). Étant donné que ces organismes vivent dans un environnement très riche en micro-organismes (*cf.* Introduction, partie II.1), il n'est pas surprenant que leur système immunitaire évolue vers des résistances/tolérances accrues face à des infections répétées et des charges bactériennes importantes.

Si la viabilité des hémocytes est associée à une plus grande production de ces derniers, la résistance/tolérance pourrait être due à des changement de proportions des différents types d'hémocytes (*cf.* Chapitre II, partie II). Chez le moustique *Anopheles gambiae* par exemple, le priming immunitaire est corrélé à une plus grande quantité d'hémocytes granulaires, mais la concentration totale en hémocytes est inchangée (Rodrigues et al., 2010). Aussi, les capacités des hémocytes pourraient être améliorées de manière soutenue dans le temps (*e.g.* phagocytose, production de peptides antimicrobiens ou activité phénoloxydase). Par conséquent, le système immunitaire d'*A. vulgare* resterait efficace malgré la persistance de *S. enterica* dans l'hémolymphe. La viabilité des hémocytes des femelles injectées avec du LB est également plus importante que celle des femelles non-injectées à 7 jours et 15 jours après la première injection (Fig. 16 ; Tab. 6). Ce résultat suggère que l'injection de LB stimule une réponse immunitaire, mais sans apporter de protection (en termes de survie) contre la seconde infection. Deux hypothèses expliqueraient ce résultat :

D'une part, même si le LB utilisé pour les injections est stérile, ce milieu de culture contient de l'extrait de levure, qui, une fois dans l'hémolymphe, pourrait déclencher un priming immunitaire (Bergin et al., 2006). Chez la guêpe *Polistes dominula*, une première injection de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) protège les individus contre une infection ultérieure d'*Escherichia coli* (Meriggi et al., 2019).

D'autre part, un priming immunitaire pourrait être induit par la perforation de la cuticule lors de l'injection de LB. Chez la drosophile, une simple blessure active de manière soutenue la voie Toll des hémocytes, qui produisent alors de nombreux ROS (Chakrabarti & Visweswariah, 2020). Cette reprogrammation cellulaire protège les individus contre une infection ultérieure d'*Enterococcus faecalis*, ce qui n'est pas le cas lorsque les voies signalétiques de production de ROS des hémocytes sont expérimentalement inhibées. D'après les auteurs, ces résultats démontrent qu'un priming immunitaire peut se déclencher *via* une reprogrammation génétique des hémocytes, sans même qu'ils ne soient préalablement en contact avec un pathogène (Chakrabarti & Visweswariah, 2020).

I.3 – Conclusion

Nos résultats confortent l'idée qu'un priming immunitaire chez *A. vulgare* contre *S. enterica* s'établit entre 1 jour et 7 jours, et tend à durer jusqu'à 15 jours, après la première infection. Cette durée de protection est en accord avec celles observées chez les crustacés aquatiques et l'isopode terrestre *P. scaber* (*i.e.* entre 1 et 30 jours ; Roth et al., 2009 ; Chang et al., 2018). La protection observée en termes de survie pourrait être médiée par une réponse immunitaire soutenue, en partie corrélée à une forte viabilité des hémocytes et la présence permanente de *S. enterica* dans l'hémolymphe (Fig. 17).

Compte tenu de ces informations, nous nous sommes alors interrogés sur les coûts reproductifs que pourrait engendrer la persistance d'une telle réponse immunitaire chez ces femelles *A. vulgare* de 1 an.

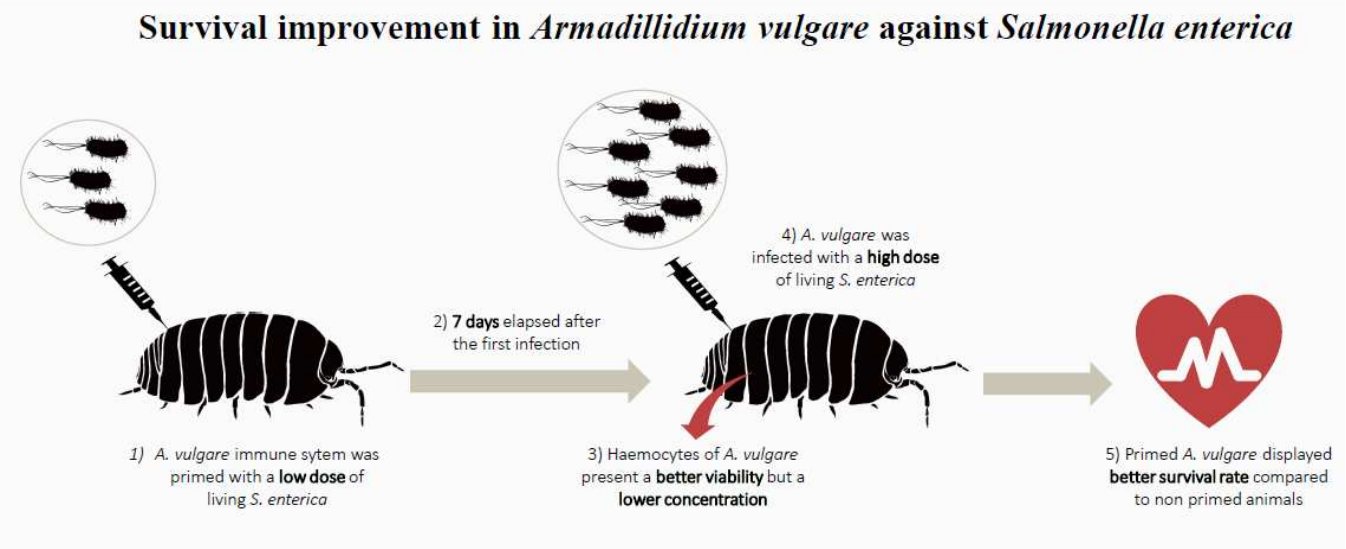


Figure 17. Synthèse des observations de la première expérience. Schéma tiré de Prigot-Maurice et al., 2019.

II. COÛT REPRODUCTIF DU PRIMING IMMUNITAIRE AVEC *S. ENTERICA*

[Partie entièrement valorisée dans Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021 ; soumis le 28.10.21 ; Annexe 2]

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

La mise en place et le maintien d'une réponse immunitaire est un processus coûteux (Sheldon & Verhulst, 1996 ; Lochmiller & Deerenberg, 2000 ; Zuk & Stoehr, 2002 ; Siva-Jothy et al., 2005 ; Schmid-Hempel, 2003 ; Moret & Schmid-Hempel 2000 ; Freitak et al., 2003 ; Ardia et al., 2012). Si nous considérons que l'énergie de chaque organisme est limitée, l'allocation des ressources pour l'immunité conduit à des compromis évolutifs entre les traits d'histoire de vie, tels que la croissance, la reproduction ou encore la longévité (Sheldon & Verhulst, 1996 ; Zuk & Stoehr, 2002). Par exemple, les femelles criquet *Locusta migratoria* infectées par *Micrococcus luteus* allouent leur énergie dans la réponse immunitaire et la survie au dépend de leur reproduction (Wang et al., 2019). Chez de nombreuses espèces d'invertébrés, l'effort immunitaire diminue les capacités reproductives des individus et vice versa (Schmid-Hempel, 2005). En plus de ce coût énergétique, les réponses immunitaires ont des répercutions physiologiques (Rolff & Siva-Jothy, 2003). Les produits de la phénoloxydase ou les ROS par exemple sont cytotoxiques pour l'hôte (Söderhäll & Cerenius, 1998) lorsque leurs quantités sont produites de manière systémique, altérant ainsi ses propres composants (*e.g.* cellulaires et tissulaires ; Sadd & Siva-Jothy, 2006).

Bien que le priming immunitaire apporte une meilleure survie des individus face à des infections répétées, il est inévitablement associé à certains coûts (Contreras-Garduño et al., 2014 ; 2019 ; Moret et al., 2019 ; Tate & Rudolf, 2012 ; Best et al. 2013 ; Tate, 2016). Ces derniers sont supposés être d'autant plus élevés que le priming immunitaire repose sur une réponse immunitaire soutenue (Moret, 2003). Chez le grillon *Gryllus campestris*, une première stimulation immunitaire à l'état larvaire déclenche une surrégulation de la réponse immunitaire jusqu'au stade adulte, ce qui augmente corrélativement le métabolisme des individus, et donc réduit l'énergie disponible pour assurer d'autres fonctions (Jacot et al., 2005). L'impact négatif du priming immunitaire sur l'effort reproductif est régulièrement décrit (Lopez, 1998 ; Contreras-Garduño et al., 2014 ; 2019 ; Khan et al., 2019 ; Dhinaut et al., 2018 ; Rosengaus et al., 2017 ; Shikano et al., 2016 ; Kelly, 2011). Par exemple, après une injection sub-létale, les femelles moustique *A. gambiae* primo-injectées avec *P. berghei* produisent des œufs dont le taux d'éclosion est plus faible que celui des femelles qui n'ont

pas été primo-injectées (Contreras-Garduño et al., 2014). Dans ce cas, il est supposé que les individus suivent une stratégie favorisant le maintien somatique (*i.e.* leur survie au sens large), au dépend de leur reproduction (Luu & Tate, 2017). À l'inverse, une stimulation immunitaire peut conduire à une stratégie d'investissement terminal, c'est-à-dire que les individus augmentent l'effort reproductif, et donc l'investissement énergétique dans la reproduction, face à leurs faibles chances de survie (Clutton-Brock, 1984 ; Adamo, 1999 ; Luu & Tate, 2017 ; Duffield et al., 2017). Chez *T. molitor*, les femelles primo-injectées avec *A. globiformis* ou *B. thuringiensis* produisent autant d'œufs, mais avec un succès d'éclosion plus important, que les femelles contrôles (Dhinaut et al., 2018). Certains individus maximisent donc parfois leurs chances de reproduction suivant une infection, au dépend du maintien somatique (Luu & Tate, 2017 ; Duffield et al., 2017 ; González-Tokman et al., 2013). L'investissement terminal peut aussi être déclenché par la sénescence (*i.e.* le vieillissement ; Comfort, 1964). Les individus veillissants présentent un déclin général des fonctions biologiques (incluant l'immunité) *via* une détérioration somatique et une durée de vie réduite. De ce fait, les faibles chances de survie liées à la senescence naturelle, ou expérimentalement avancée par un stress physiologique par exemple, peuvent conduire à un investissement terminal dans la reproduction (Cooper, 1994 ; Duffield et al., 2017 ; 2018).

Parfois, l'exposition répétée à des pathogènes n'influence pas la reproduction des individus, que ce soit au sein de la même ou différentes générations (Prakash et al., 2022 ; Gupta et al., 2016 ; Faria et al., 2015 ; Kutzer et al., 2019), montrant que la reproduction n'est pas toujours influencée par une résistance immunitaire accrue. La plupart des études empiriques qui ont étudié l'influence du priming immunitaire sur la reproduction des femelles ont mesuré les capacités reproductives après la première infection ou dans la génération suivante (Rosengaus et al., 2017 ; Dhinaut et al., 2018 ; Zanchi et al., 2011 ; Trauer & Hilker, 2013 ; Mcnamara et al., 2014). Bien que ces résultats indiquent certains compromis évolutifs résultant d'une première stimulation immunitaire, nous manquons de données sur le coût reproductif des femelles qui ont survécu à deux infections successives de pathogènes vivants (Contreras-Garduño et al., 2014 ; Prakash et al., 2022 ; Khan et al., 2019 ; Kutzer et al., 2019).

Chez les femelles *A. vulgare*, un priming immunitaire s'établit entre deux infections de *S. enterica* vivantes survenant à 7 jours d'intervalle (*cf.* Chapitre I, partie I). Les hémocytes des femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont une viabilité plus élevée que celles des femelles contrôles, et ce, de manière soutenue dans le temps (Prigot-Maurice et al., 2019). Nous avons également observé que *S. enterica* n'est pas totalement éliminée de

l'hémolymphe des femelles entre les deux infections. Ces dernières subissent alors probablement plus de dommages cellulaires et tissulaires que les femelles qui n'ont reçu qu'une seule infection. Ainsi, nous supposons que ce priming immunitaire, plus précisément cette double infection de *S. enterica*, devrait être très coûteux en énergie pour les femelles qui l'exprime.

Par ailleurs, les femelles *A. vulgare* développent un marsupium dans lequel leurs œufs incubent durant toute la durée de l'embryogénèse (Fig. 18 ; *cf.* Introduction, partie III.1). Ce soin maternel requiert lui aussi une certaine énergie et jouerait un rôle clef dans les stratégies d'histoire de vie des femelles, puisque sa production demande une allocation directe des ressources dans la reproduction (Warburg, 2011 ; Thiel, 2000 ; Antol & Czarnoleski, 2018).

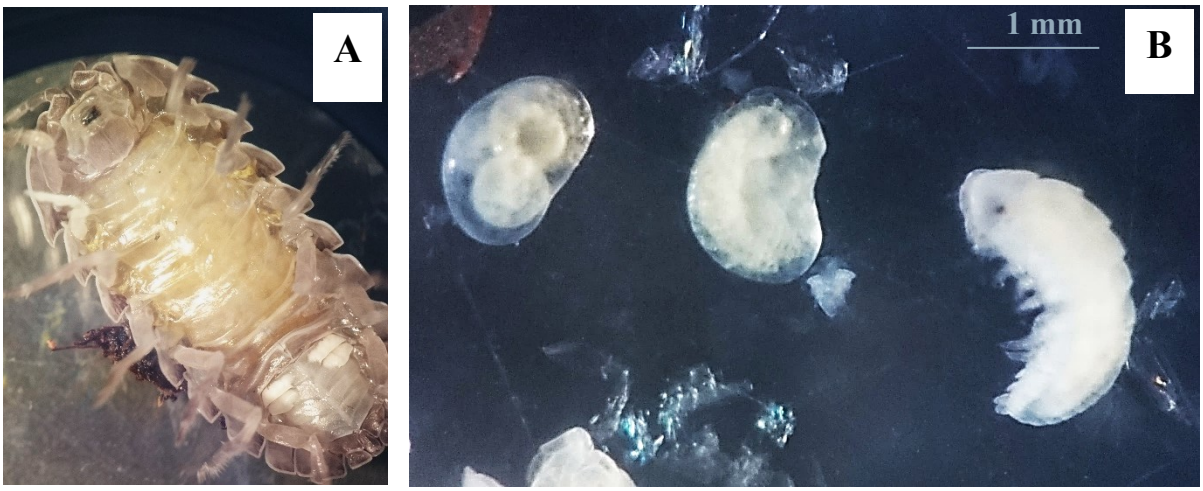


Figure 18. (A) Femelle *A. vulgare* avec un marsupium contenant des petits. (B) Stade de développement de pulli d'*A. vulgare* (sortis du marsupium). Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice

A. vulgare est une espèce ayant la particularité de grandir tout au long de sa vie (*i.e.* « indeterminate grower »). La fécondité des femelles est positivement corrélée à leurs masses/tailles (Lawlor, 1976 ; Durand et al., 2018) et les femelles peuvent produire une seule ou bien deux portées selon différentes stratégies d'investissement (Dangerfield & Hassall, 1992 ; Dangerfield & Telford, 1995 ; Lawlor, 1976). Ces différentes caractéristiques biologiques liées à la reproduction et à la croissance font d'*A. vulgare* un modèle idéal pour étudier les compromis évolutifs entre le maintien somatique (incluant la survie, la croissance et l'élimination des pathogènes) et la reproduction. Autre élément intéressant, Depeux et al. (2020a) ont récemment identifié plusieurs marqueurs de sénescence chez cette espèce. Grâce à ces marqueurs, nous pouvons déterminer, à un âge constant, l'état de sénescence des individus. En d'autres termes, nous pouvons mesurer si les individus vieillissent

prématurément par rapport à d'autres selon les conditions expérimentales (*e.g.* le stress d'infection) auxquelles ils ont été confrontés. De ce fait, nous nous sommes demandé (1) quel est l'impact du priming immunitaire sur les capacités reproductives des femelles qui ont survécu à une double infection par *S. enterica* (*i.e.* exprimant un priming immunitaire) et (2) quelle est l'influence du priming immunitaire et de la reproduction sur la sénescence de ces femelles.

Pour répondre à ces questions, nous avons conservé trois séries de femelles issues de la première expérience (*cf*. Chapitre I, partie I) contenant : des femelles primo-injectées avec une faible dose de *S. enterica* vivantes (traitement SAP, pour *Salmonella*-Primed), des femelles primo-injectées avec du LB stérile (traitement LBP, pour LB-Primed) et des femelles non primo-injectées (traitement NP, pour Non-Primed). L'utilisation de femelles primo-injectées avec du LB permet de distinguer l'effet de l'infection persistante de *S. enterica* d'une primo-stimulation sans pathogène (Moret, 2003). Toutes ces femelles (SAP, LBP, NP) ont ensuite reçu une DL_{50} de *S. enterica* 7 jours plus tard, et leurs survies ont été relevées quotidiennement pendant 22 jours. Nous avons ajouté un groupe de femelles contrôles qui n'ont jamais reçues d'injection, mais maintenues dans les mêmes conditions expérimentales que les autres traitements (traitement NI, pour Non-Injectées ; Fig. 19).

D'après Zanchi et al. (2019), le poids des individus est un marqueur pertinent pour étudier l'effet des réserves absolues sur la fécondité. De plus, les réponses immunitaires peuvent diminuer la croissance et/ou le poids des individus chez les invertébrés (Moret, 2006 ; Bascuñán-García et al., 2010 ; Kelly, 2011). Chez *A. vulgare*, la fécondité des femelles est positivement corrélée à leur taille, elle-même liée au poids (Antol & Czarnoleski, 2018 ; Sutton et al., 1983 ; Durand et al., 2018). Nous avons alors pesé les femelles qui ont survécu à la seconde infection, puis nous les avons placées individuellement en reproduction avec un mâle vierge d'un an, non injecté (Fig. 19). Les femelles ont été suivies individuellement tous les 3 jours pendant environ 8 mois. Nous avons ensuite comparé entre les traitements : la probabilité d'effectuer une ou deux portées, les délais pour obtenir ces portées ainsi que le nombre de petits de chaque portée (Fig. 19). Après la deuxième portée, nous avons exploré l'effet du priming immunitaire et de la reproduction sur l'état de senescence des femelles en utilisant les marqueurs à notre disposition (*i.e.* l'activité β-galactosidase et la taille des hémocytes vivants ; Depeux et al., 2020a). Puisque la reproduction affecte négativement le système immunitaire des individus (Lawniczak et al., 2007), nous avons aussi mesuré la concentration totale et la viabilité des hémocytes à la fin de l'expérience (Fig. 19).

Cette étude fait l'objet d'un article scientifique rédigé avec Charlotte Depeux et soumis le 28 octobre 2021 dans le journal *Zookeys*. Cet article fait suite à une invitation du comité d'organisation du 11ème International Symposium on Terrestrial Isopod Biology (ISTIB). Pour tous détails complémentaires concernant la méthode, les effectifs et les analyses statistiques, la première version déposée de l'article est disponible en Annexe 2 (sans aucunes révisions à ce jour en vue de l'acceptation par le journal)

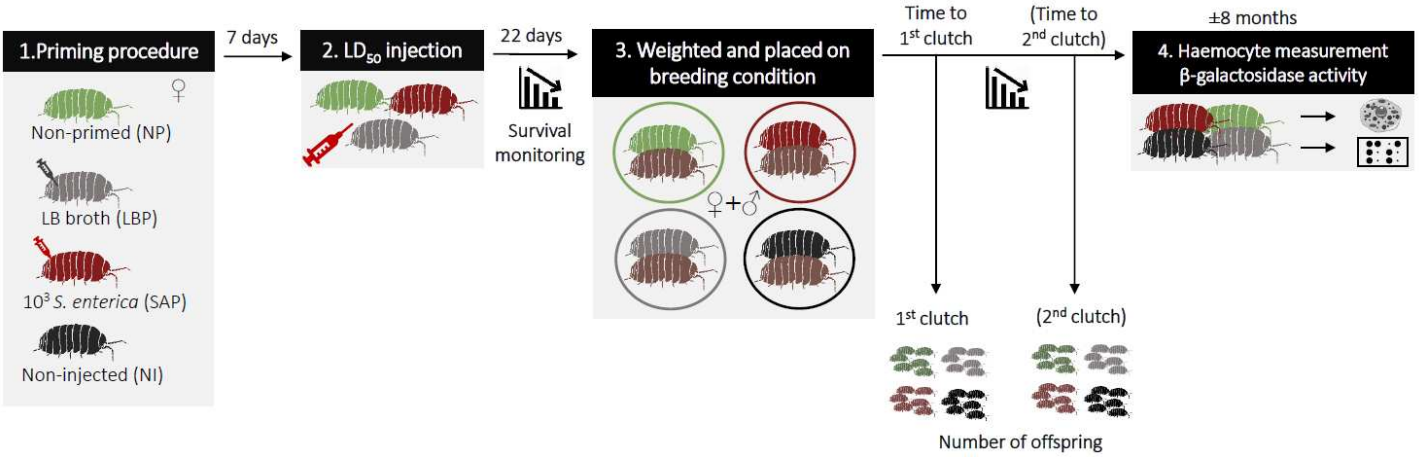


Figure 19. Schéma de l'expérience. (1) Les femelles ont d'abord reçu une primo-injection soit de LB stérile ou de *S. enterica* vivantes à faible dose. Les femelles ont été maintenues individuellement sans nourriture durant 7 jours. (2) Toutes les femelles ont ensuite reçu une DL_{50} de *S. enterica*, excepté les non-injectées (NI). La survie des femelles a été relevée durant 22 jours, puis (3) les femelles ont été pesées avant d'être placées individuellement en reproduction avec un mâle vierge non-injecté (cloporte marron). Le temps nécessaire pour produire les portées, le nombre de portées ainsi que le nombre de petits dans chaque portée ont été mesurés. (4) Au bout d'environ 8 mois, nous avons prélevé l'hémolymphe des femelles et disséqué leur chaîne nerveuse afin de quantifier la concentration, la viabilité et la taille des hémocytes, ainsi que l'activité b-galactosidase. Schéma tiré de l'article, Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021 (en soumission, Annexe 2).

II.2 – Résultats et discussion

II.2.a – Survie des femelles et variation de poids

Vingt-deux jours suivant l'injection de la DL_{50}, les femelles primo-injectées avec *S. enterica* (SAP) ou du LB (LBP) ont tendance à mieux survivre que les femelles qui n'ont pas reçu de primo-injection (NP ; p = 0.06, Fig. 20.A ; Annexe 2). Les femelles SAP et LBP ont des taux de survie d'environ 80%, contre 60% pour les femelles NP, démontrant le priming immunitaire précédemment observé (*cf.* Chapitre I, partie I ; Prigot-Maurice et al., 2019 ; 2021).

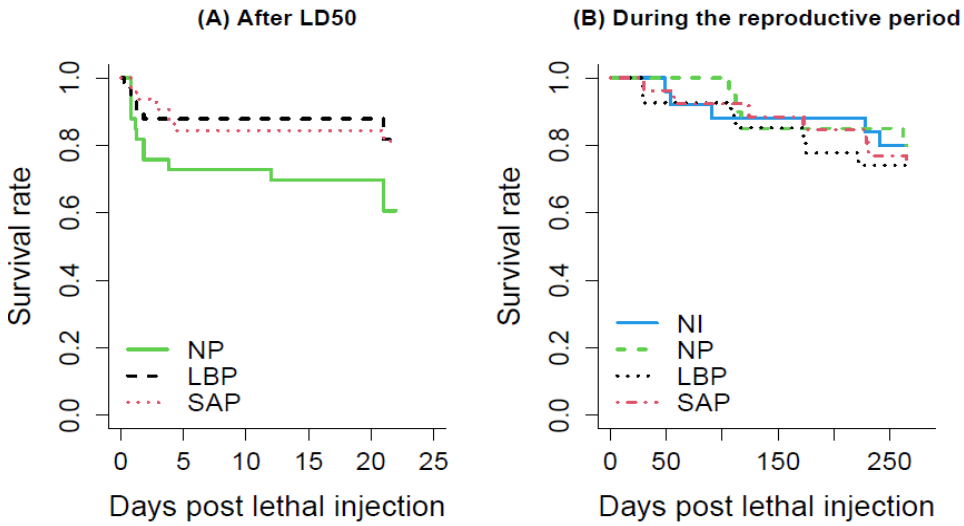


Figure 20. Taux de survie des femelles **(A)** 22 jours après la DL_{50} ou **(B)** durant la période de reproduction. Non-primed : femelles n'ayant pas reçues de primo-injection (NP) ; LB-primed : femelles primo-injectées avec du LB (LBP) ; *S. enterica*-primed : femelles primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* vivantes. Non-injected : femelles n'ayant jamais été injectées (NI). Tiré de Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021 (Annexe 2).

Avant la mise en reproduction, nous observons que le traitement reçu par les femelles influence leur poids (p = 0.04, *cf.* Annexe 2). Les femelles NP et SAP qui ont survécu à la DL_{50} ont tendance à être plus légères (poids moyen ± se : 0.12g ± 0.01 et 0.12g ± 0.007, respectivement) que les femelles NI qui n'ont jamais reçu d'injection (poids moyen ± se : 0.15g ± 0.008 ; *cf.* Annexe 2).

Suivant une infection, les ressources énergétiques sont souvent redirigées dans les réponses immunitaires *via* l'inhibition du stockage des nutriments et la libération de composés en provenance des tissus adipeux (Rauw, 2012 ; Lochmiller & Deerenberg, 2000). Chez *D. melanogaster* par exemple, l'activation de la voie Toll réduit les stocks de nutriments et par conséquent, la croissance des individus (DiAngelo et al., 2009). De ce fait, le plus faible poids observé chez les femelles SAP et NI pourrait s'expliquer par l'utilisation des réserves énergétiques dans les réponses immunitaires contre *S. enterica*, au dépend de la croissance. Du fait que les femelles NP et SAP ont un poids moyen similaire, nos résultats suggèrent qu'une simple ou une double infection de *S. enterica* vivantes demande une énergie similaire. Alors que plusieurs études montrent que les individus injectés avec une solution immunostimulante sans pathogènes deviennent plus légers (*T. molitor*, Moret et al., 2006 ; *H. crassidens*, Kelly, 2011), nous n'observons pas de différence de poids entre les femelles LBP et les femelles NI.

Même si les femelles qui ont reçu une simple ou double injection de *S. enterica* ont tendance à être plus légères que les NI, les femelles ne présentent pas de différence de survie selon leurs traitements durant la période de reproduction (environ 8 mois après la DL_{50} ; Fig. 20.B). Ce résultat suggère que la reproduction, alors qu'elle demande une certaine énergie, n'influence pas différentiellement la mortalité des femelles selon le traitement qu'elles ont subi.

II.2.b – Influence du traitement et du poids sur le premier évènement de reproduction

Indépendamment du traitement, la plupart des femelles ont produit une 1ère portée (SAP : 23/24, LBP : 20/22, NP : 22/22, NI : 21/22). D'après nos analyses statistiques, ni le traitement, ni le poids, ni leur interaction, n'influencent la probabilité de produire cette 1ère portée (*cf.* Annexe 2). En revanche, le temps nécessaire pour produire la première portée dépend du poids des femelles en interaction avec leurs traitements (*cf.* Annexe 2). Les femelles NI les plus légères mettent plus de temps à produire la 1ère portée (environ 200 jours), comparés aux femelles NI les plus lourdes (environ 50 jours ; $p = 0.04$; Annexe 2 ; Fig. 21.A).

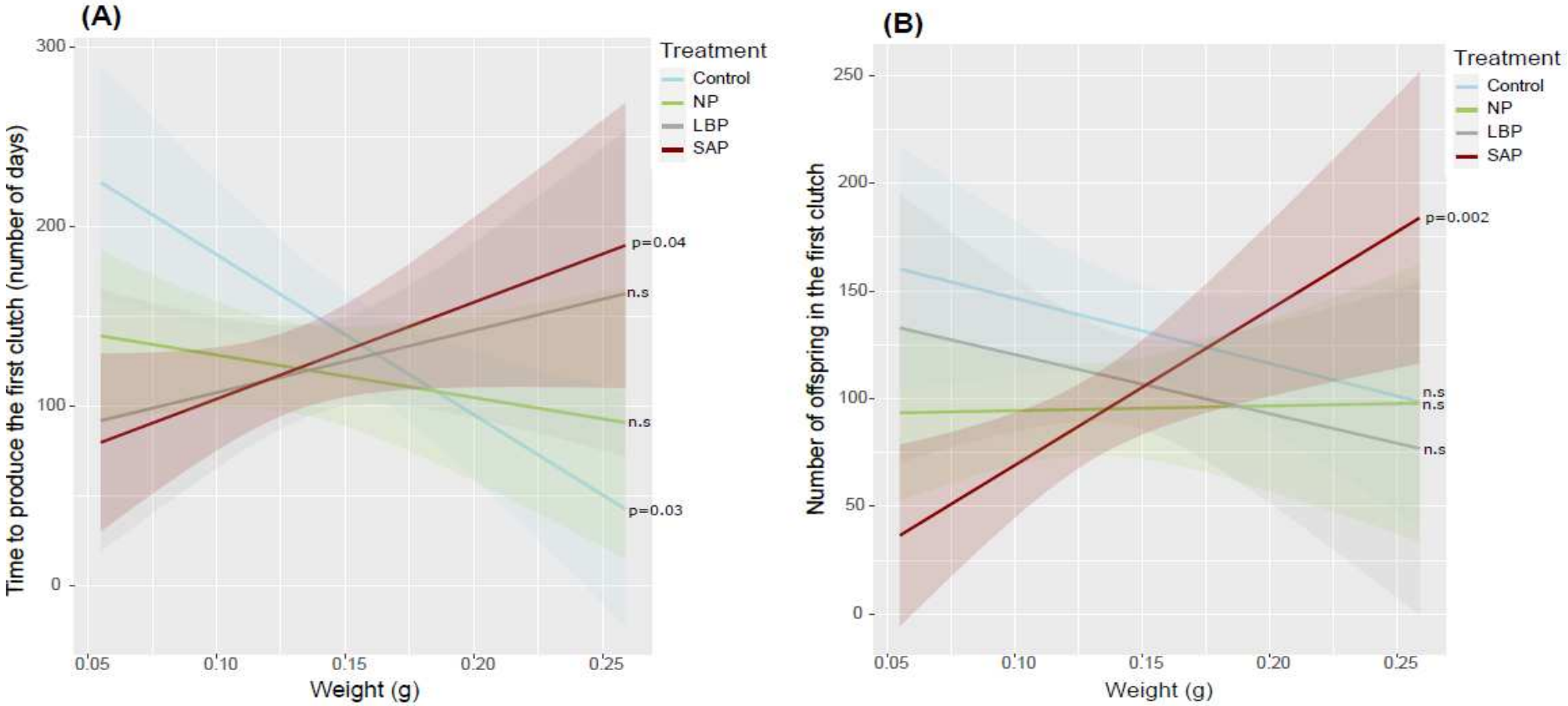


Figure 21. Interaction entre le traitement et le poids pour **(A)** le temps nécessaire pour produire la première portée et **(B)** le nombre de petits de la première portée. NP : femelles n'ayant pas reçues de primo-injection (NP) ; LBP : femelles primo-injectées avec du LB ; SAP : femelles primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* vivantes. Control : femelles n'ayant jamais été injectées (NI). Les poids minimum et maximum sont les valeurs prédictives du modèle statistique. Tiré de Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021.

Chez *A. vulgare*, le développement du marsupium est un processus physiologique coûteux pour les femelles (Surbida & Wright, 2001 ; Antoł & Czarnoleski, 2018). En général, la taille du marsupium est positivement corrélée à la taille de la femelle, qui, par conséquent, produit généralement plus de petits (Antol & Czarnoleski, 2018 ; Durand et al., 2018). Compte tenu de ces informations, nous supposons que les femelles NI les plus légères ont davantage investi leur énergie dans la croissance avant de se reproduire, puisqu'en augmentant ainsi leurs conditions physiques, elles pourraient optimiser jusqu'à 75% leur reproduction ultérieure (Lawlor, 1976). À l'inverse, les femelles NI les plus lourdes seraient davantage prêtes à produire leur 1ère portée, ce qui justifierait le temps moins important pour produire cette 1ère portée (Fig. 21. A).

De manière intéressante, l'effet inverse est observé chez les femelles SAP : les femelles les plus légères mettent moins de temps à produire la 1ère portée (environ 100 jours) comparées aux femelles SAP les plus lourdes (200 jours ; $p = 0.03$; Annexe 2 ; Fig. 21.A).

Deux stratégies différentes pourraient être utilisées par les femelles SAP selon leur poids. (1) Chez les femelles SAP les plus lourdes, l'énergie serait déjà investie dans la croissance et dans la réponse immunitaire contre *S. enterica*, ce qui ne permettrait pas à ces femelles d'investir directement (au sein du temps imparti) dans la production d'un marsupium. À l'inverse, (2) chez les femelles SAP les plus légères, l'énergie non investie dans la croissance durant l'infection pourrait être directement utilisée pour la reproduction. D'après Bonneaud et al. (2004), l'infection par des pathogènes altère les fonctions physiologiques des individus, ce qui réduit leur probabilité de survie (Bonneaud et al., 2004). Par conséquent, les individus maximisent leur chance de reproduction *via* un investissement terminal (Adamo, 1999 ; Minchella & Loverde 1981 ; Clutton-Brock, 1984 ; Shoemaker et al., 2006). Ainsi, les femelles SAP qui ont subi un plus grand coût de l'infection (*i.e.* les plus légères) ont intérêt, d'un point de vue sélectif, à suivre une stratégie d'investissement terminal, en se reproduisant plus rapidement.

Alors que les femelles SAP ont reçu une double dose de *S. enterica* vivantes, seule une tendance d'effet du traitement sur le nombre de petits de la 1ère portée est observé. Les femelles SAP et NP ont tendance à produire moins de petits que les femelles NI ($p = 0.08$ et $p = 0.09$, respectivement, Annexe 2). En revanche, le nombre de petits produits lors de la 1ère portée est lié au poids des femelles en interaction avec le traitement. Les femelles SAP les plus légères produisent moins de petits que les femelles SAP les plus lourdes ($p = 0.002$;

Annexe 2 ; Fig. 21.B), mais nous n'observons pas cette différence selon le poids chez les femelles des autres traitements (Fig. 21.B).

Plusieurs études portant sur les coûts d'une infection montrent une réduction du nombre de petits chez les individus infectés (Kelly, 2011 ; Contreras-Garduño et al., 2014 ; Schwenke et al., 2016). Ici, le coût du priming immunitaire dépend du poids des femelles : celles qui semblent avoir le plus investi dans la réponse immunitaire contre *S. enterica* et/ou pour lesquelles l'infection a induit un ralentissement de croissance (*i.e.* les plus légères) ont produit plus rapidement leur 1ère portée, mais cette dernière contient moins de petits (Fig. 21.B). Chez *A. vulgare*, plus les femelles sont petites, plus leur marsupium est petit et plus le nombre de petits à l'intérieur est faible (Broly, 2013 ; Lawlor, 1976 ; Durand et al., 2018). Nous pourrions donc supposer que le faible nombre de petits chez les femelles SAP les plus légères serait lié à ce facteur confondant. Or, dans notre étude, nous n'observons pas de relation poids/fécondité ni chez les femelles NP, ni chez les NI, ni chez les LBP (Fig 21.B ; Dangerfield & Telford, 1990). Les femelles NP ont aussi tendance à avoir un poids plus faible que les NI, mais elles ne présentent pas moins de petits. Ainsi, le plus faible nombre de petits chez les femelles SAP les plus légères serait donc lié à la double infection par *S. enterica*.

En théorie, la production limitée de petits chez les isopodes terrestres lors du premier évènement de reproduction devrait conduire à l'augmentation du nombre de portées, surtout si les chances de produire des descendants pendant le premier évènement de reproduction sont perçues comme faibles (Dangerfield et al., 1995). Ainsi, nous nous attendons à ce que les femelles SAP qui ont produit peu de petits à la 1ère portée aient plus de chances de produire une 2ème portée.

II.2.c – Influence du traitement et du poids sur le deuxième évènement de reproduction

Parmi les femelles qui ont produit une 1ère portée, la moitié d'entre elles produisent une 2ème portée (NI : 10/21 ; NP : 10/19 ; LBP : 10/20 ; SAP : 11/23). La probabilité d'effectuer cette 2ème portée ne dépend ni du traitement, ni du nombre de petits de la 1ère portée ($p > 0.05$, *cf.* Annexe 2). Cependant, cette probabilité dépend du poids des femelles. Quel que soit le traitement, les femelles les plus légères ont 75% de chance de produire une 2ème portée, contre seulement 25% pour les femelles les plus lourdes (Fig. 22).

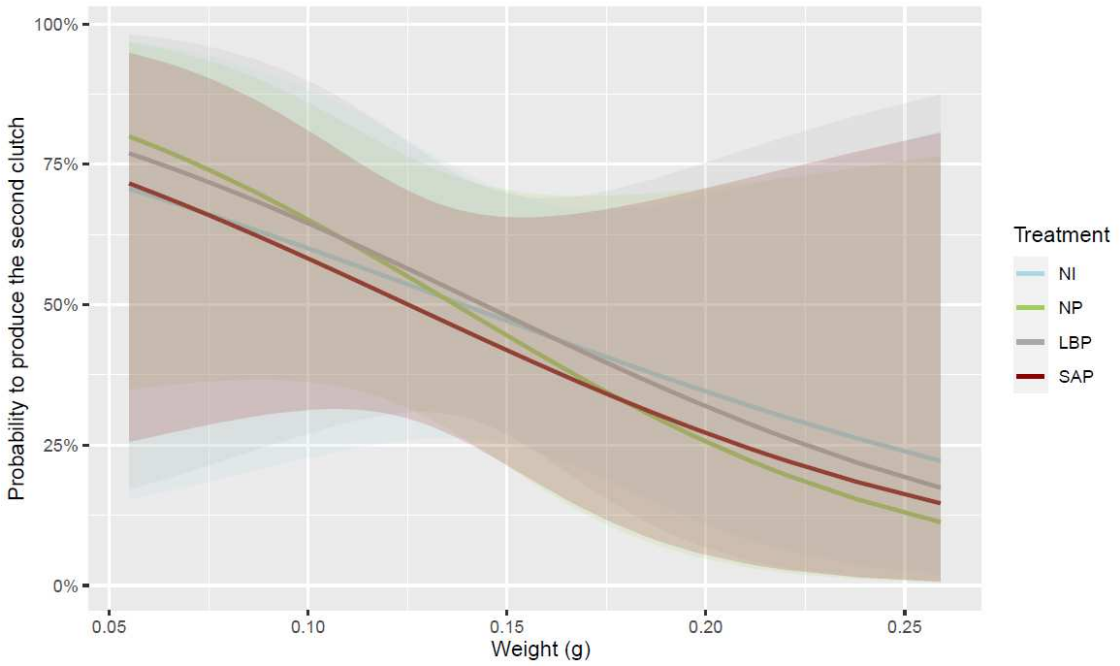


Figure 22. Probabilité de produire une 2ème portée selon le poids des femelles. NP: femelles n'ayant pas reçues de primo-injection ; LBP : femelles primo-injectées avec du LB ; SAP : femelles primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* vivantes. NI : femelles n'ayant jamais été injectées. Tiré de Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021.

Ce résultat rejoint la théorie précédemment formulée par Dangerfield et al., (1995) sur 4 espèces différentes d'isopodes terrestres. D'après ces auteurs, lorsque les femelles sont dans un environnement où les risques de produire une première portée réduite sont élevés, ces dernières produisent plusieurs portées, selon une allocation relativement conservatrice des ressources pour chaque événement de reproduction. En effet, les femelles SAP les plus légères, ayant probablement subi un plus grand stress lors des infections par *S. enterica*, produisent plus rapidement une 1ère portée, qui contient moins de petits, mais elles ont plus de chance de produire une 2ème portée. Le poids trop faible de la femelle résultant d'une double infection serait un signal d'une faible chance de reproduction. Ainsi, les femelles les plus légères serait amenées à maximiser leurs chances de produire une 2ème portée, ce qui compenserait le faible nombre de descendants de la 1ère portée. Ce résultat suggère une stratégie d'investissement direct dans la reproduction à l'égard des femelles SAP les plus légères, car au lieu d'investir dans leur maintenance somatique après la 1ère portée, elles ont une plus grande probabilité de se reproduire une seconde fois, augmentant ainsi leur fécondité.

De manière plus générale (tous traitements confondus), puisque le marsupium est coûteux à produire et que sa taille est proportionnelle à celle des femelles (Dangerfield et al., 1995 ; Antol & Czarnoleski, 2018), nous supposons que les femelles les plus lourdes qui ont

déjà investi dans leur croissance et dans la 1ère portée ont probablement moins de ressources pour produire un second marsupium dans le temps imparti (Lawlor, 1976). Ce résultat concernant les femelles les plus lourdes est en accord avec le modèle théorique de Luu et Tate (2017), montrant qu'un faible coût reproductif comparé à la durée de vie d'un organisme conduit vers une stratégie de maintenance somatique. Ce résultat converge également avec la théorie des traits d'histoire de vie, stipulant que les individus à longue durée de vie ayant de faible taux de mortalité, devraient présenter des coûts sur leur capacité de reproduction ultérieure (ici, un temps plus long pour produire une 2ème portée) plutôt que sur leur survie (Hamel et al., 2014). Cette différence de probabilité pour produire une 2ème portée amène à s'interroger sur les stratégies reproductives des femelles selon leur poids.

Chez *A. vulgare*, les femelles qui ont un poids supérieur à 0.07 g sont toutes capables de produire une 2ème portée, mais les facteurs expliquant pourquoi les femelles produisent une ou deux portées en conditions non-stressantes reste peu connus (Lawlor, 1976 ; Dangerfield & Hassall, 1992). D'après les prédictions théoriques, les femelles qui produisent une seule portée devraient fournir des soins maternels plus importants à leurs descendants que celles qui produisent plusieurs portées (Gilbert & Manica, 2010 ; Tallamy & Brown, 1999 ; Meunier et al., 2012). Chez *F. auricularia* par exemple, les femelles qui fournissent des soins maternels plus prononcés envers leurs descendants ont moins de chance de se reproduire ultérieurement (Koch & Meunier, 2014). En général, le poids des femelles est positivement corrélé avec la masse des œufs produits mais pas toujours avec le nombre d'œufs (Kudo, 2006 ; Fox & Czesak, 2000). Étant donné que le marsupium est un soin maternel coûteux et que les femelles présentent des poids différents, elles pourraient investir différemment dans la qualité de leurs descendants. Dans notre étude et en théorie, si les femelles les plus lourdes ne produisent qu'une seule portée, elles pourraient allouer plus d'énergie à leurs descendants, qui seraient alors de meilleure qualité en termes de croissance ou de survie par exemple (McGinley, 1989). En revanche, si les femelles les plus légères ont moins de réserves énergétiques disponibles pour leurs descendants, alors elles pourraient compenser la qualité de leurs descendants par la quantité, c'est-à-dire dans notre cas, en produisant une 2ème portée (Dangerfield & Hassall, 1992 ; Dangerfield & Telford, 1995). Quel que soit le traitement que les femelles ont subi, il est alors attendu que les femelles les plus légères produisent plus rapidement une 2ème portée (Kölliker, 2007 ; Dangerfield & Telford, 1995).

Or, le temps écoulé entre les deux portées n'est ni influencé par le traitement, ni le nombre de petits de la 1ère portée, ni le poids des femelles, ni l'interaction entre ces facteurs

(*cf.* Annexe 2). Quel que soit le nombre d'infection par *S. enterica*, toutes les femelles qui produisent une 2ème portée le font dans les mêmes délais. De plus, le nombre de petits de cette 2ème portée ne dépend d'aucun des paramètres cités précédemment (*cf.* Annexe 2). Ainsi, le coût reproductif associé à la double infection (et donc au priming immunitaire) ne semble s'exprimer qu'au sein du premier évènement de reproduction, chez les femelles les plus légères. Dans l'ensemble, le nombre total de petits produits (1ère et 2ème portée additionnées) n'est pas influencé par le traitement que les femelles ont reçu, même si les femelles SAP ont tendance à produire moins de petits (toutes portées confondues) que les femelles NI (*cf.* Annexe 2).

II.2.d – État de sénescence et immunité post-reproduction

Concernant les marqueurs de sénescence, nous observons seulement un effet du nombre de portées sur la taille des hémocytes vivants (Fig. 23, *cf.* Annexe 2). Indépendamment de leur traitement, les femelles qui produisent une 2ème portée ont des hémocytes plus grands que celles qui ne produisent qu'une seule portée.

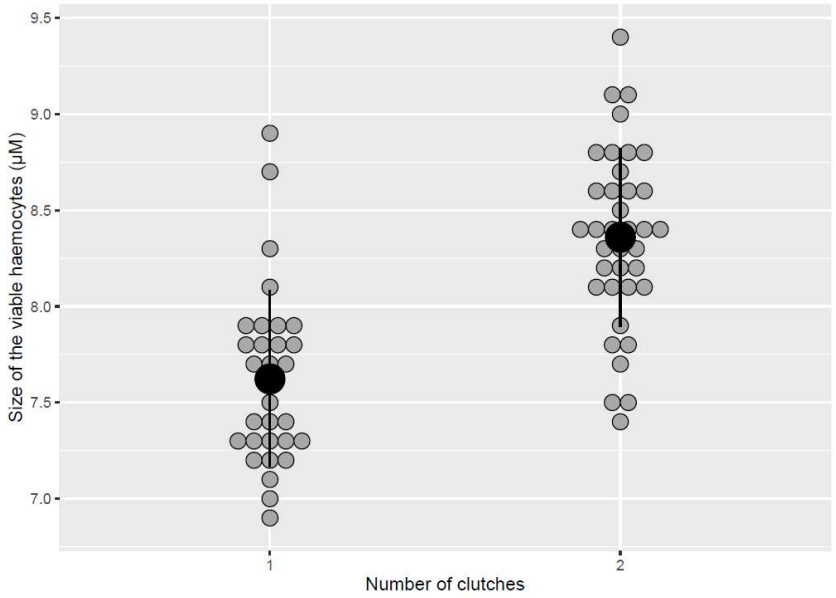


Figure 23. Taille des hémocytes vivants selon le nombre de portées produites par les femelles, tous traitements confondus. Tiré de Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021.

La taille des hémocytes chez *A. vulgare* augmente avec l'âge des individus, faisant de ce trait morphométrique un marqueur potentiel de sénescence (Depeux et al., 2020a).

Pour un âge identique (comme dans le cas de notre expérience), la taille des hémocytes pourrait donc révéler une sénescence prématurée des femelles qui produisent une 2ème portée. Ici, nous observons qu'indépendamment du traitement, ce sont les femelles les plus légères qui ont le plus de chance de produire une 2ème portée (Fig. 22). Ainsi, il semblerait que les femelles les plus légères ont une sénescence plus avancée que les femelles les plus lourdes, pour un âge similaire. Ce résultat illustre un certain compromis entre l'énergie allouée à la reproduction et/ou au maintien somatique, et donc un certain coût de la production de plusieurs portées, indépendamment des précédentes infections par *S. enterica.*

Concernant les hémocytes, aucune différence de concentration et de viabilité entre les femelles des différents traitements n'est observée, quel que soit le nombre de portées qu'elles ont produit (*cf.* Annexe 2). Ce résultat suggère que plusieurs mois après la/les infections(s) de *S. enterica*, la production de cellules immunitaires n'est plus impactée par cette/ces infection(s) (Prigot-Maurice et al., 2019), ni par les évènements de reproduction. Cependant, ces paramètres immunitaires reflètent seulement la quantité et la viabilité basales des hémocytes des femelles, ce qui n'exclut pas que les réponses immunitaires de ces hémocytes, c'est-à-dire l'immunocompétence des femelles face à une infection ultérieure, ne soit pas impactée (Lawniczak et al., 2007). Dans la mesure où les femelles ayant produit deux portées ont une sénescence cellulaire plus avancée (Fig. 23), nous pouvons supposer que ces femelles seraient moins résistantes à une infection ultérieure.

II.3 – Conclusion

Dans cette expérience, nous avons étudié l'influence du priming immunitaire sur la reproduction des femelles lorsqu'elles ont reçu une double injection de *S. enterica* vivantes. Alors que cette infection devrait être très coûteuse en énergie, nous n'observons qu'un faible effet sur la reproduction (Fig. 24). Cet effet est étroitement lié au poids des femelles, lui-même influencé par le traitement qu'elles ont reçu :

- Les femelles chez qui le priming immunitaire a été induit et qui subissent un plus grand coût de l'infection (*i.e.* les femelles SAP les plus légères), (1) produisent moins de petits à la 1ère portée mais (2) se reproduisent plus rapidement et (3) ont plus de chances de produire une 2ème portée, suivant une stratégie proche d'un investissement direct dans l'effort reproductif (Fig. 24). De plus, les femelles produisant deux portées ont une sénescence plus avancée. Ainsi (4) les femelles SAP les plus légères seraient plus sénescentes que les femelles SAP les plus lourdes.

- À l'inverse, les femelles SAP les plus lourdes qui ont survécu à une double infection (1) produisent plus de petits à la 1ère portée, (2) se reproduisent moins rapidement, mais (3) ont moins de chance de produire une 2ème portée par rapport aux femelles SAP les plus légères. Même si nous observons que les femelles les plus lourdes ont moins de chance de produire une 2ème portée (indépendamment du traitement ; Fig. 24), les infections par *S. enterica* n'influencent pas le nombre total de petits produits. Ainsi, il semblerait que les deux stratégies de reproduction observées chez les femelles SAP selon leur poids soient complémentaires, et par conséquent, nous n'observons pas de coûts apparents du priming immunitaire sur les capacités reproductives globales (Fig. 24).

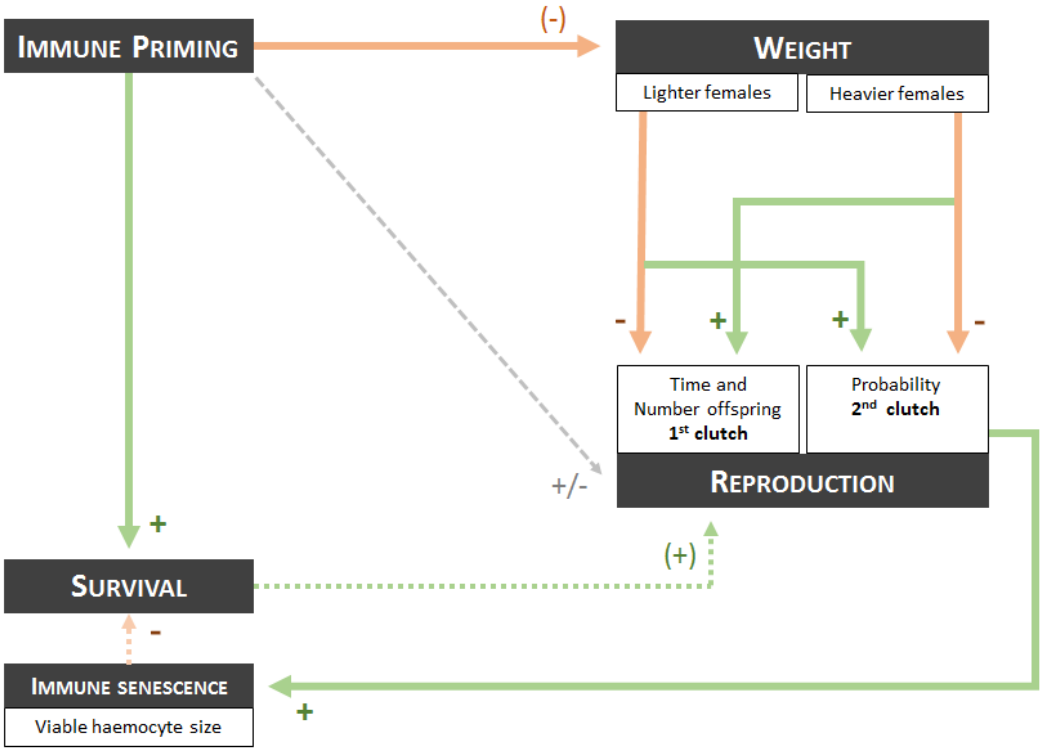


Figure 24. Schéma bilan des résultats obtenus. Les flèches oranges indiquent un effet négatif, les flèches vertes indiquent un effet positif. Si le signe correspondant est entre parenthèses, l'effet considéré est une tendance. +/- indique que nous n'avons pas observé d'effet général. Tiré de Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021.

Même si les femelles SAP montrent deux stratégies de reproduction différentes selon leur poids lorsqu'elles ont été infectées deux fois par *S. enterica*, ces dernières ont une survie plus élevée et un nombre total de petits produits similaire aux femelles NP (qui n'ont reçu qu'une seule injection). De ce fait, le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica* semble être un processus globalement adaptatif. *A. vulgare* est capable de maintenir une survie élevée, sans coût reproductif apparent, alors qu'une réponse immunitaire est soutenue

durant au moins 7 jours et que *S. enterica* persiste dans l'hémolymphe des femelles entre les deux infections. Bien que certaines prédictions supposent que les organismes qui se développent graduellement avec longue durée de vie favoriseraient des processus immunitaires coûteux (Johnson et al., 2012) notre étude suggère que cela ne semble pas être le cas chez *A. vulgare* contre *S. enterica*, puisque l'investissement dans la réponse immunitaire contre *S. enterica* ne semble pas impacter la reproduction globale des femelles.

Si nous considérons que les ressources des individus sont limitées et que des allocations sont inévitables à l'égard de la reproduction ou de la résistance aux infections, la sélection naturelle devrait sélectionner les réponses immunitaires les plus optimales face à ces allocations (Raw, 2012). Ainsi, nous supposons que chez *A. vulgare*, le coût de l'infection permanente est réduit par une tolérance accrue contre *S. enterica* plutôt qu'une résistance accrue, qui demanderait beaucoup plus d'énergie au détriment des autres fonctions biologiques (Raw, 2012 ; Zuk & Stoehr, 2002).

Cependant, même si nous n'observons pas de coûts très importants de la double infection et/ou de la mise en place du priming immunitaire sur les traits reproductifs que nous avons mesurés, il n'est pas exclu que d'autres traits d'histoire de vie soient affectés, comme la durée de vie totale des femelles ou bien certains traits dans la génération suivante. Chez *A. vulgare* par exemple, les vieux individus produisent des descendants plus gros et plus nombreux que ceux issus de jeunes individus, mais ces derniers survivent moins bien et sont incapables de se reproduire (Depeux et al, 2020b). Dans notre étude, le nombre total de petits n'est pas altéré par la double infection induisant la mise en place d'un priming immunitaire, mais cela ne prouve en rien que la qualité des petits ne soit pas diminuée. Le priming immunitaire est souvent associé à certains coûts dans les générations suivantes (Dhinaut et al., 2018 ; Zanchi et al., 2012 ; Robinson & Green, 2020). Chez *Crassostrea gigas* par exemple, les descendants issus de mère ayant établi un priming immunitaire ont un temps de développement plus long, ce qui retarde leur maturité sexuelle par rapport aux descendants issus de mère n'ayant pas établi de priming immunitaire (Robinson & Green, 2020). Il serait alors pertinent de s'intéresser au devenir des descendants (*i.e.* mesurer leur croissance, leur survie, leur reproduction et même leur protection contre *S. enterica*) de femelles *A. vulgare* qui ont établi un priming immunitaire. Cela nous permettrait d'avoir une vision plus précise de la sélection d'un tel processus chez *A. vulgare*.

Les résultats présentés dans ce premier chapitre présentent certaines limites quant à la caractérisation du priming immunitaire chez *A. vulgare*. (1) La privation d'alimentation durant 7 jours entre les infections peut modifier les capacités de tolérance/résistance des femelles. (2) *S. enterica* est toujours présente dans l'hémolymphe des femelles lors de la seconde infection. Il se pourrait donc que l'amélioration de la survie soit due à l'activation permanente du système immunitaire *via* la disponibilité des MAMPs de *S. enterica*. (3) Le LB semble induire en lui-même une réponse durable des hémocytes (*cf.* Chapitre I, partie I), créant ainsi un effet confondant dans la réponse hémocytaire que nous avons observée (*cf.* Chapitre I, partie I). Du fait de ces biais expérimentaux, nous avons approfondi l'étude phénoménologique et mécanistique du priming immunitaire chez *A. vulgare* contre *S. enterica*, avec différentes modalités de vaccination.

CHAPITRE II

Quelles sont les modalités d'expression de ce priming immunitaire ?

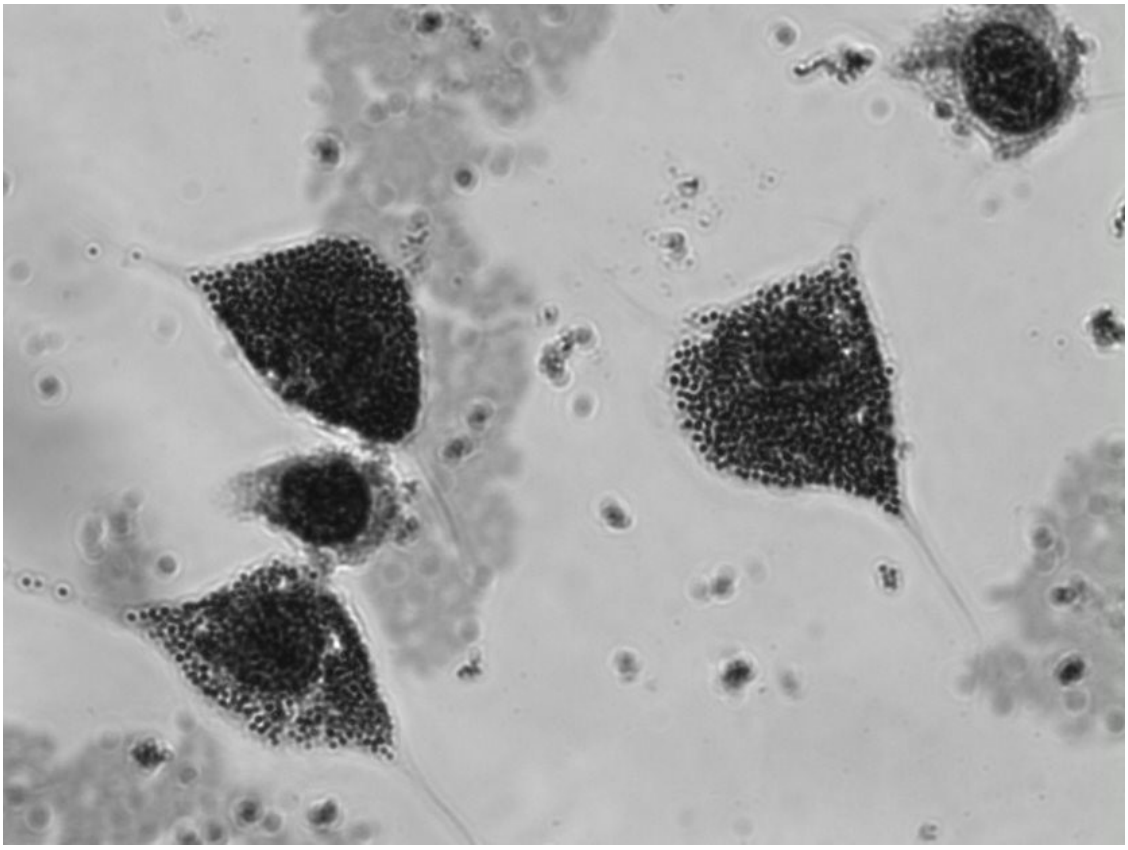
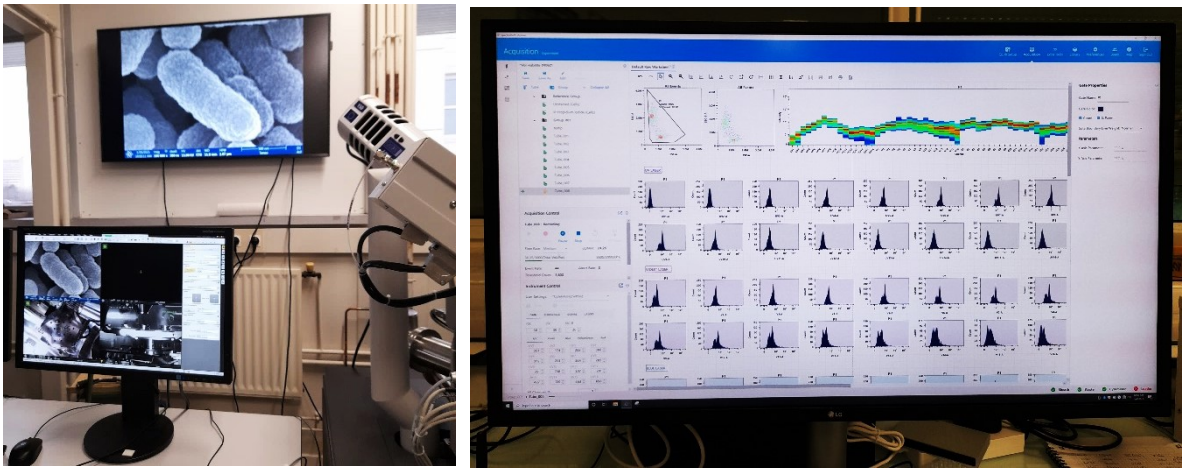


Photo : Hémocytes d'*A. vulgare*. Crédit : Christine-Braquart-Varnier

Prologue

Pour nous émanciper de la persistance de *S. enterica* vivantes dans l'hémolymphe des femelles *A. vulgare*, nous avons testé le priming immunitaire avec des *S. enterica* inactivées. Pour cela, nous avons réitéré l'expérience décrite dans le Chapitre I, et nous avons mesuré l'amélioration de la survie des femelles face à une seconde infection de *S. enterica* vivantes, létale pour 50% des individus.

Dans la mesure où les hémocytes sont le support de la plupart des réponses immunitaires, nous avons exploré l'effet du priming immunitaire avec des *S. enterica* inactivées sur les différentes populations d'hémocytes. Grâce à une analyse de cytométrie en flux, nous avons comparé les proportions des populations d'hémocytes (granulaires, hyalins et semi-granulaires) et leurs paramètres (viabilité, taille et granulométrie) entre des femelles chez qui le priming immunitaire a été établi, ou non.



Photos : Gauche : Microscopie Électronique à Balayage de *S. enterica*, Droite : analyses cytométriques. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice.

I. MODALITÉS D'EXPRESSION DU PRIMING IMMUNITAIRE CONTRE *S. ENTERICA*

[Avec le support technique de M. Raimond et E. Bere (microscopie)]

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Dans l'expérience précédente, nous avons observé que les *S. enterica* vivantes issues d'une première injection persistaient durant 15 jours dans l'hémolymphe des femelles. *S. enterica* est une bactérie intracellulaire facultative (Andino & Hanning, 2015). Lorsqu'elle infecte une cellule hôte, elle se protège dans un compartiment spécifique délimité par une membrane, appelé la *Salmonella*-Containing Vacuole (SCV). Grâce à ce compartiment intracellulaire, *S. enterica* prolifère au sein des cellules de son hôte (incluant les cellules immunitaires) et échappe aux composés antimicrobiens chez les Vertébrés (Brumell, 2004 ; Dunlap et al., 1991 ; Holden, 2002). Compte tenu de la présence permanente de *S. enterica* (potentiellement dans les hémocytes d'*A. vulgare*), nous n'avons pas confirmé que la protection observée face à une seconde infection est bien la conséquence d'un priming immunitaire.

Pour s'affranchir de ce biais, nous avons réitéré l'expérience précédente en utilisant cette fois-ci des *S. enterica* inactivées lors de la première injection. Dans la littérature, plusieurs méthodes d'inactivation de bactéries sont décrites (Moor et al., 2016 ; Lin et al., 2013). Même si quelques études démontrent que la technique utilisée n'a pas d'influence sur la réponse immunitaire engendrée (Dehlink et al., 2007), une expérience de priming immunitaire chez la crevette *M. japonicus* contre le WSSV virus montre que 10 jours post-injection, les individus sont protégés contre ce même virus s'il est inactivé avec de la formaline, mais pas lorsqu'il est inactivé à la chaleur (Namikoshi et al., 2004). De plus, la protection du priming immunitaire dépend parfois de la dose de pathogène reçue lors de la première injection (Yao et al., 2021 ; Melilo et al., 2018). Chez *G. mellonella*, plus la première dose de *P. luminescens* inactivées à la chaleur est élevée, plus le taux de survie face à la seconde infection de *P. luminescens* vivantes est élevé (Wu et al., 2014).

En lien avec ces observations, nous avons injectés des femelles *A. vulgare* avec des *S. enterica* inactivées soit à la chaleur (HK pour Heat-Killed, 65°C pendant 30 min) soit avec du paraformaldéhyde (PFA 4% pendant 1h ; Collins, 1973 ; Moor et al., 2016 ; *cf.* Box 1). Afin de détecter l'effet des deux traitements (HK et PFA) sur la paroi de *S. enterica* inactivées, nous avons observé les échantillons bactériens au microscope électronique à

balayage (MEB). La préparation des échantillons pour le MEB a été réalisée par Maryline Raimond (Ingénieur d'études au laboratoire EBI) et Émile Bere (Responsable microscopie électronique, photonique et de force atomique à Image UP ; *cf*. Box 2). Une fois les inactivations mises au point, nous avons injecté deux doses différentes de *S. enterica* inactivées pour la première exposition, soit de 10^3 bactéries.100nL^{-1} (traitement PFA3 et HK3) soit de 10^6 bactéries.100nL^{-1} (traitement PFA6 et HK6). Les *S. enterica* inactivées ne se développent pas sur des boîtes de LB-agar. Ainsi, nous avons contrôlé les doses en réalisant le même protocole d'inactivation sur des bactéries traitées au PBS (*cf*. Box 1). Les calculs des doses bactériennes ainsi que les méthodes d'injections utilisées sont les mêmes que Prigot-Maurice et al., 2019 (*cf*. Annexe 1). Contrairement à notre première expérience, les bactéries ont été manipulées avec du PBS stérile après leurs cultures. Les femelles contrôles ont donc été injectées avec du PBS et non plus du LB-broth stérile. Les *S. enterica* vivantes de la seconde injection létale (DL_{50}) ont aussi été injectées dans 100 nL de PBS stérile.

Nous avons testé le priming immunitaire résultant d'une injection de *S. enterica* inactivées au travers de la survie des femelles face à une seconde infection létale (DL_{50}) de *S. enterica* survenant 24h ou 7 jours plus tard (*cf*. Tab. 7 pour les effectifs). Les données de survies ont été analysées avec un modèle de Cox, comprenant en facteurs fixes le traitement (HK3, PFA3, HK6, PFA6, PBS et NP pour « non-primed »), l'intervalle de temps entre les injections (24h ou 7 jours) et leur interactions. Puis, nous avons comparé la survie des femelles de chaque traitement grâce à des comparaisons de Tukey (Prigot-Maurice et al., 2019). Pour les 6 traitements, nous avons utilisé des femelles âgées de 1 an (+/-3 mois), réparties en 3 réplicats techniques en utilisant 3 cultures bactériennes différentes. Afin d'effectuer des comparaisons croisées, tous les traitements et tous les intervalles de temps ont été répartis équitablement dans chaque réplicat. Ce facteur « réplicat » a donc été ajouté en facteur aléatoire dans les modèles statistiques (*cf*. détails en Annexe 1).

Tableau 7. Nombre de femelles utilisées pour chaque traitement et chaque intervalle de temps. NP : femelles n'ayant pas reçues de primo-injection ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; HK : femelles primo-injectées avec 10^3 (HK3) ou 10^6 (HK6) *S. enterica* inactivées à la chaleur ; PFA : femelles primo-injectées avec 10^3 (PFA3) ou 10^6 (PFA6) *S. enterica* inactivées avec du PFA 4%.

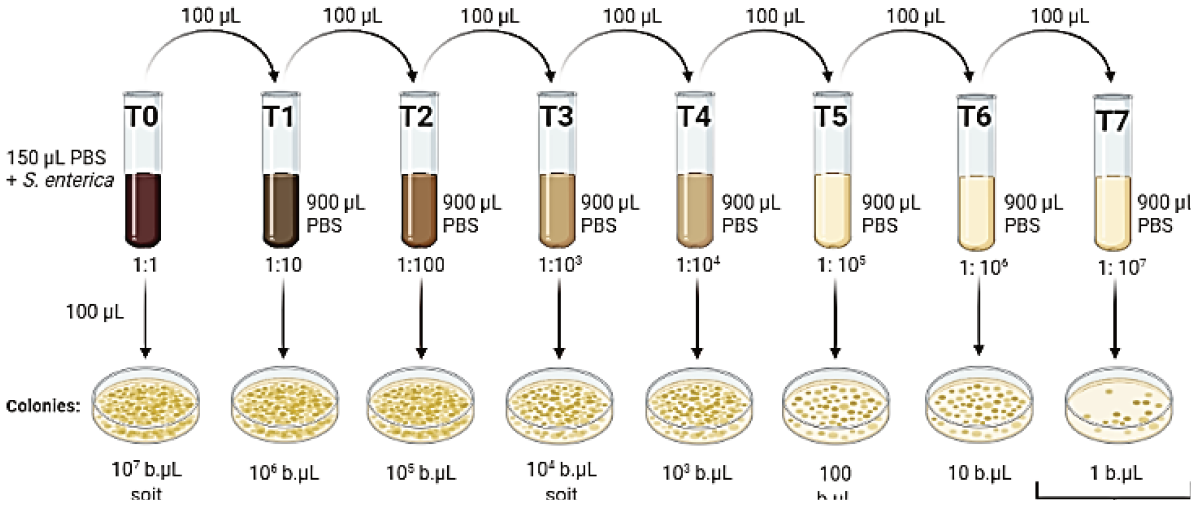
	NP	PBS	HK3	HK6	PFA3	PFA6
24 heures	34	34	34	34	24	28
7 jours	32	31	32	28	28	29

Box. 1 Méthode d'inactivation – *S. enterica*

Après une culture overnight à 37°C – 180 rpm dans 5 mL de LB stérile ; 2 mL de culture bactérienne sont dilués pour une absorbance de 0.8 (600 nm). Les tubes sont centrifugés à 13 000 g pendant 2 min à 4 °C. Le culot bactérien est repris soit dans 2 mL de PBS 1x stérile, soit dans 2 mL de PFA 4%. Un lot de tubes contenant les bactéries dans du PBS est placé au bain marie à 65°C pendant 30 min (traitement HK). Les autres tubes traités au PFA restent à 20°C pendant 1h. Afin d'inférer les doses bactériennes des bactéries inactivées, l'autre lot de bactéries traitées au PBS est placé sur glace pendant 1h. Les tubes sont ensuite centrifugés (13000 g, 2 min, 4°C) et le culot bactérien repris dans 2 mL de PBS. Afin d'éliminer les résidus de PFA, ce lavage est répété deux fois. Le même traitement est appliqué aux autres tubes (PBS et HK) de manière à égaliser la potentielle perte en bactéries durant les lavages.

Les culots bactériens sont concentrés dans 150 µL de PBS, puis dilués en série au 1/10ème jusqu'à atteindre environ 1 bactérie par µL (schéma ci-dessous, crée avec BioRender©). Pour tous les traitements, 100 µL de cette solution sont étalés sur des boîtes de LB agar stérile et incubés à 37°C, overnight. La quantité de bactéries souhaitée est atteinte lorsqu'environ 100 CFU (Colonie Forming Unit) ont poussées sur les boîtes contrôles (bactéries traitées au PBS). Pour les traitements HK et PFA, aucune CFU ne se développe en raison de l'inactivation.

Pour injecter 10^6 ou 10^3 bactéries dans 100 nL de PBS, nous avons utilisé les tubes T0 et T3, pour chaque traitement (HK et PFA, schéma ci-dessous). La méthode d'injection est la même que celle décrite dans Prigot-Maurice et al., 2019 (*cf.* Annexe 1). Pour contrôler la quantité de bactéries injectées, nous avons étalé le tube T7.



Box 2 – Préparation de *S. enterica* pour la Microscopie Electronique à Balayage

Une fois les bactéries inactivées (*cf.* Box 1) et les culots repris dans 150 µL de PBS, les bactéries des trois traitements (PBS, HK et PFA) sont de nouveau centrifugées (13 000 g, 2 min, 4°C) puis placées dans 2 mL de fixateur (glutaraldéhyde 3%, cacodylate de sodium 0.1M, NaCl 1%, pH 7.3) pendant 2h à 4°C. Après centrifugation, les culots sont repris dans 2 mL de tampon de lavage (sucrose 0.26 M, cacodylate de sodium 0.1 M, NaCl 1%, pH 7.3) pendant 2h à 4°C puis 1 mL de tampon post-fixateur (tétroxyde d'osmium 1.3%, cacodylate de sodium 0.1 M, NaCl 1.8%) pendant 1h à 20°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés avec 2 bains d'acétone à 50% (2x1 min), 2 bains d'acétone à 70% (2x5 min), 2 bains d'acétone à 90% (2x15 min), puis 4 bains d'acétone à 100% (4x15 min). Les échantillons sont dessiqués par contournement du point critique (CDP030 BALZERS) puis fixés sur un portoir afin d'être métallisés avec une laque d'argent (SCD 005 BAL-TEC). Les échantillons sont ensuite observés au MEB de la plateforme ImageUP de l'Université de Poitiers.

I.2 – Résultats et discussion

L'observation de culot de *S. enterica* au MEB révèle que les inactivations à la chaleur (HK) et au paraformaldéhyde 4% (PFA) semblent toutes les deux avoir un effet sur la paroi des bactéries (Fig. 25). Les bactéries HK présentent visuellement de nombreuses aspérités et cavités, ce qui n'est pas le cas des bactéries traitées avec du PBS (Fig.25. A et C). Les bactéries traitées au PFA quant à elles semblent avoir une paroi similaire à celles des bactéries traitées avec du PBS (Fig.18 B et C). En revanche, les bactéries inactivées au PFA sont reliées par de nombreux filaments, comparés aux autres traitements (Fig. 25). Bien que nous n'ayons pas effectué d'analyses statistiques sur la prévalence de ces filaments, ils semblent moins nombreux chez les bactéries traitées à la chaleur ou au PBS (Fig. 25).

Deux types de filaments sont produits chez *S. enterica* : des flagelles et des fimbriae (ou pilli). Les fimbriae de *S. enterica* sont principalement impliqués dans l'adhésion et l'invasion des cellules hôtes (Humphries et al., 2001 ; Althouse et al., 2003). Les flagelles quant à eux sont plus longs, plus larges et plutôt utilisés pour la motilité bactérienne (Wray & Wray, 2000), la formation de biofilms mais aussi l'infection et la virulence (Ikeda et al., 2001 ; Eom et al., 2013 ; Viegas et al., 2013 ; Spöring et al., 2018 ; Soutourina & Bertin, 2003). Les monomères de ces flagelles (*i.e.* flagellines) sont particulièrement reconnus par les PRRs des cellules immunitaires innées, où ils induisent des réponses pro-inflammatoires (Franchi et al., 2006 ; Miao et al., 2006). Chez la souris, l'inoculation de *S. enterica typhimurium* atténuées surexprimant leurs flagelles déclenche une protection immunitaire spécifique contre la Salmonellose, médiée par les macrophages (*i.e.* trained immunity ; Eom et al., 2013). Étant donné que ces deux types de filaments sont hautement reconnus par le système immunitaire de l'hôte (Wray & Wray, 2002), *S. enterica* peut contrôler la production de ses filaments durant l'infection, mais aussi lors de changement de pH ou de température (Soutourina & Bertin, 2003). Dans notre étude, le stress causé par le traitement au PFA semble déclencher une production plus importante de filaments. Bien que les fimbriae soient généralement plus petits que les flagelles (Van der Velden, 1998 ; Lillard, 1986 ; Zhang et al., 2000), seule une analyse génétique nous permettrait de déterminer si ces filaments sont des flagelles ou des fimbriae. Cependant, puisque ces filaments semblent plus nombreux chez les *S. enterica* traitées avec du PFA (Fig. 25), nous supposons que l'injection de ces bactéries devraient engendrer une détection plus importante des MAMPs de *S. enterica* par le système immunitaire d'*A. vulgare* et donc une réponse immunitaire plus importante.

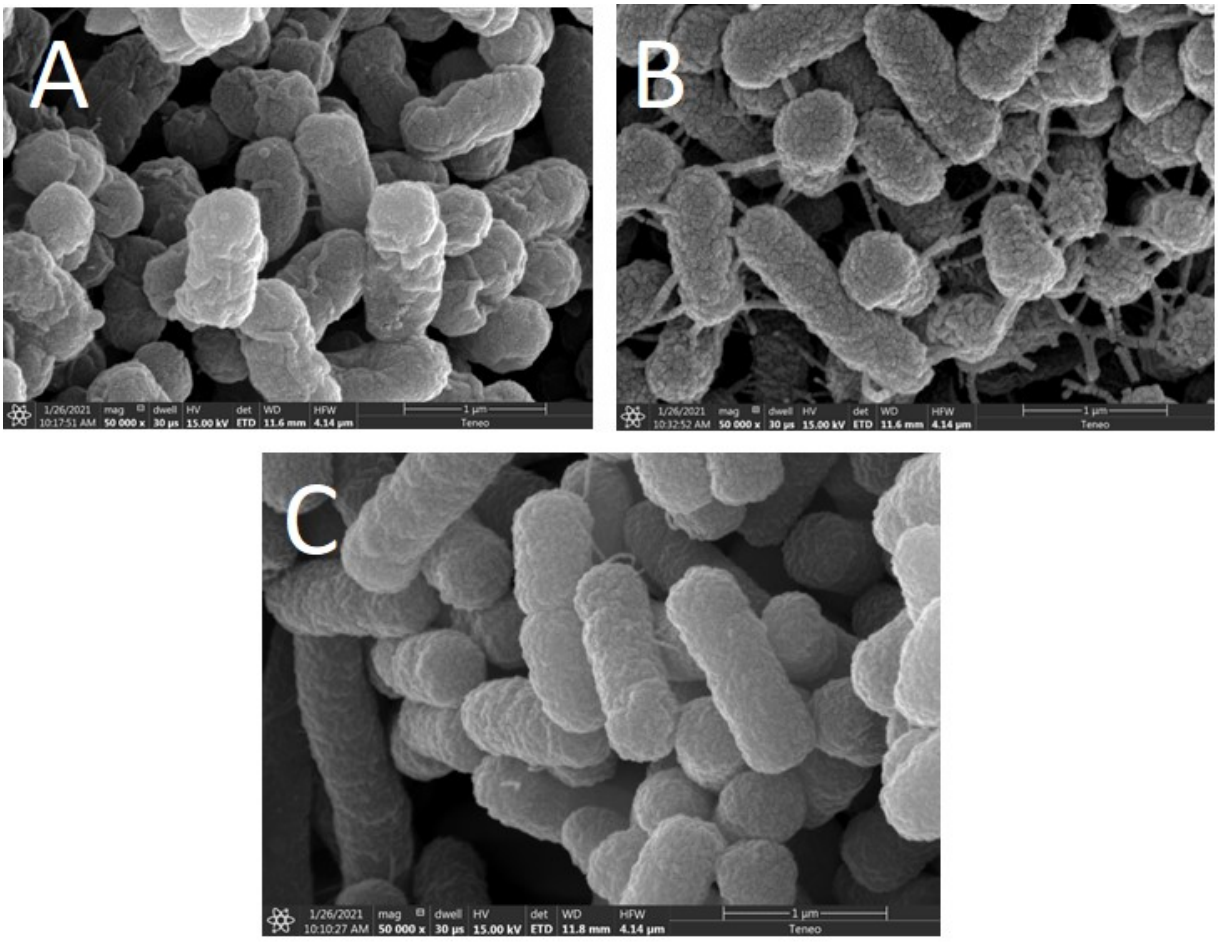


Figure 25. *S. enterica* **(A)** inactivées à la chaleur, **(B)** inactivées avec du PFA 4% et **(C)** traitées au PBS stérile ; observées en microscopie électronique à balayage (MEB). Photos : Emile Béré

En ce qui concerne le priming immunitaire, nous n'observons aucune différence de survie entre les femelles des différents traitements lorsque les injections sont espacées de 24h ($p > 0.05$ pour toutes les comparaisons, Fig. 26.A).

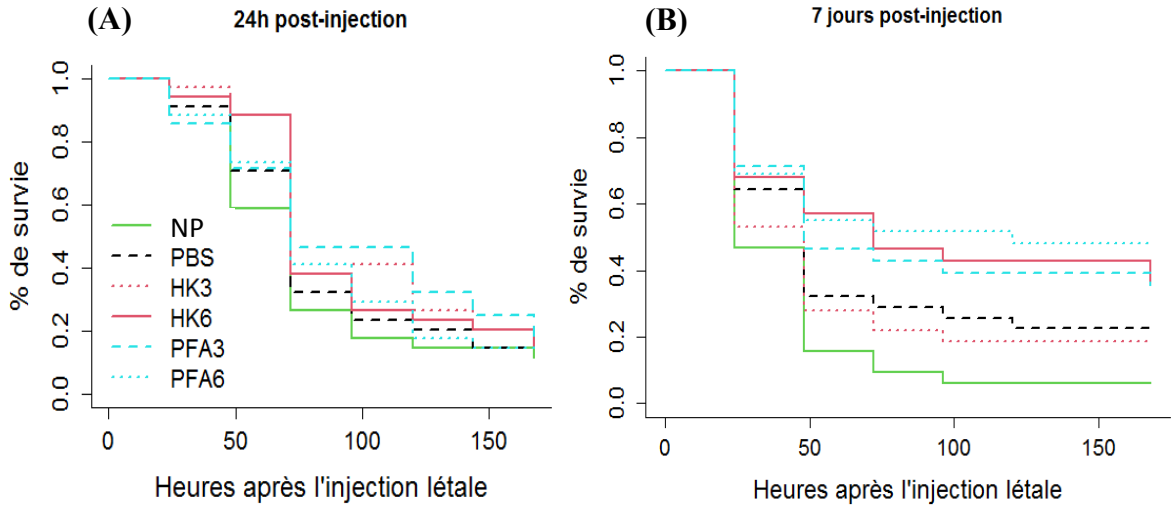


Figure 26. Taux de survie après la DL_{50} en fonction des traitements, **(A)** lorsque 24h ou **(B)** 7 jours séparent les deux injections. NP : femelles n'ayant pas reçues de primo-injection ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; HK : femelles primo-injectées avec 10^3 (HK3) ou 10^6 (HK6) *S. enterica* inactivées à la chaleur ; PFA : femelles primo-injectées avec 10^3 (PFA3) ou 10^6 (PFA6) *S. enterica* inactivées avec du PFA 4%.

Tableau 8. Comparaison des taux de survie entre les traitements, à 7 jours post-injection. NP : femelles n'ayant pas reçues de primo-injection ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; HK : femelles primo-injectées avec 10^3 (HK3) ou 10^6 (HK6) *S. enterica* inactivées à la chaleur ; PFA : femelles primo-injectées avec 10^3 (PFA3) ou 10^6 (PFA6) *S. enterica* inactivées avec du PFA 4%.

Taux de survie (% de femelles vivantes) à 7 jours			
	estimate	s.e.	p.value
NP *vs* PBS	0.749	0.276	0.07
NP *vs* HK3	0.530	0.270	0.36
NP *vs* HK6	1.338	0.303	**0.0001**
NP *vs* PFA3	1.281	0.303	**0.0003**
NP *vs* PFA6	1.658	0.322	**< 0.0001**
PBS *vs* HK3	-0.219	0.283	0.97
PBS *vs* HK6	0.588	0.313	0.41
PBS *vs* PFA3	0.532	0.313	0.53
PBS *vs* PFA6	0.908	0.331	0.06
HK3 *vs* HK6	0.807	0.338	0.09
HK3 *vs* PFA3	0.751	0.338	0.14
HK3 *vs* PFA6	1.128	0.327	**0.007**
HK6 *vs* PFA3	-0.056	0.333	1.00
HK6 *vs* PFA6	0.320	0.350	0.94
PFA3 *vs* PFA6	0.376	0.350	0.89

Ce résultat suggère que l'amélioration de survie précédemment observée (*cf.* Chapitre I, partie I) à 24h chez les femelles primo-injectées avec du LB était probablement due à la solution injectée. L'injection de PBS stérile ne déclenche pas de priming immunitaire chez *A. vulgare* en l'espace de 24h (Fig. 26.A).

Lorsque 7 jours séparent les deux injections, les femelles primo-injectées avec 10^3 et 10^6 *S. enterica* inactivées au PFA, ou 10^6 *S. enterica* inactivées à la chaleur, ont de meilleurs taux de survie que les femelles n'ayant pas reçu de primo-injection (Fig. 26.B ; Tab. 8). En incluant nos observations microscopiques, il s'avère que ce sont les *S. enterica* qui semblent avoir de nombreux filaments (*i.e.* inactivées avec du PFA) qui amorcent le mieux le système immunitaire d'*A. vulgare*, quelle que soit la dose injectée. Lorsque les *S. enterica* sont inactivées à la chaleur, l'amélioration de la survie n'est observée que pour la dose injectée la plus élevée (10^6 bactéries.100nL). Lorsque nous comparons les taux de survie des mêmes traitements entre 24h et 7 jours, les femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées au PFA ont de meilleurs taux de survie à 7 jours, comparé à 24h (Tab. 9). Ce n'est pas le cas pour les femelles primo-injectées avec 10^3 *S. enterica* inactivées avec du PFA ou avec 10^6 *S. enterica* inactivées à la chaleur (Tab.9).

Tableau 9. Comparaison des taux de survie du même traitement, à 24h et 7 jours post-injection. NP : femelles n'ayant pas reçu de primo-injection ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; HK : femelles primo-injectées avec 10^3 (HK3) ou 10^6 (HK6) *S. enterica* inactivées à la chaleur ; PFA : femelles primo-injectées avec 10^3 (PFA3) ou 10^6 (PFA6) *S. enterica* inactivées avec du PFA 4%.

Taux de survie (% d'animaux vivants)			
	estimate	s.e.	p.value
NP	-0.828	0.260	**0.001**
PBS	-0.231	0.277	0.40
HK3	-0.543	0.271	**0.04**
HK6	0.216	0.301	0.47
PFA3	0.159	0.316	0.61
PFA6	0.664	0.321	**0.03**

Les trois modalités de vaccination (PFA3, PFA6 et HK6) n'engendrent donc pas la même force de protection chez *A. vulgare*, alors qu'un priming immunitaire est mis en place pour chacune d'elles à 7 jours d'intervalle. Nous émettons l'hypothèse que le priming immunitaire se déclenche selon un certain seuil de détection lié à la quantité et la qualité des MAMPs de *S. enterica*, ce qui est aussi décrit dans la littérature. Par exemple, la quantité de LPS injectés chez *G. mellonella* est positivement corrélée à une meilleure protection contre une infection ultérieure (Wu et al., 2015). Chez *L. vannamei*, les individus primo-injectés

avec *V. alginolyticus* inactivés avec de la formaline ont une résistance plus importante contre une seconde infection par cette même bactérie, comparés aux individus primo-injectés avec *V. alginolyticus* inactivés à la chaleur (Lin et al., 2013). Pourtant, un priming immunitaire s'exprime dans les deux cas (Lin et al., 2013). Cette différence s'expliquerait par la dénaturation plus importante des MAMPs de *V. alginolyticus* lors du traitement à la chaleur, qui seraient alors moins détectés par les PPRs des cellules immunitaires (Lin et al., 2013). Chez *S. enterica,* la diminution du nombre de flagelles est corrélée à une altération plus élevée des LPS (Spöring et al., 2018). Or, nous avons observé que les parois des *S. enterica* inactivées à la chaleur semblent plus altérées, et moins « flagellées », que celles des *S. enterica* inactivées avec du PFA. Cette différence expliquerait les niveaux de protection selon le traitement que les femelles ont reçu (HK6, PFA3 et PFA6) après la DL_{50} de *S. enterica*.

I.3 – Conclusion

A. vulgare exprime un priming immunitaire contre *S. enterica*, lorsque cette dernière est inactivée lors de la première injection. Ce n'est donc pas la présence permanente de *S. enterica* vivantes qui expliquerait la protection précédemment observée (*cf.* Chapitre I, partie I). Les modalités de vaccination engendrent des niveaux de protection différents face à la seconde infection de *S. enterica* vivantes. Une meilleure protection est observée lorsque *S. enterica* est injectée à forte dose et semble présenter plus de flagelles (*i.e.* inactivée avec du PFA, Fig. 24B). Cet effet dose-dépendant rejoint plusieurs observations décrites dans la littérature (Wu et al., 2014 ; Wu et al., 2015). D'après ces auteurs, la protection dose-dépendante du priming immunitaire aurait été activement sélectionnée au cours de l'évolution. Chez *G. mellonella* par exemple, plus la dose injectée est élevée et plus les effecteurs immunitaires sont produits en grande quantité dans l'hémolymphe selon une réponse immunitaire soutenue (Wu et al., 2014 ; 2015). Aussi, plus la dose est importante, et plus cette réponse immunitaire persiste dans le temps (Wu et al., 2015). Établir une protection immunitaire appropriée au premier taux d'infection permettrait de limiter les coûts énergétiques d'une réponse immunitaire soutenue jusqu'à la seconde infection. C'est ce que nous avons suspecté dans la partie II du Chapitre I, où *A. vulgare* semble réduire l'impact de l'infection par *S. enterica via* une tolérance immunitaire accrue. Puisque les hémocytes sont responsables de la plupart des activités immunitaires, nous avons ensuite testé si les hémocytes d'*A. vulgare* sont le support du priming immunitaire chez cette espèce.

II. CARACTÉRISATION DES POPULATIONS D'HÉMOCYTES

[Avec le support technique d'A. Delwail (cytométrie)]

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Bien que les hémocytes soient le support de la plupart des réponses immunitaires, chaque type d'hémocytes retrouvés chez les invertébrés assure des activités immunitaires plus ou moins spécifiques (phagocytose, encapsulation, production de phénoloxydase, ROS, peptides antimicrobiens, etc ; Söderhäll & Cerenius, 1992 ; Lee & Söderhäll, 2002 ; Chevalier et al., 2011). Le priming immunitaire peut être médié par différents types d'hémocytes. Chez *A. gambiae* par exemple, le priming immunitaire dressé contre *P. berghei* est corrélé à l'augmentation du pourcentage d'hémocytes granulaires (Rodrigues et al., 2010). À l'inverse, le priming immunitaire de *L. vannamei* contre *V. harveyi* est médié par l'augmentation du pourcentage d'hémocytes phagocytaires (Pope et al., 2011). Le priming immunitaire peut donc être porté par certains types d'hémocytes, qui, grâce à leurs activités plus ou moins spécifiques, améliore la protection des individus face à une seconde infection.

La distinction des différents types d'hémocytes s'effectue communément grâce à la cytométrie en flux (Cossarizza et al., 2017). Cette technique permet de distinguer différentes populations d'hémocytes, selon 2 paramètres que sont la taille (estimée par le FSC-A) et la granulométrie interne des cellules (estimée par le SSC-A, *cf.* Box 3). *A. vulgare* dispose de trois types d'hémocytes, mais seulement deux populations d'hémocytes sont distinguées en cytométrie en flux (Fig. 27 ; Chevalier et al., 2011). La première population contient des hémocytes hyalins à hauteur de 13% et des hémocytes semi-granulaires à hauteur de 87%. Les hémocytes hyalins ne contiennent pas de granules intracytoplasmiques et sont de plus grande taille, tandis que les hémocytes semi-granulaires contiennent de petites granules. La deuxième population contient exclusivement des hémocytes granulaires, de plus petite taille mais contenant de nombreuses granules (Fig. 27 ; Chevalier et al., 2011). Chez *A. vulgare*, les hémocytes hyalins et semi-granulaires sont plutôt impliqués dans la phagocytose et l'encapsulation, tandis que les hémocytes granulaires sont majoritairement impliqués dans les réponses humorales (*cf.* Introduction, partie III.2).

Ainsi, nous avons testé si le priming immunitaire d'*A. vulgare* est médié par un certain type d'hémocyte, en analysant l'évolution des populations respectives des hémocytes suivant la première, puis la seconde injection de *S. enterica*.

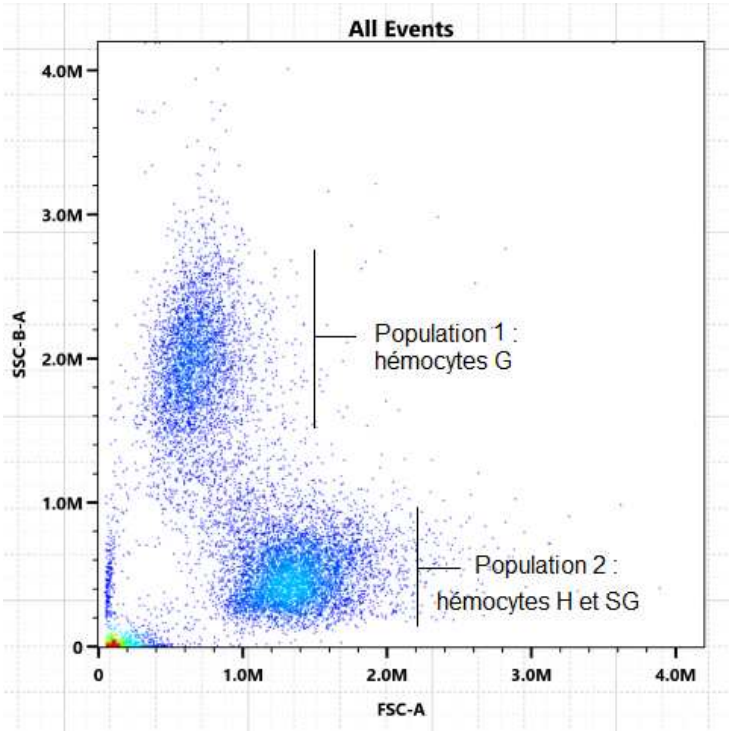


Figure 27. Populations d'hémocytes d'*A. vulgare* observées en cytométrie en flux pour 20 000 évènements. Le SSC-A correspond à la granulométrie, le FSC-A à la taille des cellules. Hémocytes G : granulaires ; hémocytes H : hyalins ; hémocytes SG : semi-granulaires. Graphique obtenu à partir de notre expérience.

Pour se faire, nous avons utilisé des femelles primo-injectées soit avec du PBS, soit avec 10^6 *S. enterica* inactivées (PFA6), ou bien des femelles non-injectées (traitement témoins, T ; Fig. 28). Afin de visualiser l'effet de *S. enterica* vivantes sur les types d'hémocytes, nous avons ajouté un lot de femelles ayant reçu uniquement la DL_{50} (LD50). Nous avons prélevé l'hémolymphe de ces femelles 48h (48H_PI) et 6 jours (6D_PI) après la première injection ainsi que 48h après la DL_{50} (48H_DL50), avec un intervalle de 7 jours entre les deux injections (Fig. 28). Pour chaque prélèvement, nous avons mesuré la concentration totale en hémocytes, les proportions des populations P1 et P2 (*i.e.* les quantités de chaque types d'hémocytes ; Fig. 27), le pourcentage de mortalité à l'intérieur de ces populations, puis la taille et la granulométrie des hémocytes vivants (*cf.* Tab. 10 pour les effectifs). Les échantillons ont été divisés en plusieurs réplicats et séries de prélèvements, dans lesquels tous les temps et tous les traitements ont été répartis équitablement. Nous avons alors comparé les différents types d'hémocytes et leurs paramètres entre les femelles, afin de tester (1) si l'amélioration de survie précédemment observée (*cf.* Chapitre II, partie I) est corrélée à des changements de types d'hémocytes et (2) si ces changements persistent, ou non, depuis la première injection de *S. enterica* inactivées. Le détail de l'analyse cytométrique et des analyses statistiques sont présentés en Box 3 et 4.

.

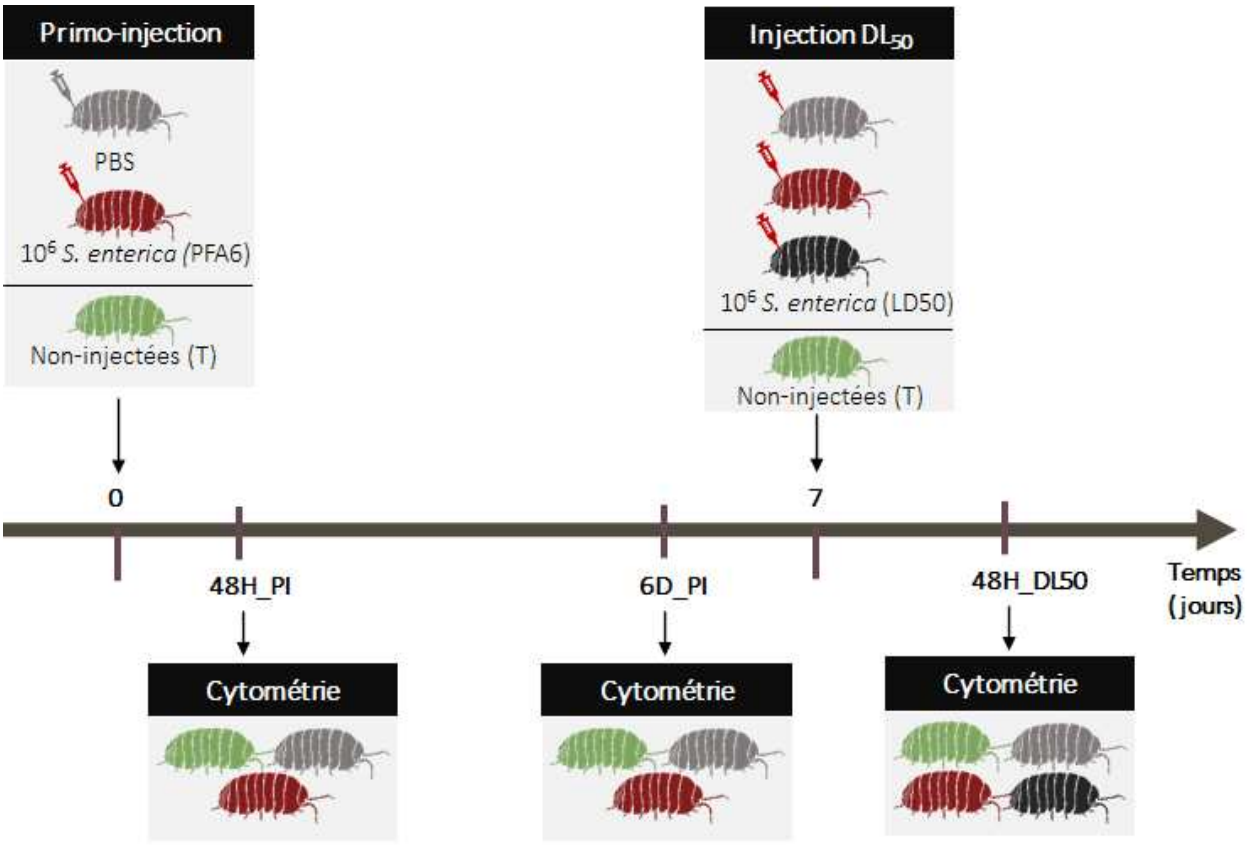


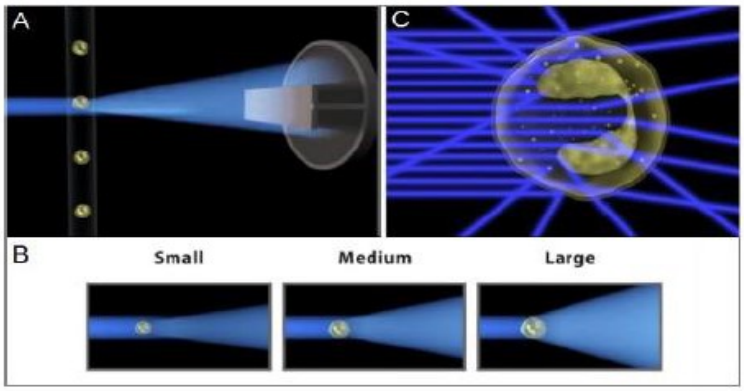
Figure 28. Design expérimental. T : femelles témoins n'ayant jamais étéinjectées ; PBS : femelles primo-injectées avec du PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}.

Tableau 10. Nombre de femelles par traitement pour chaque prélèvement. T : femelles témoins n'ayant jamais été injectées ; PBS : femelles primo-injectées avec du PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}.

	48H_PI	6J_PI	48H_DL50
T	24	23	22
PBS	24	20	19
PFA6	24	24	28
LD50	/	/	21

Box 3. Prélèvements et analyses cytométriques

Les femelles sont lavées avec de l'eau de javel diluée à 0.28% puis rincées deux fois à l'eau. 15 µL d'hémolymphe sont prélevés en perforant dorsalement la cuticule des femelles avec une aiguille minutie, puis déposés directement dans 400 µL de MAS-EDTA (Prigot-Maurice et al., 2019) pour éviter la coagulation des hémocytes. 5 µL d'Iodure de Propidium (IP, 1mg/mL) sont ajoutés dans les tubes et incubés 5 min sur glace. L'IP est un intercalant fluorescent de l'ADN permettant de quantifier le nombre de cellules non viables dans l'échantillon. Les cellules mortes ont une perméabilité membranaire plus élevée, ce qui laisse l'IP pénétrer dans les cellules et s'intercaler dans l'ADN (Rieger et al., 2011). La mortalité des hémocytes est normalisée grâce à un échantillon témoin positif (mortalité provoquée en laissant les hémocytes 3h dans le MAS-EDTA à température ambiante) pour chaque réplicat et chaque série d'expérience. Les résultats sont ensuite obtenus grâce au cytomètre spectral Cytek Aurora (FSC = 30, SSC = 30). Le FSC correspond à la taille des cellules enregistrée par la diffraction du laser lorsque la cellule traverse le capillaire du cytomètre (Schéma A et B). Le SSC donne une indication sur la complexité interne des cellules. Il se mesure par la lumière réfléchie entre le laser et les structures intracellulaires (Schéma C, source : acces.ens-lyon.fr)



Grâce à ces deux paramètres, deux populations de cellules sont identifiées (Fig. 27). Le nombre d'évènements (nombre de particules/hémocytes qui traversent le capillaire) est de 10 000 ou de 20 000. Les doublons (*i.e.* hémocytes coagulés) sont retirés de l'analyse en confrontant l'aire (A) et la hauteur (H) des hémocytes pour le FSC. La taille et la granulométrie des hémocytes sont comparées uniquement pour les cellules vivantes. Les gates (*i.e.* délimitation des populations de cellules) sont réalisées semi-automatiquement avec le logiciel FlowJo©.

Box 4. Analyses statistiques

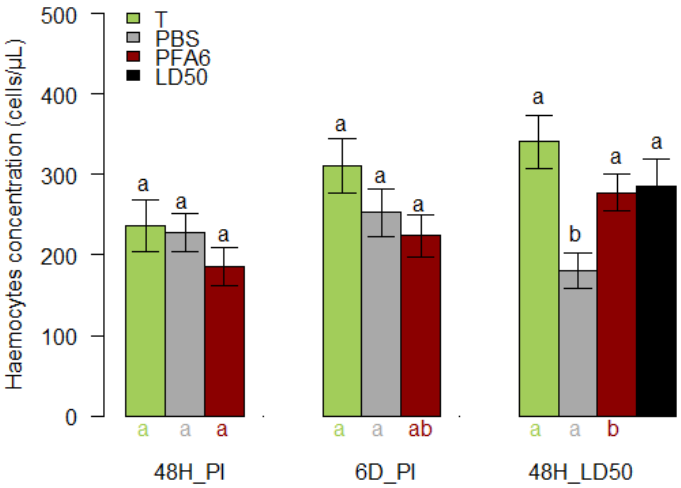
Pour chaque paramètre, nous avons construit un modèle linéaire mixte avec une distribution normale (taille et granulométrie des hémocytes de P1 et P2) ou une distribution de poisson en négative binomiale afin de corriger la surdispersion des données (concentration totale en hémocytes, proportions des populations P1 et P2 et mortalité des hémocytes de P1 et P2). Nous avons renseigné en facteurs fixes le traitement, le moment du prélèvement et leur interaction. Trois facteurs aléatoires nichés sont inclus dans les modèles : le réplicat, la série de prélèvement ainsi que la boîte dans laquelle les individus sont placés. Cela nous permet de considérer la non-indépendance des échantillons au sein d'un même traitement et réplicat (Harrisson, 2018). Pour obtenir les comparaisons deux à deux du même traitement entre les différents temps ou bien entre les traitements au sein du même temps, nous avons réalisé un test de rang avec une correction de Tukey. Toutes les analyses sont réalisées avec le logiciel Rstudio (v.1.4) et les packages *car*, *lsmeans*, *lme4* et *sciplot.*

II.2 – Résultats et discussion

II.2.a – Concentration totale en hémocytes

La concentration totale en hémocytes est influencée par le traitement des femelles (Chisq =10.49, df = 3, p = 0.01), de l'interaction entre le temps écoulé après les injections et le traitement (Chisq = 10.21, df = 4, p = 0.03) mais pas du temps seul (Chisq = 5.55, df = 2, p = 0.06). *A contrario* de notre première expérience de priming immunitaire avec des *S. enterica* vivantes (*cf.* Chapitre I, partie I), les femelles primo-injectées avec des *S. enterica* inactivées ont des concentrations en hémocytes similaires à celles des femelles des autres traitements (Fig. 29). Ce résultat suggère que la perte en hémocytes précédemment observée était causée par l'infection persistante de *S. enterica* vivantes (Prigot-Maurice et al., 2019).

La concentration totale en hémocytes des femelles témoins (jamais injectées) et primo-injectées avec du PBS ne varie pas fonction du temps (Fig. 29 ; voir lettres en couleur). En revanche, la concentration en hémocytes des femelles primo-injectées avec *S. enterica* est plus importante après la DL_{50} de *S. enterica* vivantes comparée à 48h après l'injection de *S. enterica* inactivées (Fig. 29). Bien que la concentration totale en hémocytes chez ces femelles semble augmenter progressivement au cours du temps, cette dernière n'est pas différente de celles des femelles témoins ou des femelles ayant uniquement reçu la DL_{50}, à 48h après la DL_{50} de *S. enterica*. La concentration totale en hémocytes n'explique donc pas la protection résultante du priming immunitaire que nous avons précédemment observée (*cf.* Chapitre II, partie I ; Prigot-Maurice et al., 2019).



Différence de concentration totale en hémocytes (p-value)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.99	0.61	0.001
T vs PFA6	0.45	0.18	0.56
PBS vs PFA6	0.59	0.89	0.04
T vs LD50	/	/	0.73
PBS vs LD50	/	/	0.04
PFA6 vs LD50	/	/	0.99
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.21	0.81	0.49
48h_PI vs 48h_LD50	0.06	0.35	0.02
6j_PI vs 48h_LD50	0.83	0.14	0.35

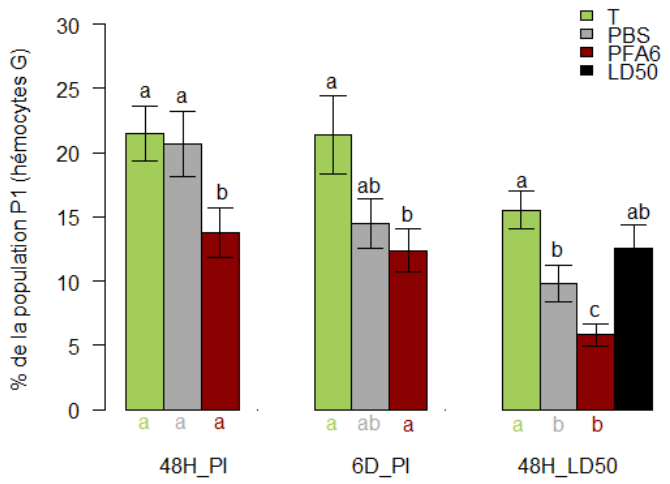
Figure 29. Concentration totale en hémocytes selon les traitements et le temps. T : femelles témoins jamais injectées ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçue uniquement la DL_{50}. **Les lettres en noir indiquent des différences entre les traitements au sein d'un même temps. Les lettres en couleur indiquent des différences au sein du même traitement entre les temps**. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de concentration totale en hémocytes (Tukey range test).

II.2.b – Proportion et paramètres des hémocytes granulaires (P1)

La proportion de la population P1, (*i.e.* la quantité d'hémocytes granulaires vivants et morts), dépend du traitement des femelles (Chisq = 41.37, df = 3, p < 0.0001), du temps (Chisq = 12.23, df = 2, p = 0.002) et de leur interaction (Chisq = 9.30, df = 4, p = 0.05). Quel que soit le temps écoulé après les injections, les femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont moins d'hémocytes granulaires que les femelles non-injectées (Fig. 30). Cette plus faible quantité d'hémocytes granulaires est d'autant plus marquée après la DL_{50} de *S. enterica*.

La plus faible quantité d'hémocytes granulaires chez les femelles primo-injectées avec *S. enterica* pourrait s'expliquer par l'utilisation et l'élimination de ces cellules lors de la première réponse immunitaire. Chez l'écrevisse *Astacus astacus* par exemple, les hémocytes exposés à *Moraxella sp* libèrent leurs granules intracytoplasmiques puis meurt par lyse cellulaire en seulement 1h (Lee & Söderhäll, 1983). Notre hypothèse est notamment appuyée par la mortalité des hémocytes granulaires au sein de la population P1 (Fig. 31). La mortalité de ces hémocytes dépend du traitement (Chisq = 33.79, df = 3, p <0.001) du temps (Chisq = 58.31, df = 2, p<0.001) mais pas de l'interaction entre ces facteurs (Chisq =1.29, df = 4, p = 0.86). Quel que soit le temps, les hémocytes granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* ont une mortalité plus élevée que ceux des femelles non-injectées (Fig. 31). 48h après la DL_{50}, la mortalité des hémocytes granulaires est encore plus importante : parmi les 5% d'hémocytes granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* (Fig. 30), 20% d'entre eux sont morts (Fig. 31). Ce résultat rejoint celui de Xian et al. (2009), où une injection de LPS issus de *S. enterica* chez *L. vannamei* diminue la viabilité des hémocytes.

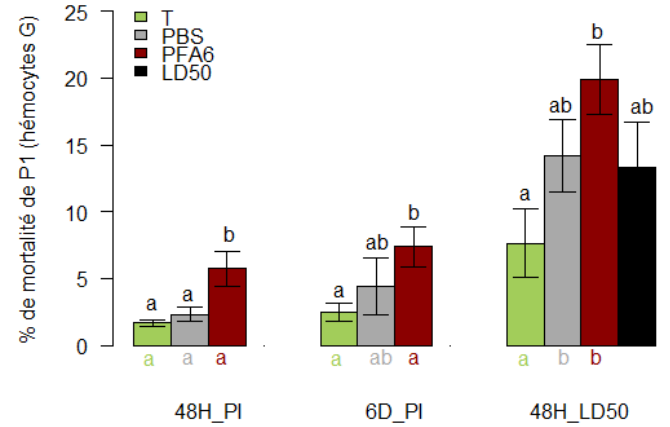
Par ailleurs, la taille des hémocytes granulaires vivants dépend du traitement des femelles (Chisq = 64.92, df = 3, p < 0.0001), du temps (Chisq = 9.71, df = 2, p = 0.007) mais pas de l'interaction entre ces facteurs (Chisq = 3.94, df = 4, p = 0.41). Les hémocytes granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* sont plus grands que ceux des femelles non-injectées, quelques soit le temps écoulé après les injections (Fig. 32). Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat : (1) D'après Depeux et al., (2020), la taille des hémocytes vivants est un marqueur de sénescence chez *A. vulgare*. Plus les hémocytes sont grands et plus ils sont sénescents, car ils atteignent la fin de leur cycle cellulaire (Depeux et al., 2020). Puisque nous nous intéressons ici à la taille des hémocytes vivants, les hémocytes granulaires pourraient être plus sénescents en réponse à l'injection de *S. enterica* inactivées. Cette hypothèse tend à rejoindre les résultats de mortalité, suggérant que ces hémocytes sont utilisés lors de la première réponse immunitaire contre les *S. enterica* inactivées.



Proportion de la population P1 (hémocytes granulaires)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.99	0.12	0.03
T vs PFA6	0.04	0.01	<0.0001
PBS vs PFA6	0.08	0.93	0.01
T vs LD50	/	/	0.38
PBS vs LD50	/	/	0.64
PFA6 vs LD50	/	/	0.0001
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.96	0.20	0.88
48h_PI vs 48h_LD50	0.70	0.01	0.0006
6j_PI vs 48h_LD50	0.84	0.51	0.003

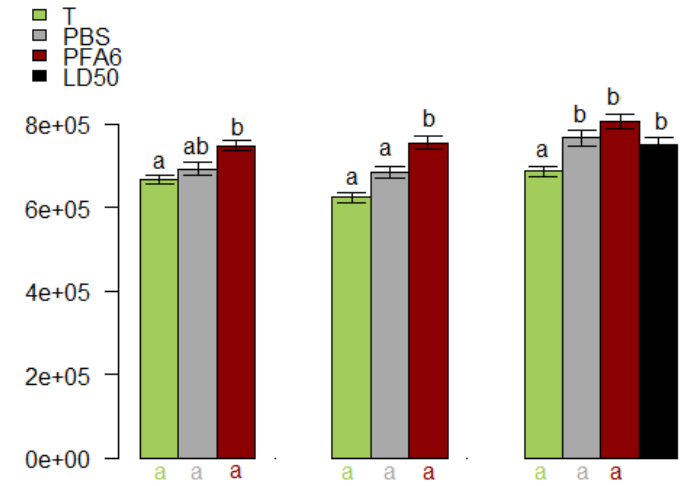
Figure 30. Proportion de P1 (hémocytes granulaires vivants et morts) selon les traitements et le temps. T : femelles témoins jamais injectées ; PBS : femelles primo-injectées au PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées au PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}. Les lettres en noir indiquent les différences entre les traitements au sein d'un même temps. Les lettres en couleur indiquent les différences au sein du même traitement entre les temps. **Tableau** : P-value associées aux comparaisons de proportion de P1 (Test de Tuckey).



Différence de mortalité de P1 (hémocytes granulaires)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.83	0.67	0.24
T vs PFA6	0.004	0.006	0.004
PBS vs PFA6	0.03	0.18	0.58
T vs LD50	/	/	0.27
PBS vs LD50	/	/	0.99
PFA6 vs LD5(	/	/	0.40
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_	0.96	0.20	0.88
48h_PI vs 48l	0.70	0.01	0.0006
6j_PI vs 48h_	0.84	0.51	0.003

Figure 31. Mortalité de P1 (% hémocytes granulaires morts) selon les traitements et le temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de mortalité des hémocytes granulaires (Tukey range test).



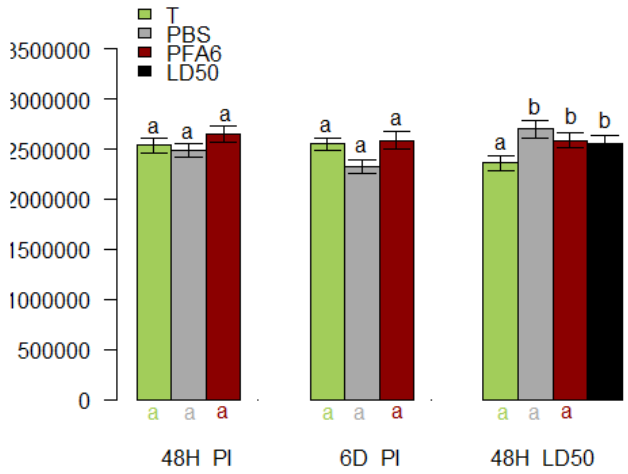
Différence de taille des hémocytes granulaires (p-value)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.72	0.07	0.01
T vs PFA6	0.007	<0.0001	0.0001
PBS vs PFA6	0.10	0.02	0.27
T vs LD50	/	/	0.03
PBS vs LD50	/	/	0.97
PFA6 vs LD50	/	/	0.07
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.28	0.94	0.97
48h_PI vs 48h_LD50	0.95	0.10	0.14
6j_PI vs 48h_LD50	0.23	0.06	0.19

Figure 32. Taille des hémocytes de P1 (hémocytes granulaires vivants) selon les traitements et le temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la taille des hémocytes granulaires (Tukey range test).

(2) L'autre hypothèse est que la taille des hémocytes correspond à une activité immunitaire plus importante. En réponse à des MAMPs, les cellules immunitaires sont soumises à des changements physiologiques, qui peuvent augmenter leur taille (Pollizzi et al., 2015). Les hémocytes granulaires contiennent de grandes granules intracytoplasmiques, à l'intérieur desquelles sont stockés la plupart des précurseurs de la réponse immunitaire humorale (Chevalier et al., 2011). Chez *L. vannamei* par exemple, les hémocytes granulaires stimulés avec des LPS sont plus petits lorsqu'ils libèrent leurs granules dans l'hémolymphe (Xian et al., 2009). Ainsi, nous supposons qu'après la première rencontre avec *S. enterica*, les hémocytes granulaires vivants contiennent un plus grand nombre, ou de plus grosses, granules intracytoplasmiques, ce qui augmenterait leur taille avant de les libérer dans l'hémolymphe.

Pour tester cette hypothèse, nous pouvons utiliser la granulométrie des cellules. Ce paramètre renseigne la quantité de vésicules, d'organelles et de granules intracytoplasmiques (Tzur et al., 2011). Nos résultats montrent que la granulométrie des hémocytes granulaires vivants dépend du traitement des femelles (Chisq = 7.41, df = 3, p = 0.05) et de l'interaction entre le traitement et le temps (Chisq = 14.05, df = 4, p = 0.007), mais pas du temps seul (Chisq = 0.34, df = 2, p = 0.84). Les hémocytes granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* n'ont pas une granulométrie plus élevée comparée à celles des femelles des autres traitements après la première injection (Fig. 33). L'augmentation de la taille des hémocytes granulaires vivants n'est donc pas liée à une plus grande quantité/taille de granules intracytoplasmiques suivant l'injection de *S. enterica* inactivées.



Différence de granulométrie des hémocytes granulaires (p-value)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.96	0.29	0.009
T vs PFA6	0.78	0.97	0.01
PBS vs PFA6	0.50	0.14	0.99
T vs LD50	/	/	0.04
PBS vs LD50	/	/	0.91
PFA6 vs LD50	/	/	0.91
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	1	0.72	0.94
48h_PI vs 48h_LD50	0.22	0.87	0.92
6j_PI vs 48h_LD50	0.22	0.44	0.99

Figure 30. Granulométrie des hémocytes granulaires vivants selon les traitements et le temps. T : femelles témoins jamais injectées ; PBS : femelles primo-injectées avec du PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}. Les lettres en noir indiquent les différences entre les traitements au sein d'un même temps. Les lettres en couleur indiquent les différences au sein du même traitement entre les temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la granulométrie des hémocytes granulaires.

Compte tenu de ce résultat, il se pourrait que les hémocytes granulaires vivants aient déjà libérés leur granules dans l'hémolymphe des femelles avant le premier prélèvement (48H_PI). Dans l'étude de Xiang et al., (2009) par exemple, les hémocytes de *Litopenaeus vannamei* libèrent leurs granules dans les 2 heures suivant l'injection de LPS de *S. enterica*.

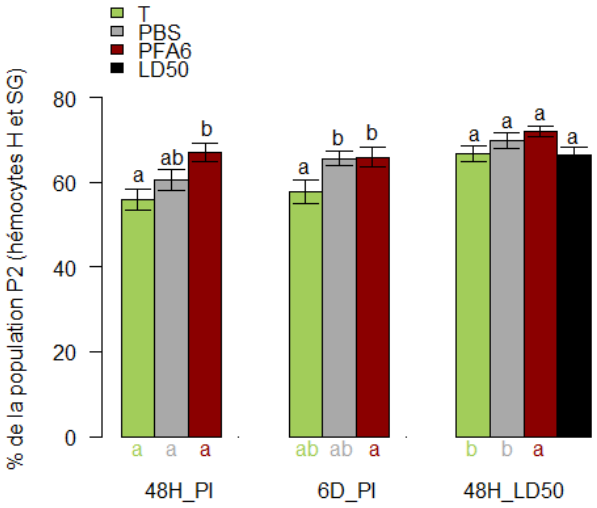
En revanche, nous avons observé que toutes les femelles injectées avec des *S. enterica* vivantes (48h_LD50) ont des hémocytes granulaires plus granuleux que ceux des femelles n'ayant jamais rencontrée *S. enterica* (Fig. 33). Ce résultat suggère que les *S. enterica* vivantes influencent la structure interne des hémocytes granulaires, et donc potentiellement, la quantité ou la tailles des granules intracytoplasmiques.

Il est important de noter que les femelles injectées avec du PBS présentent elles aussi certains changements au sein des hémocytes granulaires. Leur concentration totale en hémocytes et leur proportion d'hémocytes granulaires sont plus faibles après la DL_{50} comparée à celles des femelles n'ayant jamais reçu d'injection ou seulement une DL_{50} (Fig. 29, 30). Après la DL_{50}, la mortalité des hémocytes granulaires, leurs tailles ainsi que leurs granulométries sont équivalentes à celles des femelles primo-injectées avec *S. enterica* (Fig. 31, 32, 33). Ce résultat suggère qu'une première stimulation immunitaire sans pathogène induit des changements cellulaires, qui s'observent notamment lors d'une exposition ultérieure avec des *S. enterica* vivantes. Ceci pourrait expliquer les taux de survie intermédiaire (même si non significatifs), observés pour ce traitement dans notre expérience précédente (*cf.* Chapitre II, partie I). Ces résultats rejoignent ceux de Chakrabarti et al. (2020), montrant qu'une simple blessure stérile protège *D. melanogaster* contre une infection ultérieure par *Enterococcus faecalis*. D'après les auteurs, le priming immunitaire établit chez *D. melanogaster* repose sur une reprogrammation cellulaire des hémocytes (de la voie Toll et de la production de ROS entre autres), sans même qu'ils ne soient en contact avec un pathogène (Chakrabarti et al., 2020).

Nous avons observé que la concentration totale en hémocytes ne varie pas après chaque injection en fonction du traitement que les femelles ont reçu (excepté pour les femelles primo-injectées avec du PBS), mais que les quantités d'hémocytes granulaires sont plus faibles chez les femelles primo-injectées avec des *S. enterica* inactivées ou du PBS. Ainsi, il est attendu que les concentrations et les paramètres de la deuxième population d'hémocytes (*i.e.* les hémocytes hyalins et semi-granulaires) varient également selon les traitements des femelles et le temps écoulé après les injections.

II.2.c – Proportion et paramètres des hémocytes hyalins et semi-granulaires (P2)

La proportion de la population (P2) (*i.e.* la quantité d'hémocytes hyalins et semi-granulaires vivants et morts) dépend du traitement des femelles (Chisq = 27.33, df = 3, p < 0.0001), du temps (Chisq = 9.93, df = 2, p = 0.006) mais pas de l'interaction entre ces facteurs (Chisq = 3.91, df = 4, p = 0.41). 48h et 6 jours après la première injection, les femelles injectées avec des *S. enterica* inactivées ont de plus grandes quantités d'hémocytes hyalins et semi-granulaires que les femelles non injectées (Fig. 34). En revanche, après la DL_{50}, leur quantité en hémocytes hyalins et semi-granulaires est équivalente à celles des femelles des autres traitements (Fig. 34). Cette absence de différence semble s'expliquer par l'augmentation progressive de la quantité d'hémocytes hyalins et semi-granulaires des femelles non-injectées et primo-injectées avec du PBS (Fig. 34).



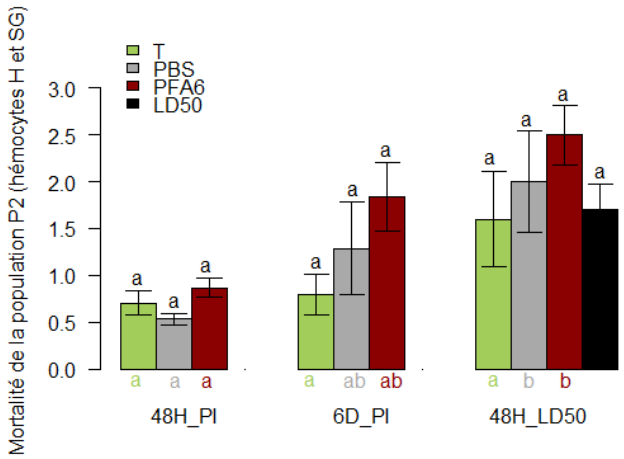
Différence de proportion de la population P2 (p-value)

Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.29	0.03	0.71
T vs PFA6	0.0004	0.02	0.24
PBS vs PFA6	0.10	0.99	0.85
T vs LD50	/	/	0.99
PBS vs LD50	/	/	0.76
PFA6 vs LD50	/	/	0.22
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.80	0.28	0.93
48h_PI vs 48h_LD50	0.01	0.04	0.36
6j_PI vs 48h_LD50	0.06	0.63	0.19

Figure 31. Proportion de P2 (hémocytes hyalins et semi-granulaires vivants et morts) selon les traitements et le temps. T : femelles témoins jamais injectées ; PBS : femelles primo-injectées avec du PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}. Les lettres en noir indiquent les différences entre les traitements au sein d'un même temps. Les lettres en couleur indiquent les différences au sein du même traitement entre les temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la proportion de la population P2 (hémocytes hyalins et semi-granulaires (Test de Tuckey).

Dans la mesure où la concentration totale en hémocytes est similaire entre les femelles des différents traitements (Fig. 29), ce résultat met en évidence que l'injection de *S. enterica* inactivées stimule de manière soutenue dans le temps la production d'hémocytes hyalins et semi-granulaires. Ces derniers augmentent en proportion, tandis que la proportion d'hémocytes granulaires diminue *via* une mortalité en hémocytes plus élevée (Fig. 30, 31). Nos résultats tendent à rejoindre ceux de Maftuch et al. (2013), montrant qu'une injection de *Vibrio alginolyticus* inactivées chez *Penaeus monodon* induit une prolifération des hémocytes hyalins, au dépend des hémocytes granulaires.

La mortalité des hémocytes hyalins et semi-granulaires au sein de la population P2 est en accord avec cette supposition. La mortalité des hémocytes hyalins et semi-granulaires dépend du traitement (Chisq = 8.45, df =3, p = 0.03), du temps (Chisq = 24.36, df = 2, p < 0.001) mais pas de l'interaction entre les traitements (Chisq = 2.18, df =4, p = 0.70). Les hémocytes hyalins et semi-granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* n'ont pas une mortalité plus élevée que ceux des femelles des autres traitements (Fig. 35), que ce soit avant ou après la DL_{50}. Cependant, la mortalité des hémocytes hyalins et semi-granulaires des femelles primo-injectées avec *S. enterica* augmente après la DL_{50}, comparée à 48h après l'injection de *S. enterica* inactivées. Ce résultat suggère que l'injection de *S. enterica* vivantes conduit à une plus grande perte en hémocytes hyalins et semi-granulaires par rapport à l'injection de *S. enterica* inactivées chez les femelles du même traitement.

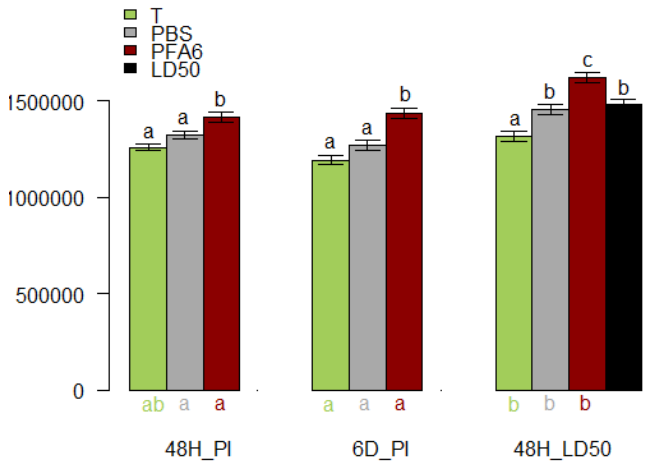


Différence de mortalité de P2 (hémocytes hyalins et semi-granulaires)

Traitements	**48h_PI**	**6j_PI**	**48h_LD50**
T vs PBS	0.90	0.60	0.92
T vs PFA6	0.95	0.09	0.34
PBS vs PFA6	0.63	0.71	0.76
T vs LD50	/	/	0.99
PBS vs LD50	/	/	0.94
PFA6 vs LD50	/	/	0.36
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.98	0.10	0.10
48h_PI vs 48h_LD50	0.09	0.003	0.003
6j_PI vs 48h_LD50	0.14	0.43	0.42

Figure 32. Mortalité de P2 (% hémocytes hyalins et semi-granulaires morts) selon les traitements et le temps. T : femelles témoins jamais injectées ; PBS : femelles primo-injectées avec du PBS ; PFA6 : femelles primo-injectées avec 10^6 *S. enterica* inactivées avec du PFA 4% ; LD50 : femelles ayant reçues uniquement la DL_{50}. Les lettres en noir indiquent les différences entre les traitements au sein d'un même temps. Les lettres en couleur indiquent les différences au sein du même traitement entre les temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la mortalité des hémocytes hyalins et semi-granulaires (Tukey range test).

La taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires dépend du traitement des femelles (Chisq = 115.68, df = 3, p < 0.0001), du temps (Chisq = 34.10, df = 2, p < 0.0001) mais pas de l'interaction entre ces facteurs (Chisq = 6.34, df = 4, p = 0.17 ; Fig. 36). Les femelles primo-injectées avec des *S. enterica* inactivées ont des hémocytes hyalins et semi-granulaires plus grands que ceux des femelles des autres traitements, quel que soit le temps après les injections (Fig. 36). La taille des hémocytes de ces femelles est encore plus importante après la DL_{50} de *S. enterica* vivantes, comparé à 48h après l'injection de *S. enterica* inactivées (Fig. 36).



Différence de taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires

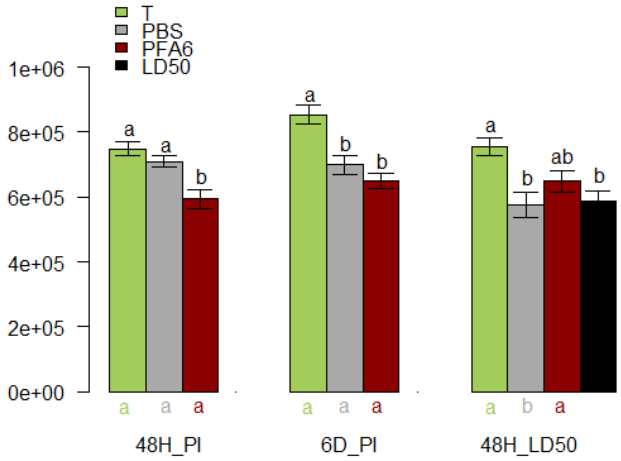
Traitements	48h_PI	6j_PI	48h_LD50
T vs PBS	0.29	0.16	0.01
T vs PFA6	0.0003	<0.0001	<0.0001
PBS vs PFA6	0.05	0.0004	0.0005
T vs LD50	/	/	0.0009
PBS vs LD50	/	/	0.88
PFA6 vs LD50	/	/	0.0025
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.33	0.53	0.91
48h_PI vs 48h_LD50	0.32	0.02	0.001
6j_PI vs 48h_LD50	0.03	0.004	0.003

Figure 33. Taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires vivants selon les traitements et le temps entre les temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires (Tukey range test).

Face à ce résultat, nous ne pouvons déterminer si ce sont les mêmes hémocytes qui augmentent progressivement leur taille durant l'expérience ou bien si ce sont de nouveaux hémocytes libérés par les organes hématopoïétiques qui ont initialement une taille plus grande. Dans les deux cas, la présence de *S. enterica* (inactivées ou vivantes) modifie la morphologie des hémocytes hyalins et semi-granulaires.

Chez les Crustacés, les hémocytes hyalins et semi-granulaires assurent principalement la phagocytose et l'encapsulation (Chevalier et al., 2011 ; Herbinière, 2005 ; Söderhäll et al., 1986 ; Smith et Söderhäll, 1983 ; Söderhäll et al., 1985 ; Kobayashi et al., 1990 ; Johansson et al., 2000). Chez les Vertébrés, la phagocytose stimule le cycle cellulaire des macrophages, qui deviennent d'autant plus grands qu'ils avancent dans leur cycle (Luo et al., 2006 ; Al-Jumaa et al., 2020). Une fois leur taille augmentée, la disponibilité en récepteurs immunitaires est plus importante (chez les macrophages et les neutrophiles), ce qui est supposé augmenter leur réactivité (Luo et al., 2006 ; Al-Jumaa et al., 2020). De manière intéressante, le priming immunitaire interfère également avec le cycle cellulaire chez le moustique *A. albimanus* (Maya-Maldonado et al., 2021). Dans notre étude, la plus grande taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires vivants des femelles injectées avec *S. enterica* pourrait alors refléter des capacités de phagocytose plus importantes. Les hémocytes semi-granulaires représentent 87% de la population P2 et produisent des granules intracytoplasmiques (Chevalier et al., 2011). Ainsi, il se pourrait que leur taille reflète la quantités et/ou la taille de leurs granules. Pour tester cette hypothèse, nous pouvons de nouveau utiliser la granulométrie des hémocytes. Si le nombre ou la taille des phagosomes/ granules sont plus importants en réponse à *S. enterica*, alors nous nous attendons à ce que la granulométrie des hémocytes hyalins et semi-granulaires soit plus élevée.

Or, ce n'est pas ce que nous observons. La granulométrie des hémocytes hyalins et semi-granulaires dépend du traitement des femelles (Chisq = 52.67, df = 3, p < 0.0001), de l'interaction entre le temps et le traitement (Chisq = 17.54, df = 4, p = 0.001), mais pas du temps seul (Chisq = 0.18, df = 2, p = 0.18). À 48h et 6 jours après la première injection, les femelles injectées avec des *S. enterica* inactivées ont des hémocytes hyalins et semi-granulaires moins granuleux que les femelles non injectées (Fig. 37). Cette différence de granulométrie n'est plus observée 48h après la DL_{50} de *S. enterica* vivantes.



Différence de granulométrie des hémocytes hyalins et semi-granulaires

Traitements	**48h_PI**	**6j_PI**	**48h_LD50**
T vs PBS	0.73	0.001	0.001
T vs PFA6	0.0007	<0.0001	0.26
PBS vs PFA6	0.01	0.55	0.16
T vs LD50	/	/	0.004
PBS vs LD50	/	/	0.97
PFA6 vs LD50	/	/	0.28
Temps	**T**	**PBS**	**PFA6**
48h_PI vs 6j_PI	0.14	0.97	0.50
48h_PI vs 48h_LD50	0.91	0.03	0.46
6j_PI vs 48h_LD50	0.08	0.05	0.99

Figure 34. Granulométrie des hémocytes hyalins et semi-granulaires selon les traitements et le temps. **Tableau** : p-value associées aux comparaisons de la taille des hémocytes hyalins et semi-granulaires (Tukey range test).

Ce résultat va à l'encontre de notre hypothèse stipulant que les hémocytes hyalins et semi-granulaires seraient plus grands en raison d'une phagocytose et/ou d'une production de granules plus élevées. Toutefois, la granulométrie mesurée *via* la cytométrie en flux n'est pas un marqueur de phagocytose. Pour confirmer ou infirmer notre précédente hypothèse, nous pourrions mesurer les capacités de phagocytose des hémocytes en quantifiant le nombre de *S. enterica* à l'intérieur des hémocytes grâce à un marquage fluorescent des bactéries (Ma et al., 2011 ; Wang et al., 2019). Par ailleurs, si nous n'observons pas de différence de granulométrie, il se pourrait que les hémocytes semi-granulaires aient déjà libéré leurs granules dans l'hémolymphe au moment où nous comparons leur morphométrie.

De la même manière que pour les hémocytes granulaires, nous observons que l'injection de PBS influence les paramètres des hémocytes hyalins et semi-granulaires (Fig. 34, 35, 36, 37,). Une fois de plus, ces résultats suggèrent qu'une première stimulation sans pathogène peut déclencher des changements cellulaires suivant la seconde infection de *S. enterica*, mais cela ne permet pas d'améliorer significativement les capacités de survie de ces femelles (*cf.* Chapitre II, partie I).

II.3 – Conclusion

Nous avons démontré qu'une primo-injection de *S. enterica* inactivées modifie les proportion des populations d'hémocytes d'*A. vulgare* : les hémocytes hyalins et semi-granulaires sont plus abondants, au détriment des hémocytes granulaires qui ont une mortalité plus élevée comparée aux hémocytes des femelles des autres traitements. Cette différence de proportion se maintient de manière soutenue jusqu'à l'infection de *S. enterica* vivantes.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature, montrant que la proportion d'hémocytes phagocytaires ou de cette activité est liée à un priming immunitaire chez les crustacés (Wang et al., 2019 ; Pope et al., 2011, Lin et al., 2013 ; Roth et al., 2009). Chez le poulet *Gallus gallus domesticus*, une injection de *Salmonella enteritidis* vivantes ou inactivées déclenche également une augmentation de la proportion des monocytes, cellules de l'immunité innée assurant en partie la phagocytose (Bérto et al., 2015). Les hémocytes hyalins et semi-granulaires d'*A. vulgare* ont probablement des activités immunitaires plus appropriées pour lutter efficacement contre *S. enterica*.

D'après nos résultats, l'abondance des hémocytes hyalins et semi-granulaires pourraient être expliquée par une différenciation préférentielle de ces hémocytes, déclenchée lors de la première rencontre avec les *S. enterica* inactivées (Rodrigues et al., 2010). Cette différenciation pourrait être stimulée soit (1) par la reconnaissance des MAMPs de *S. enterica*, mais aussi (2) par les hémocytes granulaires. Chez *A. gambiae*, les hémocytes des individus primo-injectés avec *Plasmodium* sécrètent des facteurs solubles, déclenchant une différenciation cellulaire de certain type d'hémocytes (Ramirez et al., 2014 ; Rodrigues et al., 2010). Chez les crustacés, les produits de la phénoloxydase et les peptides antimicrobiens libérés par les hémocytes granulaires stimule la phagocytose des autres types d'hémocytes (Söderhäll & Aspán, 1993, Söderhäll et al., 1990 ; Liu et al., 2020 ; Kulkarni et al., 2021). Dans notre expérience, nous avons observé que les hémocytes granulaires ont des concentrations réduites et des mortalités plus élevées chez les femelles primo-injectées avec des *S. enterica*. Il se pourrait donc que ces derniers stimulent la production et/ou l'activité phagocytaire des hémocytes hyalins et semi-granulaires. De plus, il s'avère que chez *G. mellonella*, une infection de *S. enterica* stimule la production de ROS et surrégule de l'expression des gènes de peptides antimicrobiens des individus (Bismuth et al., 2021, Viegas et al., 2013). Ainsi, compte tenu de la plus faible quantité d'hémocytes granulaires et de leur mortalité plus élevée en réponse à l'injection de *S. enterica* inactivées, nous pouvons

supposer que des réponses immunitaires humorales participent également au priming immunitaire des femelles *A. vulgare*. Alors que de nombreuses études essayent de distinguer les mécanismes du priming immunitaire *via* l'analyse de réponses humorales ou cellulaires, il s'avère que ces deux types de réponses immunitaires peuvent être intimement liées dans l'expression du priming immunitaire (Yi et al., 2019 ; Schulenburg et al., 2007).

Bien que cette expérience nous apporte des informations sur la réponse cellulaire associée à une injection de *S. enterica* inactivées, des analyses complémentaires sont nécessaires pour affirmer ou infirmer nos hypothèses concernant les réponses immunitaires sous-jacentes. Il serait pertinent de mesurer le taux de prolifération des hémocytes, ainsi que de contrôler la persistance des MAMPs de *S. enterica* dans l'hémolymphe des femelles. Quoi qu'il en soit, ces changements dans les populations d'hémocytes perdurent depuis la première injection de *S. enterica* inactivées jusqu'à l'injection de bactéries vivantes. Nous supposons une fois de plus que le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica* repose sur une réponse immunitaire soutenue des hémocytes. Il n'est cependant pas exclu qu'une réponse immunitaire bimodale soit mise en place sur d'autres paramètres immunitaires que nous n'avons pas explorés (*e.g.* capacités de phagocytose, production de peptides antimicrobiens, phénoloxydase, etc.). Chez le crabe *Eriocheir sinensis*, les capacités de phagocytose des individus durant une infection par *Aeromonas hydrophila* suivent notamment une réponse bimodale en l'espace de 7 jours (Wang et al., 2019).

Au sein des deux chapitres précédents, nous avons exploré la phénoménologie et le support cellulaire du priming immunitaire d'*A. vulgare*. Cependant, ces résultats ne concernent que la relation qu'il existe entre *A. vulgare* et *S. enterica*. Nous ignorons si *A. vulgare* est capable d'un priming immunitaire contre d'autres pathogènes, et lesquels.

CHAPITRE III

Le priming immunitaire d'*A. vulgare* s'exprime-t-il contre d'autres pathogènes ?

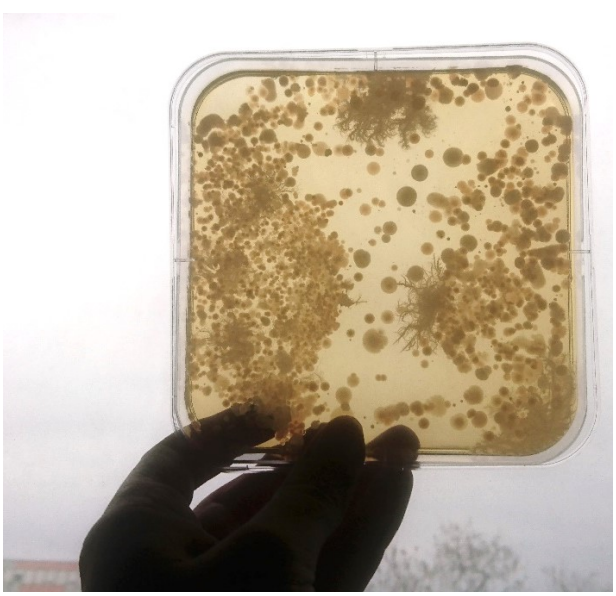


Photo : *A. vulgare* mâles, sain (dessus) et infecté (dessous) par l'IIV-31. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice

Prologue

Dans ce chapitre, nous avons essayé de généraliser le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre d'autres micro-organismes pathogènes pour cette espèce. Pour cela, nous avons d'abord recherché des pathogènes naturels d'*A. vulgare*, en purifiant et en identifiant des bactéries commensales issues de l'hémolymphe et du tube digestif d'*A. vulgare*. Puis, afin de connaître leur pathogénie, nous les avons injectées à forte dose dans l'hémolymphe de femelles *A. vulgare*. Plusieurs de ces bactéries ont été sélectionnées pour tester ultérieurement le priming immunitaire d'*A. vulgare* contres ces dernières.

Dans un deuxième temps, nous avons testé le priming immunitaire d'*A. vulgare* avec deux autres pathogènes connus : *Listeria ivanovii*, une bactérie intracellulaire à gram (+) et l'Invertebrate Iridovirus 31 (IIV-31), un virus naturellement présent dans les populations d'isopodes terrestres. *Wolbachia* (une bactérie endosymbiotique répandue chez les isopodes terrestres) est connue pour protéger son hôte contre certains virus. Nous avons alors également testé si *Wolbachia* protège *A. vulgare* de l'IIV-31. Pour se faire, nous avons réalisé des injections homologues, sur des femelles et des mâles asymbiotiques ainsi que sur des femelles symbiotiques (*i.e.* hébergeant *Wolbachia*) puis nous avons relevé leur taux de survie.





Photos : Gauche : bactéries aérobies issues du tube digestif d'*A. vulgare*, Droite : *Acinetobacter sp* isolée et purifiée. Crédit Photo : Cybèle Prigot-Maurice

I. RECHERCHE DE PATHOGÈNES NATURELS CHEZ *A. VULGARE*

[Avec le support technique de G. Dias, stagiaire de M1 (avril-juin 2021), M. Raimond et C. Delaunay]

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Dans la littérature, très peu de pathogènes naturels d'isopodes terrestres sont décrits (Tab. 11). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce constat : (1) il est difficile de déceler si les individus de milieux naturels meurent d'infections et par quels pathogènes puisque, (2) l'écologie de ces organismes les confrontent continuellement à divers micro-organismes contre lesquels ils pourraient avoir sélectionné une résistance et/ou une tolérance accrue(s) (*cf*. Introduction, partie III.1) ; (3) leurs caractéristiques biologiques se prêtent à la sélection d'un priming immunitaire (*cf.* Introduction, partie II.4, III.1), ce qui expliquerait pourquoi ces organismes sont peu sujets aux infections ; (4) les recherches fondamentales sur les isopodes terrestres se focalisent principalement sur la terrestrialisation, le déterminisme du sexe ou encore la symbiose à *Wolbachia* et non sur les infections par des pathogènes et, (5) *Wolbachia*, ou tout autre symbiote issus du microbiote, pourrait protéger les isopodes terrestres contre les micro-organismes pathogènes (Prigot-Maurice et al., 2021 ; 2022).

Tableau 11. Pathogènes naturels d'isopodes terrestres décrits à ce jour dans la littérature.

Pathogène	Type	Chez *A. vulgare*	Références
Rickettsiella	Bactérie à gram (-)	oui	Federici, 1984 ; 1980 ; Drobne et al., 1999 ; Cordaux et al., 2007
Thaumamermis cosgrovei	Nématode parasite	oui	Federici, 1984 ; Poinar, 1981
Invertebrate Iridovirus 31	Virus à ADN	oui	Federici, 1984
Rhabdochlamydia porcellionis	Bactérie à gram (-)	non	Kostanjsek et al., 2004 ; Kostanjsek & Marolt, 2015

Ce manque de pathogènes naturels identifiés comme tels chez *A. vulgare* devient rapidement un frein à l'étude du priming immunitaire chez cette espèce.

Un moyen d'identifier des pathogènes naturels est de s'intéresser aux bactéries commensales retrouvées à l'intérieur ou dans l'environnement des individus (Hernandez et al., 2018 ; Yu et al., 2019). Par définition, le commensalisme est une relation symbiotique dans laquelle un des deux partenaires tire des bénéfices, tandis que l'autre n'y voit ni avantages, ni inconvénients (Casadevall & Pirofski, 2000.). Les bactéries commensales profitent de leur hôte pour la niche écologique qu'il leur apporte, sans induire d'effets négatifs ou positifs pour l'hôte. Cependant, les bactéries commensales peuvent devenir des pathogènes opportunistes (Lood et al., 2015 ; Stevens et al., 2021). Ce phénomène peut se produire si (1) des mutations au sein de gènes de virulence apparaissent sous les pressions de sélections qu'exerce le système immunitaire de l'hôte, mais aussi si (2) ces bactéries se retrouvent dans des compartiments où elles ne sont normalement pas présentes (Miskinyte et al., 2013 ; Hube, 2004 ; Proença et al., 2017 ; Yu et al., 2019 ; Lood et al., 2015). Chez *G. mellonella*, l'injection de *E. faecalis* dans l'hémolymphe provoque une certaine mortalité des individus, alors que cette bactérie n'est pas pathogène lorsqu'elle est naturellement présente dans le tube digestif (Mason et al., 2011). De manière intéressante, un priming immunitaire peut s'établir contre des bactéries commensales devenues pathogènes. Chez *A. gambiae,* deux bactéries commensales du tube digestif, *Serratia fonticola* et *Enterobacter sp,* deviennent pathogènes une fois injectées dans l'hémolymphe (Kulkarni et al., 2021). Cependant, lorsque ces bactéries sont d'abord administrées oralement, elles déclenchent un priming immunitaire qui protège les individus contre une infection systémique ultérieure par ces mêmes bactéries (Kulkarni et al., 2021). Ainsi, il se pourrait que certaines bactéries commensales d'*A. vulgare* deviennent pathogènes lorsqu'elles atteignent la circulation générale (*i.e.* l'hémolymphe des individus) et donc, un priming immunitaire pourrait être sélectionné contre ces bactéries dites « pathogènes opportunistes ».

Dans le but déterminer des bactéries pathogènes opportunistes d'*A. vulgare*, nous avons d'abord prélevé l'hémolymphe ou le tube digestif de mâles et de femelles *A. vulgare*, provenant soit de l'élevage du laboratoire, soit du milieu naturel (Ligugé, 46.530788, 0.320146). Ces prélèvements ont ensuite été déposés dans du milieu de culture liquide BHI (pour Brain Heart Infusion), puis étalés sur des boîtes de BHI agar à plusieurs températures (20, 28 ou 37°C), afin de pouvoir cibler un plus large spectre de bactéries cultivables. Compte tenu du nombre de bactéries qui se sont développées, nous avons sélectionné quelques-unes d'entre elles selon une différenciation phénotypique, visuelle, des CFU (Fig. 38). Puis, nous les avons purifiées (*i.e.* isolées de manière à n'obtenir qu'une seule souche bactérienne pure

dans l'échantillon) en transposant à plusieurs reprises une seule CFU de la souche sur une nouvelle boîte de LB agar (Fig. 38), à différente température (20, 28 et 37°C).



Figure 35. Bactéries isolées et purifiées selon le phénotype visuel des CFU. Boîte 136 : *E. coli*. Boîte 151 : *Raoultella planticola*. Boîte 86 : *Pantoea agglomerans*. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice.

Afin de vérifier la purification et d'identifier les souches bactériennes isolées, nous avons séquencé leur ADN 16s (*cf.* Box 5). Une fois les séquences obtenues, nous les avons comparées avec celles de la banque de données génétiques du NCBI (National Center for Biotechnology Information), grâce à l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Parmi une vingtaine de souches isolées (*cf.* Annexe 3), nous n'avons retenu que 7 d'entre elles pour tester leurs pathogénies, car elles présentaient une séquence unique (*i.e.* elles étaient correctement purifiées) et leurs taux d'homologie de séquence avec celles de la banque de données étaient de plus de 99.5% (*cf.* Annexe 3), nous indiquant avec fiabilité la souche bactérienne à laquelle elles appartiennent.

Nous avons ensuite testé si ces bactéries sont des pathogènes opportunistes d'*A. vulgare*. Pour cela, nous avons injecté chacune de ces bactéries vivantes dans l'hémolymphe de 10 femelles de 1 an (+/-2 mois ; soit un total de 70 femelles). Les injections et l'ajustement des doses (environ 10^6 bactéries/100 nL) ont été réalisés selon les mêmes protocoles que pour *S. enterica* (*cf.* Chapitre I, partie I ; Prigot-Maurice et al., 2019). Les femelles ont été maintenues sur du terreau humide avec des feuilles de tilleul *ad libitum*. Afin de déterminer la mortalité résultante des injections, la survie des femelles a été relevée tous les jours durant 7 jours.

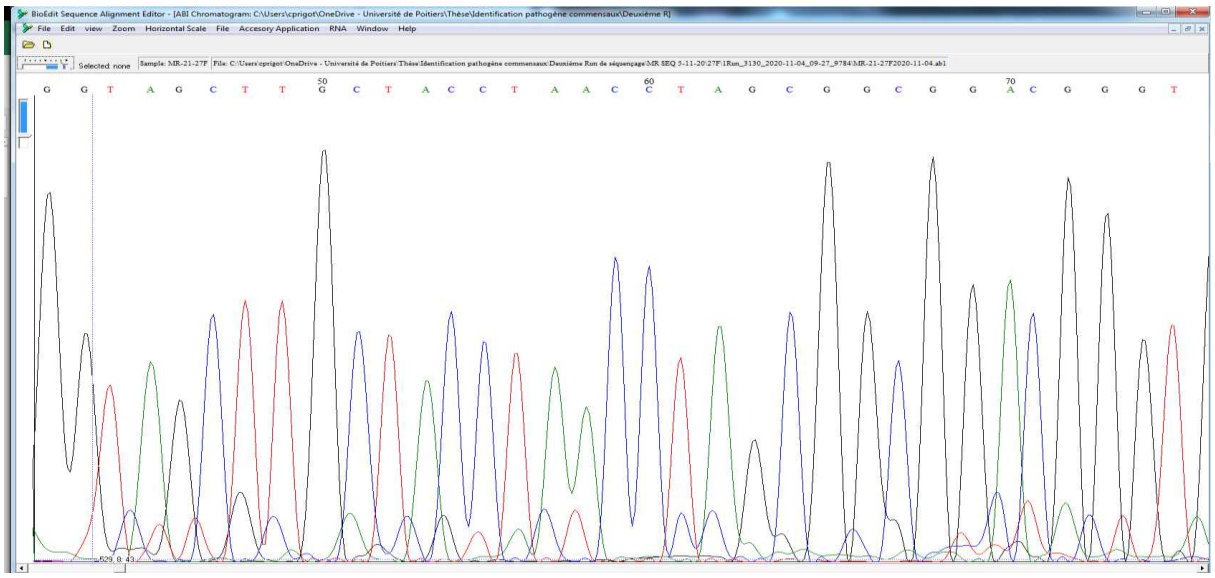
Box 5. Extraction d'ADN et préparation des souches bactériennes pour le séquençage.

Une fois les souches bactériennes purifiées, 0.5 µL de culture bactérienne sont déposés dans 24.5 µL de Mix PCR (Polymérase Chain Reaction) contenant 5 µL de tampon 5x, 0.5 µL de DNTP, 2.5 µL d'amorce 1492R, 2.5 µL d'amorce 27F, 0.125µL de GoTaq, et de l'eau qsp. Les amorces 1492R et 27F (10 µM) sont des séquences universelles permettant de cibler l'ADN 16s bactérien. Les fragments d'ADN bactériens sont ensuite amplifiés grâce à une incubation de 3 min à 95°C, 35 fois 30 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 1 min à 72°C puis 5 min à 72°C.

Afin de vérifier l'amplification de l'ADN, 2 µL de tampon de charge sont déposés dans les produits de PCR puis 5 µL de cette solution sont déposés dans un gel d'agarose (1.5%), accompagnés de 5 µL de marqueur de taille (SmartLeader). Le gel est placé dans une cuve à électrophorèse contenant un tampon TAE 0.5X durant 30 min. Une fois que les échantillons ont migrés, le gel d'agarose est incubé 15 min dans un bain de Bromure d'Éthidium (intercalant de l'ADN). Le gel est ensuite observé aux UV et la présence d'ADN bactérien est indiqué si une bande apparaît pour la taille considérée. Les échantillons sont ensuite purifiés en ajoutant 2 µL de Mix ExoANP (0.5 µL d'exonucléase, 0.1 µL d'ANP et 1.85 µL d'eau stérile) puis incubés 1h à 37°C et 20 min à 80°C.

Pour la réaction de séquençage, les produits PCR purifiés sont dilués au 1/10ème. Une réaction de séquençage pour chaque amorce est réalisée en déposant 12 µL de Mix (0.5 µL de BDT, 0.35 µL d'amorce (10µM), 3 µL de tampon BDT 0.5x, 8.18 µL d'eau stérile) dans 3 µL de produit PCR. Les échantillons sont incubés 30 sec à 96°C, puis 25 fois 45 sec à 96°C, 30 sec à 55°C, 4 min à 60°C. Les solutions obtenues sont de nouveau purifiées en ajoutant 62 µL de Mix (2.2 µL d'AcNa 3M, 50 µL d'éthanol 100% et 10 µL d'eau stérile). Les échantillons sont précipités 20 min à température ambiante, puis centrifugés 30 min à 3 000 g, 20°C. Les culots sont lavés avec 90 µL d'éthanol 70% froid puis repris dans 15 µL de Formamide durant 30 min. Les échantillons sont finalement homogénéisés puis dénaturés 3 min à 95°C avant d'être séquencés *via* un séquençage Sanger.

Les séquences nucléotidiques sont obtenues *via* le logiciel BioEdit (image ci-dessous). Chaque pic de fluorescence représente une base d'ADN (A, T, G ou C) identifiée par le séquenceur.



I.2 – Résultats et discussion

La plupart des souches purifiées et identifiées sont des Entérobactéries communément retrouvées dans le sol et le tube digestif de diverses espèces animales, excepté *A. kashmirensis* et *P. marincola* (Tab. 12). Ces deux bactéries ne semblent pas être retrouvées chez des invertébrés terrestres, et très peu d'informations sur ces dernières sont disponibles dans la littérature.

Tableau 12. Brèves descriptions des souches bactériennes purifiées chez *A. vulgare*.

Souche bactérienne	Ancienne classification	Caractéristiques relatées aux invertébrés	Référence
Advenella kashmirensis	*Tetrathiobacter kashmirensis*	Chimio-lithotrophe utilisant pour ressources les substrats inorganiques. Retrouvée dans les sols	Gosh et al., 2005,
Buttiauxella gaviniae	*Citrobacter sp.*	Communément retrouvée dans les sols et le tube digestif d'invertébrés (*e.g. Helix pomatia*, *Aporrectodea caliginosa*)	Ferragut et al., 1981 Müller et al., 1996 Byzov et al., 2009
Acinetobacter lwoffii	*Mima polymorpha* *Acinetobacter calcoaceticus*	Commensale, pathogène opportuniste de Vertébrés et d'invertébrés (*e.g. Galleria mellonella*, *Folsomia candida*, *Blatta orientalis)*	Tas et al., 2017. Agamennone et al., 2019 Ozdal et al., 2016
Raoultella planticola	*Klebsiella planticola*	Communément retrouvée dans l'eau, les sols, plantes et invertébrés (*e.g. Periplaneta americana*, *Peridroma saucia)*	Akbari et al., 2015 Amstrong et al., 1989 Kim et al., 2012
Pseudomonas marincola	/	Initialement identifiée et décrite chez *Ophiura*. Détectée dans les environnements marins	Romanenko et al., 2008
Pantoea agglomerans	*Erwinia herbicola* *Enterobacter agglomerans*	Pathogène opportuniste de végétaux. Très répandue au sein des espèces animales. Symbiote protecteur chez *Schistocerca gregari*. Induit un priming immunitaire chez *P. japonicus*	Dutkiewicz et al., 2003 ; Dillon & Charnley, 1995 ; Loncaric et al., 2009 ; Ishimaru et al., 1988 ; Takahashi et al., 2000
Escherichia coli	/	Très ubiquiste, retrouvée dans l'eau et les sols contaminés de matières fécales. Commensale et pathogène opportuniste chez les animaux. Souvent utilisée en tant que pathogène chez les invertébrés	Ali et al., 2021 ; Odonkor & Ampofo, 2013 ; Cooke, 1985

Nos résultats de mortalité montrent que la plupart des souches bactériennes sont pathogènes pour *A. vulgare* lorsqu'elles sont injectées à forte dose dans l'hémolymphe (Tab. 13). Cependant, pour des doses injectées relativement similaires, les souches n'induisent pas les mêmes taux de mortalité (Tab. 13).

Tableau 13. Souches identifiées et mortalité induite chez *A. vulgare*. Homologie : nombre de bases identiques aux séquences nucléotidiques d'ADN comparées avec les bases de données du NBCI. Dose injectée : nombre de bactéries vivantes injectées dans 100 nL. Mortalité : pourcentage d'individus morts sur un total de 10 individus par souche en 7 jours. Les souches ont toutes été cultivées à 20°C.

Sexe	Provenance	Prélèvement	Souche	Homologie	Dose injectée	Mortalité (%)
Mâle	Ligugé	Tube digestif	***Advenella kashmirensis***	100.00%	$> 10^7$	0
Mâle	Ligugé	Tube digestif	***Buttiauxella gaviniae***	100.00%	1.10^6	15
Femelle	Ligugé	Tube digestif	***Acinetobacter lwoffii***	100.00%	$1,5.10^6$	30
Femelle	Élevage	Tube digestif	***Raoultella planticola***	100.00%	$1,4.10^6$	30
Mâle	Ligugé	Tube digestif	***Pseudomonas marincola***	99.55%	/	40
Mâle	Élevage	Hémolymphe	***Pantoea agglomerans***	100.00%	9.10^5	80
Femelle	Élevage	Tube digestif	***Escherichia coli***	100.00%	$4,9.10^5$	80

D'après les modèles théoriques, le priming immunitaire devrait être particulièrement sélectionné contre des pathogènes virulents, chez des hôtes ayant une longue durée de vie (Best et al., 2013 ; Tidbury et al. 2011). Parmi les bactéries les mieux identifiées (% d'homologie de séquence égale à 100, Tab. 13) celles qui induisent le plus de mortalité chez *A. vulgare* sont *E. coli*, *P. agglomerans* et *R. planticola* (Tab. 13). *E. coli* est une bactérie très ubiquiste souvent utilisée pour tester les réponses immunitaires chez les invertébrés (Tab. 12). *P. agglomerans* est bien moins décrite en tant que pathogène d'invertébrés. Cependant, l'injection répétée de LPS issus de *P. agglomerans* déclenche un priming immunitaire chez la crevette *P. japonicus*, la protégeant ultérieurement contre le PRDV virus (Penaeid Rod Shaped DNA Virus ; Takahashi et al., 2000). *R. planticola* quant à elle, est une bactérie proche du genre *Klebsiella*. Les *Klebsiella* peuvent être des pathogènes opportunistes et déclenchent des réactions immunitaires chez plusieurs espèces d'invertébrés terrestres et

aquatiques, incluant *Helicoverpa armigera*, *Portunus sanguinolentus*, *Perna viridis*, *C. elegans*, *Bombix mori*, *Paratelphusa hydrodromous* ou encore l'isopode aquatique *Aselus aquaticus* (Wang et al., 2010 ; Arjunan et al., 2010, Christensen, 2011 ; Prakash et al., 2011 ; Kamaladevi & Balamurugan, 2015 ; Pachiappan et al., 2009).

Du fait de la mortalité résultant des injections de *E. coli*, *P. agglomerans* et *R. planticola* et de leurs associations possibles avec les invertébrés, nous avons décidé de tester le priming immunitaire chez *A. vulgare* contre ces trois souches bactériennes. Cette seconde expérience a fait l'objet du stage de Master 1 de Gwenel Dias (avril-juin 2021). Durant cette expérience, la mortalité des femelles contrôles n'était cependant pas assez élevée, contrairement aux résultats des tests préliminaires de virulence. Étant donné que nous n'avons pas pu conclure sur l'effet protecteur d'une première injection avec ces bactéries à cause de ce biais expérimental, les résultats obtenus ne seront pas présentés dans ce manuscrit. Le rapport de stage de G. Dias est cependant accessible *via* le lien suivant :

https://drive.google.com/file/d/1wwMfRMVCfP5mzjtowhXSYeic3ALB2lzR/view?usp=sharing).

I.3 – Conclusion

Grâce à cette expérience, nous avons déterminé plusieurs souches bactériennes pathogènes opportunistes d'*A. vulgare*. La détermination de pathogènes naturels relève d'une certaine importance car le degré de coévolution entre un hôte et un pathogène peut modifier les mécanismes sur lesquels repose le priming immunitaire. Alors qu'une absence de coévolution face à un pathogène peut initialement engendrer une réponse immunitaire soutenue, une coévolution plus longue peut conduire à une transition vers une réponse immunitaire plus spécifique et bimodale (Prigot-Maurice et al., 2022).

Il parait important de noter que toutes les espèces bactériennes que nous avons isolées avec succès sont des bactéries à gram (-). Cette sélection repose principalement sur l'utilisation du BHI, qui favorise le développement de ce type bactérien (Akbari et al., 2015). Cependant, la plupart des expériences qui étudient le microbiote d'invertébrés isolent également des bactéries principalement à gram (-) (Hillesland et al., 2008 ; Mukhopadhyay et al., 2012 ; Chavshin et al., 2012), ce qui pourrait refléter une certaine sélection de la part des hôtes. Puisque nous avons précédemment démontré un priming immunitaire avec *S. enterica* (bactérie à gram (-)), nous nous attendons à ce que *A. vulgare* soit aussi capable de

se protéger face à des infections répétées par ce même type de bactérie. Dans cette étude, nous n'avons pas réussi à tester le priming immunitaire face à *E. coli*, *P. agglomerans* et *R. planticola* à cause de la mortalité trop faible des individus témoins après une DL_{50}. Il est prévu que cette expérience de priming immunitaire soit de nouveau réalisée avec différentes modalités d'exposition au pathogène (*e.g.* par voie orale) et différentes doses d'injection. Néanmoins, dans l'objectif de généraliser le priming immunitaire chez *A. vulgare* contre divers types de pathogènes, il demeure nécessaire d'utiliser des bactéries à gram (+), puisqu'elle ne porte pas le même type de MAMPs, et peuvent donc stimuler des voies de signalisations immunitaires différentes (*cf.* Introduction, partie I.3).

Parmi les bactéries à gram (+) pathogène pour *A. vulgare*, nous avons à notre disposition *Listeria ivanovii* (Braquart-Varnier et al., 2015b). Dans la partie suivante, nous avons alors testé le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre cette bactérie.

II. LE PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE *L. IVANOVII*

II.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Les bactéries du genre *Listeria* sont des bactéries flagellées, intracellulaires facultatives à gram (+) pouvant persister plusieurs mois dans l'environnement et l'alimentation (Vasquez-Boland et al., 2001 ; Peel et al., 1988). Parmi les diverses souches connues, *L. ivanovii* est décrite comme pathogène de ruminants mais aussi de plusieurs espèces d'invertébrés, incluant *G. mellonella* et *A. vulgare* (Vasquez-Voland et al., 2001 ; Mukherjee et al., 2010 ; Braquart-Varnier et al., 2015b). *Listeria ivanovii* est capable de traverser l'épithélium intestinal et de se répliquer au sein des cellules hôtes. Au même titre que *S. enterica*, elle infecte les macrophages chez les Vertébrés, au sein desquels elle lyse rapidement les phagosomes (Vasquez-Voland et al., 2001 ; Karunasagar et al., 1993).

L. ivanovii et *S. enterica* ont plusieurs caractéristiques biologiques similaires. Elles sont toutes deux intracellulaires facultatives, produisent des flagelles et infectent généralement leur hôte *via* le système digestif (Shahabi et al., 2010). Cependant, en tant que bactérie à gram (+), *L. ivanovii* porte des MAMPs de type PNG, tandis que *S. enterica*, en tant que bactérie à gram (-) porte des MAMPs de type LPS (Shahabi et al., 2010). Ces deux types de MAMPs sont connus pour stimuler des voies de signalisations immunitaires différentes chez les invertébrés dont les crustacés (Rowley & Pope, 2012 ; De Gregorio et al., 2002). Les LPS (gram (-)) stimulent particulièrement la voie IMD, tandis que les PNG (gram (+)) stimulent plutôt la voie Toll (De Gregorio et al., 2002). Par conséquent, des effecteurs immunitaires différents (*e.g.* peptides antimicrobiens) ciblant des bactéries à gram (-) ou à gram (+) peuvent être produits selon l'activation de ces voies signalétiques (Rowley & Pope, 2012).

Afin de tester si *A. vulgare* exprime un priming immunitaire contre *L. ivanovii*, nous avons injecté des femelles *A. vulgare* soit avec des *L. ivanovii* vivantes soit des *L. ivanovii* inactivées au PFA 4% pour une dose de 10^3 bactéries/100 nL. 24h ou 7 jours plus tard, nous avons injecté les femelles avec une DL_{50} d'environ 10^6 *L. ivanovii* vivantes. Nos lots témoins sont un groupe de femelles primo-injectées avec du PBS stérile (traitement PBS) ou bien ayant reçu uniquement la DL_{50} (traitement NP). Le Tableau 14 récapitule le nombre de femelles utilisées pour chaque traitement et chaque intervalle de temps. Les injections ont été réalisées selon 4 réplicats techniques, en utilisant 4 cultures bactériennes différentes. Tous

les traitements ont été répartis équitablement au sein des réplicats. Après l'injection de la DL_{50}, nous avons relevé la survie des femelles tous les jours durant 7 jours. La préparation des bactéries, les injections et les analyses statistiques de survie ont été réalisées selon les mêmes procédures que décrites avec *S. enterica* (*cf.* Chapitre II, partie I).

Tableau 14. Nombre de femelles utilisées pour chaque traitement et chaque intervalle de temps. NP = femelles ayant reçues uniquement la DL_{50} ; PBS = femelles primo-injectées avec du PBS stérile ; LI_V : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* vivantes, LI_I : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* inactivées avec du PFA 4%.

	NP	**PBS**	**LI_V**	**LI_I**
24h	24	25	25	25
7 jours	36	37	24	35

II.2 – Résultats et discussion

Nous observons que les taux de survie des femelles face à la DL_{50} de *L. ivanovii* ne sont pas influencés par le traitement (Chisq = 5.17, df = 3, p = 0.15), ni par le temps entre les injections (Chisq = 0.16, df = 1, p = 0.68) ni par l'interaction entre ces facteurs (Chisq = 1.35, df = 3, p = 0.71). Que ce soit à 24h ou 7 jours après la primo-injection, les femelles primo-injectées avec *L. ivanovii* (vivantes ou inactivées) n'ont pas de meilleurs taux de survie comparées aux femelles contrôles après la DL_{50} (PBS et NP, Fig. 39 ; Tab. 15). Nos résultats suggèrent qu'une première injection de *L. ivanovii* ne protège pas *A. vulgare* contre une infection létale ultérieure par cette même bactérie. Autrement dit, *A. vulgare* ne semble pas exprimer de priming immunitaire contre *L. ivanovii*.

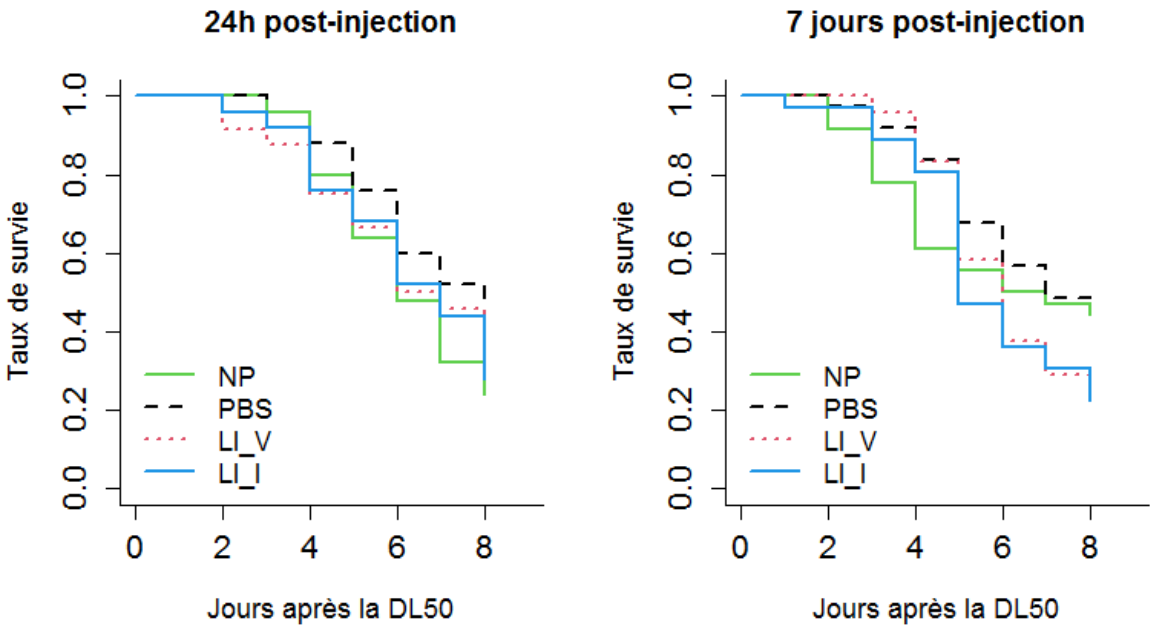


Figure 36. Taux de survie des femelles après la DL_{50} de *L. ivanovii* **(A)** à 24h ou **(B)** 7 jours d'intervalle entre les deux injections. NP = femelles ayant reçues uniquement la DL_{50} ; PBS_LI = femelles primo-injectées avec du PBS stérile ; LI_V : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* vivantes, LI_I : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* inactivées avec du PFA 4%.

Tableau 15. P-value des comparaisons de survie des femelles face à la DL_{50} de *L. ivanovii*. NP = femelles ayant reçues uniquement la DL_{50} ; PBS = femelles primo-injectées avec du PBS stérile ; LI_V : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* vivantes, LI_I : femelles primo-injectées avec 10^3 *L. ivanovii* inactivées avec du PFA 4%.

Taux de survie (% de femelles vivantes)			
	estimate	**se**	**p-value**
24h			
NP *vs* PBS	0.39	0.340	0.64
NP *vs* LI_V	0.09	0.334	0.99
NP *vs* LI_I	0.13	0.329	0.97
PBS *vs* LI_V	-0.30	0.349	0.82
PBS *vs* LI_I	-0.25	0.344	0.87
LI_V *vs* LI_I	0.04	0.339	0.99
	estimate	**se**	**p-value**
7 jours			
NP *vs* PBS	0.32	0.319	0.73
NP *vs* LI_V	0.06	0.332	0.99
NP *vs* LI_I	-0.33	0.297	0.67
PBS *vs* LI_V	-0.39	0.331	0.63
PBS *vs* LI_I	-0.66	0.294	0.11
LI_V *vs* LI_I	-0.26	0.309	0.82

Dans la littérature, plusieurs expériences démontrent un priming immunitaire contre des bactéries à gram (+) chez divers modèles d'invertébrés, incluant des crustacés aquatiques et l'isopode terrestre *P. scaber* (Roth et al., 2009, 2010 ; Dubuffet et al., 2015 ; Saad & Schmid-Hempel, 2006 ; Shehaan et al., 2020). Chez *P. scaber*, une espèce proche d'*A. vulgare*, le priming immunitaire établi contre *B. thuringiensis* est spécifique à la souche rencontrée (Roth et al., 2009). Les hémocytes de cette espèce sont capables de reconnaître et de « se souvenir » d'une infection par une bactérie gram (+) portant des PNG, durant 2 semaines (Roth et al., 2009). De plus, il s'avère que chez diverses espèces de crevettes, la voie Toll s'exprime aussi bien lors de la détection de bactéries à gram (+) que lors de la détection de bactéries à gram (-) (Kulkarni et al., 2021). Bien que nos résultats aillent à l'encontre de ces démonstrations, deux hypothèses peuvent être avancées :

(1) Les conditions expérimentales que nous avons utilisées ne permettraient pas de mettre en évidence un priming immunitaire contre *L. ivanovii*. En effet, il se pourrait que la mise en place d'un priming immunitaire contre cette bactérie requière un intervalle de temps plus long entre les infections pour inférer une protection, ou bien des doses bactériennes plus ou moins élevées durant la première injection.

(2) Si le priming immunitaire est véritablement absent contre *L. ivanovii*, alors il se pourrait que soit (i) les MAMPs de type PNG de *L. ivanovii* ne déclenchent pas de priming immunitaire chez *A. vulgare*, et/ou (ii), le mode d'infection de *L. ivanovii* ne permet pas au système immunitaire d'*A.vulgare* de lutter efficacement contre la seconde infection. Même si *L. ivanovii* et *S. enterica* sont toutes deux des bactéries intracellulaires facultatives, elles infectent différemment les cellules de l'hôte (Shahabi et al., 2010). Alors que les *Salmonella* se répliquent dans les phagosomes et les SCV de la cellule hôte, les *Listeria* lysent et s'échappent des phagosomes pour se répliquer dans le cytoplasme des cellules qu'elles infectent (Shahabi et al., 2010). Ainsi, il se pourrait que la virulence de *L. ivanovii* à l'égard des cellules d'*A. vulgare* soit plus importante. Si cette virulence est trop élevée, il se pourrait que le système immunitaire ne soit pas assez efficace pour lutter contre cette bactérie, qu'il ait été préalablement amorcé par cette même bactérie, ou non.

II.3 – Conclusion

Durant cette expérience, nous n'avons pas observé de priming immunitaire contre *L. ivanovii* chez *A. vulgare.* L'absence de démonstration d'un phénomène ne permet pas de conclure que ce phénomène n'existe pas, puisqu'il n'est peut-être pas détectable selon les conditions expérimentales utilisées. Ainsi, nous ne pouvons pas confirmer l'absence de priming immunitaire contre *L. ivanovii* chez *A. vulgare*. Néanmoins, cette absence de priming immunitaire pourrait s'expliquer par le type de MAMPs rencontré ou les caractéristiques biologiques de *L. ivanovii*. Pour confirmer nos hypothèses, des expériences complémentaires avec d'autres souches bactériennes à gram (+) sont alors nécessaires.

Jusqu'à lors, nous avons testé le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre des bactéries pathogènes. Cependant, la plupart des expériences de priming immunitaire chez les crustacés aquatiques démontrent ce processus immunitaire contre des virus pathogènes (Chang et al., 2018 ; Kulkarni et al., 2021). Ainsi, nous avons poursuivi nos recherches sur le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre son ennemi naturel : l'IIV-31.

III. LE PRIMING IMMUNITAIRE CHEZ *A. VULGARE* CONTRE l'IIV-31 ET SON INTERACTION AVEC *WOLBACHIA*

[Avec le support technique de G. Dias (relevés de survie) ; M. Raimond (microscopie) et I. Giraud (purifications virales)]

III.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

L'IIV-31 est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des Iridoviridae, Betairidovirinae, du genre Iridovirus. Ce genre comporte une dizaine de virus qui infectent exclusivement des hôtes invertébrés, dont des nématodes et mites parasites d'invertébrés (Chinchar et al., 2009 ; Wijnhoven & Berg, 1999 ; Williams, 2008 ; Bromenshenk et al., 2010 ; Bailey & Ball, 1978 ; Camazine & Liu, 1998). L'IIV-31 est un pathogène naturel répandu chez les isopodes terrestres. Il est observé chez 25 espèces différentes (incluant *A. vulgare*), réparties dans une quinzaine de pays du monde (Karasawa et al., 2012 ; Lupetti et al., 2013 ; Cole & Morris, 1980 ; Douch & Poupa, 2021 ; Hess & Poinar, 1985 ; Wijnhoven & Berg, 1999). Dans les populations naturelles où il est détecté, sa prévalence varie de 2 à 40% et semble dépendre de l'humidité du sol et de la densité des individus (Grosholz, 1993).

Structurellement, l'IIV-31 est un virus de grande taille (~140 nm Ø ; Fig. 40. A). Il est doté d'une capside virale icosaédrique, à l'intérieur de laquelle une membrane lipidique protège le matériel génétique (Fig. 40. A ; Williams, 2008). L'IIV-31 se réplique dans divers tissus de son hôte, tels que les cellules de l'épiderme, des muscles, du corps gras, de la chaîne nerveuse, du tube digestif, ou encore des hémocytes (Cole & Morris, 1980 ; Federici, 1980). Pour se répliquer à l'intérieur d'une cellule, l'IIV-31 exploite d'abord le noyau cellulaire pour synthétiser son propre génome viral, puis le cytoplasme, afin de produire les capsides dans lesquelles est encapsulé le matériel génétique (Fig. 40. B ; Loiseau et al., 2017 ; Jancovich et al., 2012 ; Williams, 2008).

Grâce à cette réplication, une quantité impressionnante de virions sont produits dans le cytoplasme des cellules hôtes, avant d'être libérés dans le milieu extracellulaire par lyse cellulaire ou par bourgeonnement **(**Fig. 40 ; Loiseau et al., 2017 ; Williams, 1998 ; Poinar, 1985 ; Chinchar et al., 2009). Que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, les virions s'organisent spatialement en un réseau paracristallin (Fig. 40. A), responsable de ce que nous appelons « l'iridescence », qui renvoie une couleur bleue caractéristique des individus infectés (Fig. 41).

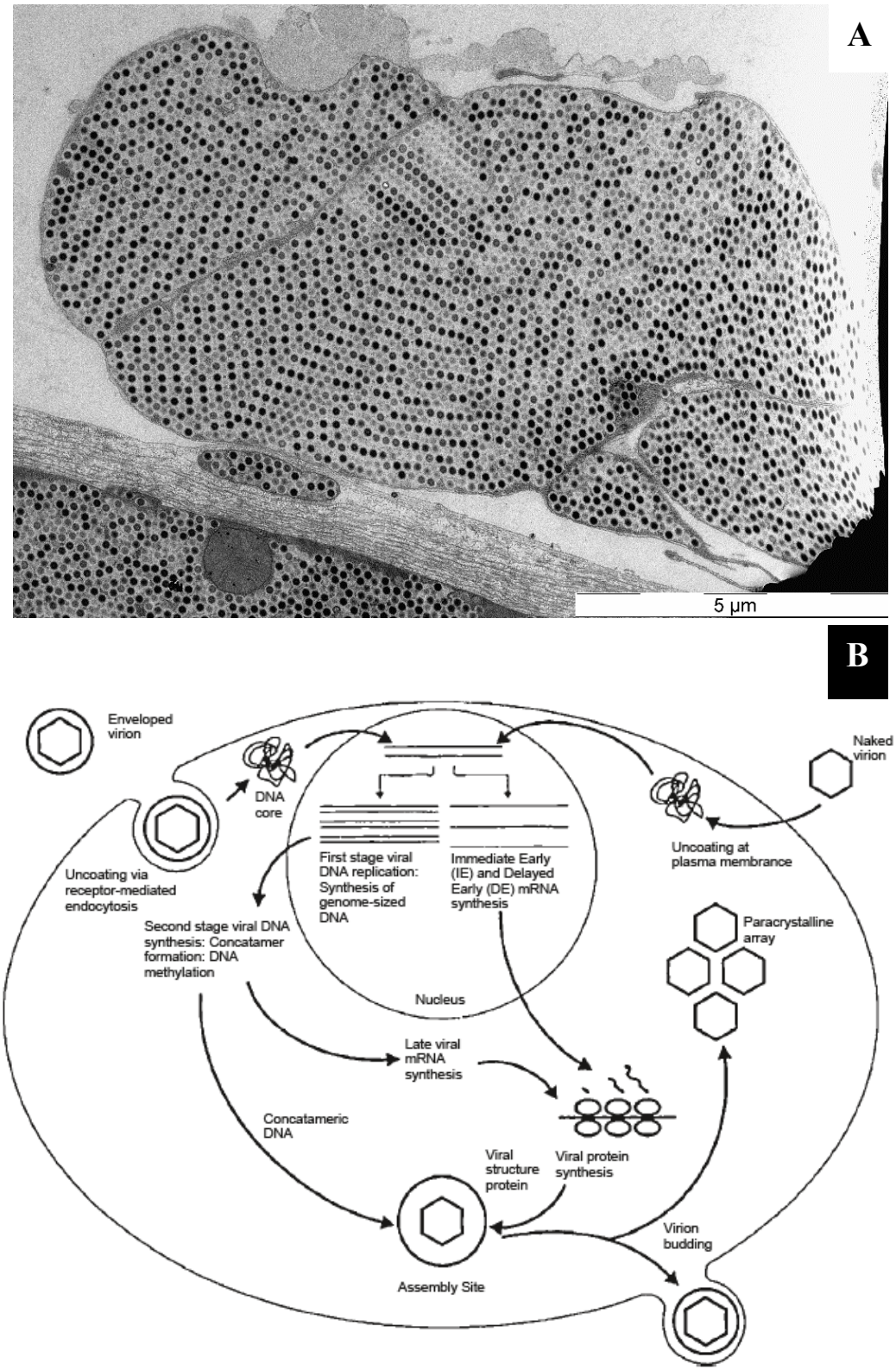


Figure 37. (A) Microscopie électronique à transmission des virions de l'IIV-31 dans la chaine nerveuse d'*A. vulgare*, Photo : Maryline Raimond. **(B)** Cycle de réplication des Iridovirus, dont l'IIV-31. Schéma tiré de Chinchar et al., 2009.

En effet, cette organisation virale diffracte la lumière blanche incidente arrivant à la surface des cellules en une longueur d'onde perçue dans les tons bleus/violacés (Fig. 41 ; Williams et al., 2008 ; Paul et al., 2007 ; Federici et al., 1984). C'est de cette caractéristique que nous utilisons le terme « Iridovirus » qui provient du grecque « iridos » qui veut dire « brillant comme un arc en ciel » (Wiliams, 1998). Lorsque l'iridescence est visible à l'œil nu, la mort des individus est inévitable (Fig. 41 ; Lupetti et al., 2013 ; obs. pers.). Chez *A. vulgare*, les premiers signes d'iridescence apparaissent environ 5-10 jours après l'infection, au niveau des glandes salivaires (Fig. 41 ; obs. pers.). Puis, les virions se répliquent progressivement dans tous les tissus de l'hôte, jusqu'à ce que l'organisme deviennent complétement iridescent (Fig. 41 ; Federici et al., 1980 ; Wijnhoven & Berg, 1999). Une fois le corps complément infecté, les individus meurent généralement dans les 2 semaines suivantes (Fig. 41 ; Federici et al., 1980 ; Cole & Morris, 1980 ; obs. pers.).

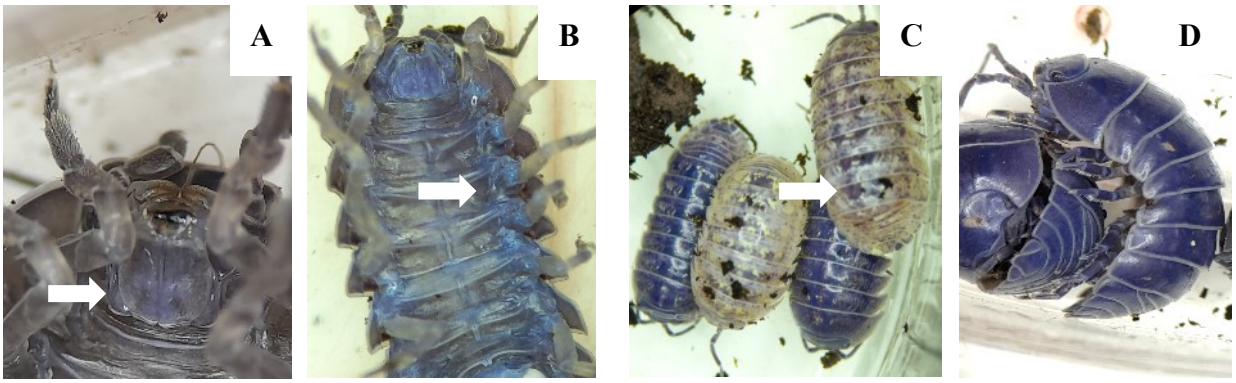


Figure 38. Évolution de l'iridescence d'*A. vulgare* infecté par l'IIV-31. **(A)** l'iridescence est d'abord visible au niveau des glandes salivaires (flèche blanche), **(B)** puis au niveau des articulations ventrales (flèche blanche). **(C)** Des tâches iridescentes apparaissent sur la cuticule dorsale (flèche blanche). **(D)** Les individus deviennent entièrement iridescents (~ 20-25 jours post-infection). Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice.

Les infections causées par les Iridovirus sont létales dans la plupart des cas (Chinchar et al., 2009 ; Federici et al., 1980, Qiu et al., 2017). Chez *G. mellonella* par exemple, seulement 50 virions de l'IIV-6 déclenchent une infection systémique chez l'ensemble des individus injectés (Constantino et al., 2001). Les Iridovirus ont ainsi un fort impact sur la longévité, la croissance et la reproduction des individus infectés (Williams, 1998 ; 2008 ; Cole & Morris, 1980 ; Webby & Kalmakoff, 1998 ; Marina et al., 2003 ; 1999). D'après les données théoriques et empiriques, le priming immunitaire est particulièrement sélectionné contre des pathogènes très virulents (Best et al., 2013 ; Moret & Siva-Jothy, 2003 ; Tidbury et al., 2011). Ainsi, nous avons testé si *A. vulgare* exprime un priming immunitaire contre l'IIV-31.

Pour cela, deux expériences de priming immunitaire ont été réalisées. La première expérience consistait en une primo-injection avec l'IIV-31 inactivé à la chaleur (*cf.* Box. 6 ; 60 min à 60°C, 27 ng/100 nL ; Buchatskii et al., 1988 ; traitement HKV) et la deuxième en une primo-injection avec du Poly (I:C) (0.5 µg/100 nL ; Wu et al., 2017 ; traitement PIC). Le Poly (I:C) (pour acide polyinosinique-polycytidylique) est un ADN synthétique double brin imitant une infection virale, connu pour déclencher un priming immunitaire contre des virus à ADN chez l'huître (Green & Montagnani, 2013 ; Lafont et al., 2017). Étant donné que l'immunocompétence d'*A. vulgare* varie selon le sexe des individus (Sicard et al., 2010 ; Pigeault et al., 2014 ; Prigot-Maurice et al., 2020), des mâles et des femelles ont été utilisés pour tester le priming immunitaire avec du Poly (I:C) (Tab. 16) et pour le moment, seules des femelles ont été utilisées pour tester le priming immunitaire avec l'IIV-31 inactivé à la chaleur.

Pour chacune des expériences, tous les individus ont ensuite été infectés avec l'IIV-31 vivant 7 jours plus tard. Pour cela, nous avons utilisé la technique dite de « pricking » : les individus sont piqués dorsalement avec une aiguille minutie préalablement trempée dans une solution virale purifiée. Le protocole de purification virale est présenté dans la Box 6. La survie des individus a été relevée 3 fois par semaine jusqu'à ce que tous les individus soient morts (entre 40 et 70 jours après l'infection). Afin de détecter un potentiel priming immunitaire, nous avons comparé la survie des individus primo-injectées (HKV et PIC) à celle d'individus primo-injectés avec de l'eau stérile (traitement H20) ou n'ayant pas reçu de primo-injection (traitement NP ; Tab. 16).

Dans la littérature, plusieurs études révèlent que *Wolbachia* est capable de protéger son hôte contre divers virus à ARN, mais pas contre des virus à ADN, incluant l'IIV-6 (Pimentel et al., 2021 ; Texeira et al., 2008 ; Palmer et al., 2018 ; Graham et al., 2012 ; Parry et al., 2019 ; Altini et al., 2020). L'interaction *A. vulgare*/*Wolbachia*/IIV-31 demeure donc un excellent modèle pour explorer cet aspect (Loiseau et al., 2017). Afin de déterminer si *Wolbachia* protège – ou non – *A. vulgare* contre l'IIV-31, nous avons réalisé une troisième expérience, dans laquelle nous avons directement infecté des mâles et des femelles asymbiotiques de la lignée WXA (*cf.* Chapitre I, partie I) ainsi que des femelles symbiotiques de la lignée WXiw (i.e. lignée initiale de WXA injectées avec *Wolbachia* depuis plusieurs générations ; *cf.* Chapitre IV, partie I), hébergeant la souche *w*VulC de *Wolbachia* (Tab. 16). La survie des individus a été relevée de la même manière que dans les expériences 1 et 2.

Tableau 16. Nombre d'individus utilisés pour chaque expérience. NP : individus ayant reçu uniquement l'IIV-31 vivant ; H20 : individus piqués avec de l'eau stérile ; PIC : individus primo-injectés avec du Poly (I:C) (0.5 µg.100 nL d'injection); HKV : femelles primo-injectées avec l'IIV-31 inactivé à la chaleur (27 ng.100 nL d'injection). NI : individus n'ayant jamais été infectés ; IIV-31 : individus ayant uniquement reçus l'IIV-31 vivant.

Expérience 1, Poly (I:C)			
	NP	H20	PIC
Femelles	20	19	20
Mâles	20	19	20
Expérience 2, IIV-31 inactivé (Heat Killed)			
	NP	H20	HKV
Femelles	23	24	27
Expérience 3, avec ou sans *Wolbachia*			
	NI	H20	IIV-31
Femelles WXA	25	24	25
Mâles WXA	25	25	25
Femelles WXIW	24	24	25

Chez *A. vulgare*, *w*VulC féminise les mâles génétiques en femelles phénotypiques (Martin et al., 1973 ; Rigaud et al., 1992 ; Bouchon et al., 1998). Ainsi, les femelles de la lignée WXiw sont soit des femelles génétiques, soit des femelles que nous appelons « phénotypiques » (*i.e.* avec un génome mâle ou un génome de femelle) pour les distinguer des femelles génétiques. Dans les deux cas, ces femelles sont physiologiquement fonctionnelles et capables de se reproduire. Les femelles de la lignée WXA sont des femelles génétiques, les mâles de cette même lignée sont des mâles génétiques.

Pour les trois expériences, nous avons répartis les individus en 3 réplicats techniques, définis par 3 purifications virales différentes (*cf.* Box. 6). Les analyses de survie (modèle de Cox) ont été réalisées en incluant le traitement (NI, H20, IIV31 ou PIC, expérience 1 et 2) et le statut symbiotique (mâles WXA, femelles WXA, femelles WXiw ; expérience 3) en facteurs fixes. Le réplicat et la boîte dans laquelle étaient placés les individus ont été inclus en facteurs aléatoires nichés. Afin de distinguer le potentiel effet du sexe (femelles génétiques et phénotypiques *vs* mâles) de celui de la lignée (WXA *vs* WXiw) sur la survie des individus de l'expérience 3, nous avons construit un second modèle de Cox incluant le traitement, le sexe et la lignée ainsi que leur interaction avec le traitement en facteurs fixes.

Pour aller un peu plus loin, nous avons cherché à déterminer si l'IIV-31 pouvait infecter les hémocytes d'*A. vulgare*, car les deux seules études ayant testé cette hypothèse montrent des résultats contradictoires (Federici, 1980 ; Cole & Morris, 1980). Nous avons donc prélevé les hémocytes et des cellules adipeuses de femelles totalement iridescentes puis nous les avons observés en Microscopie Électronique à Transmission (MET ; *cf.* Box 7).

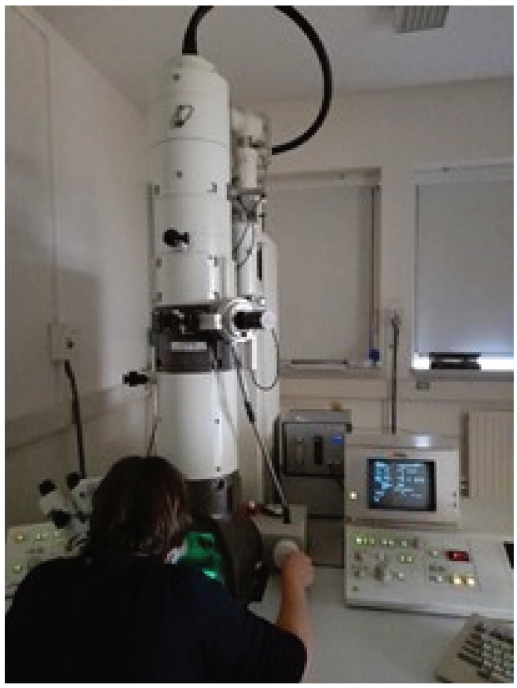
Box 6. Préparation de l'IIV-31 pour observation en Microscopie Électronique à Balayage.

Afin d'observer les virions de l'IIV-31 dans les hémocytes et les cellules adipeuses entourant la chaîne nerveuse d'*A. vulgare*, 10 µL d'hémolymphe provenant d'individus complétement iridescents sont prélevés, puis leur chaîne nerveuse est disséquée sous une loupe binoculaire (photos ci-dessous).

Les échantillons sont déposés dans 3 mL de Fixateur (3% de Glutaraldéhyde, 0.1 M de Cacodylate de Sodium, 1% de NaCl, pH 7.3) durant 2h à 4°C. Le tampon de fixation est éliminé puis 3 mL de tampon de lavage (0.26 M de sucrose, 0.1 M de Cacodylate de sodium, 1% de NaCl, pH 7.3) sont ajoutés. Après 1h d'incubation à 20°C, le tampon de lavage est éliminé puis les échantillons sont déshydratés avec 2 bains d'acétone 50% (2x1 min), 2 bains d'acétone 70% (2x5 min), 2 bains d'acétone 90% (2x15 min) puis 4 bains d'acétone 100% (4x15 min).

Les échantillons sont ensuite imprégnés de résine époxy dans un mélange acétone/résine (vol. 1:1) durant plusieurs heures. La polymérisation de la résine se fait dans un moule à plat durant 24h à 70°C. Les échantillons sont ensuite coupés en fine lamelle de 60 nm (Ultramicrotome Leica, UC6rt). Les coupes sont contrastées avec une solution d'acétate d'Uranyle (2%) dans de l'alcool à 50% durant 1 min puis dans une solution de citrate de plomb durant 10 min. Les échantillons sont finalement déposés sur des grilles puis observés avec le microscope électronique à transmission JEOL JEM 1010 de la Plateforme ImageUP de l'Université de Poitiers (photos ci-dessous).





Photos : Dissection de la chaîne nerveuse et microscope électronique à transmission.

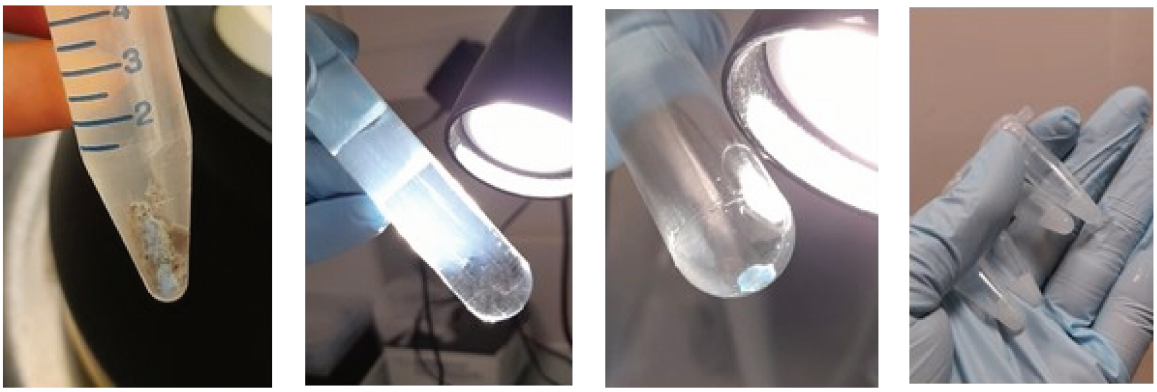
Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice, avec l'autorisation de Maryline Raimond

Box 7. Purification virale de l'IIV-31.

En 2016, B. Federici nous a gracieusement adressé un échantillon d'*A. vulgare* infecté par l'IIV-31. Afin d'obtenir une solution virale purifiée, des individus vivants issus de notre élevage sont infectés avec une aiguille minutie préalablement déposée dans l'échantillon initial. Lorsque les individus présentent une iridescence complète du corps, ces derniers sont congelés puis broyés dans de l'azote liquide. Les résidus restants sont transférés dans 10 mL de Ringer stérile puis centrifugés 30 min à 5 000 g, 4°C (photos ci-dessous).

Afin de purifier les virions présents dans l'échantillon, ces derniers sont séparés par un gradient de sucrose-HEPES (sucrose 0.3 g/mL, HEPES 0.013g/mL). Pour se faire, 10 mL de surnageant des tubes contenant les virions sont déposés dans un tube ultraclear 15 mL (adapté à l'ultracentrifugation), puis 1.5 mL de gradient de sucrose-HEPES sont déposés au fond du tube, en dessous de la solution virale (photos ci-dessous). Les tubes sont ensuite équilibrés pour 14.5 g (± 0.1 g), en ajoutant environ 750 mL d'huile stérile.

Les tubes sont centrifugés 90 min, 35 000 g à 4°C (ultracentrifugeuse Optima XE-90). Les culots ainsi obtenus (photos ci-dessous) contiennent les virions vivants de l'IIV-31 et sont repris dans 100 µL de Tris. Cette solution est de nouveau centrifugée 5 min à 3 800 g, 4°C. Le surnageant (*i.e.* solution virale purifiée) est conservé à -80°C (photos ci-dessous).



Photos : Broyat d'*A. vulgare* iridescent ; solution virale et gradient de sucrose ; culot issu de l'ultracentrifugation ; solution virales purifiées. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice.

III.2 – Résultats et discussion

III.2.a – Expérience 1 et 2 : priming immunitaire avec l'IIV-31 inactivé et le Poly (I:C)

Concernant le priming immunitaire avec l'IIV-31 inactivé à la chaleur (expérience 1), nous avons observé que la survie des femelles après une infection létale ultérieure ne dépend pas de leur traitement (Fig. 41 ; Chisq = 1.77, df = 2, p = 0.41). Que les femelles soient primo-injectées avec le virus inactivé (HKV), de l'eau stérile (H20), ou n'ont pas été préalablement injectées (NP), elles ne différent pas dans leurs capacités de survie après l'infection par l'IIV-31 vivant (Fig. 42).

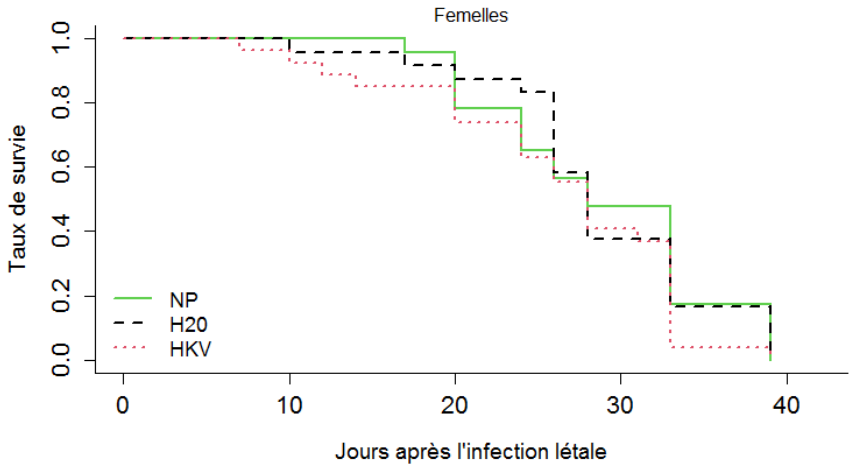


Figure 39. Survie des femelles face à l'IIV-31 en fonction de leur traitement. NP : femelles ayant reçues uniquement l'IIV-31 vivant ; H20 : femelles piquées avec de l'eau stérile ; HKV : femelles primo-injectées avec l'IIV-31 inactivé à la chaleur (27 ng.100 nL d'injection).

Nous observons des résultats similaires lorsque les individus sont primo-injectés avec du Poly (I:C) (Fig. 43 ; expérience 2). La survie des individus après l'infection létale d'IIV-31 ne dépend ni de leur traitement (Chisq = 2.73, df = 2, p = 0.25) ni de l'interaction entre leur traitement et leur sexe (Chisq = 1.48, df = 2, p = 0.47). En revanche, la survie des individus est influencée par leur sexe (Chisq = 7.41, df = 1, p = 0.006). Indépendamment du traitement, les femelles survivent plus longtemps que les mâles (Fig. 43). À titre indicatif, 40 jours après l'infection, les femelles présentent des taux de survie d'environ 60% contre 40% chez les mâles (Fig. 43).

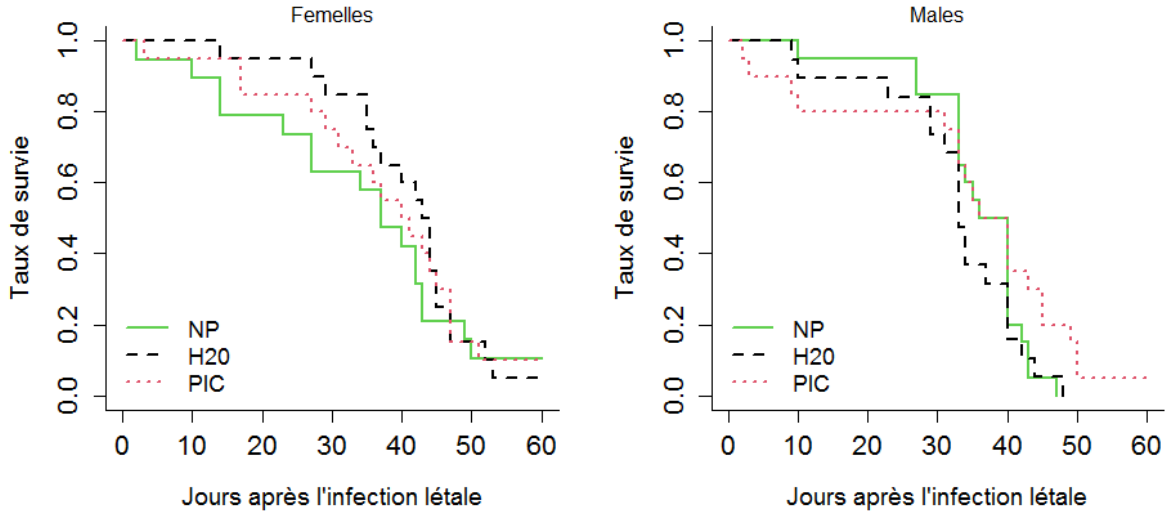


Figure 40. Survie des individus face à l'IIV-31 en fonction de leur traitement. NP : individus ayant reçus uniquement l'IIV-31 vivant ; H20 : individus piqués avec de l'eau stérile ; PIC : individus primo-injectés avec du Poly (I:C) (0.5 µg.100 nL d'injection).

Nos résultats suggèrent qu'une première stimulation immunitaire avec l'IIV-31 inactivé ou du Poly (I:C) ne protège pas les individus contre une infection létale ultérieure. Ce résultat va à l'encontre de plusieurs études, montrant que les crustacés aquatiques sont capables d'un priming immunitaire contre des virus à ADN, qu'ils soient préalablement stimulés avec le même virus inactivé ou de l'ADN double brin similaire à du Poly (I:C) (Kulkarni et al., 2021 ; Chang et al., 2018).

Comme dans l'expérience avec *L. ivanovii*, notre première hypothèse est que (1) les modalités expérimentales que nous avons utilisées ne déclenche pas de priming immunitaire chez *A. vulgare* contre l'IIV-31. La méthode d'inactivation n'est peut-être pas appropriée. Chez P. *japonicus* par exemple, une injection de WSSV (un virus à ADN) inactivé à la chaleur ne protège pas les individus contre une infection létale ultérieure par ce même virus (Namikoshi et al., 2004). En revanche, les individus primo-injectés avec ce même virus inactivé avec de la formaline sont protégés contre une infection létale ultérieure (Namikoshi et al., 2004). Dans notre expérience, il se peut également que le délais entre les deux expositions ne soit pas assez long pour que le priming immunitaire se déclenche. Singh et al. (2005) ont par exemple montré que le priming immunitaire de *Fenneropenaeus indicus* contre le WSSV requiert un minimum de 5 jours entre les deux injections. L'autre biais expérimental possible concerne la voie d'infection. Ici, nous avons directement inoculé l'IIV-31 dans l'hémolymphe des individus. Or, dans les conditions naturelles, ce virus se transmet

probablement par voie orale, lorsque les individus ingèrent des aliments, des fèces ou des cadavres contaminés (Federici, 1980 ; Grosholz, 1993 ; Cole & Moris, 1980). En accord avec ces suppositions, nous avons observé au laboratoire que l'apparition de l'iridescence des individus infectés débute toujours au niveau des glandes salivaires, même si les individus sont inoculés *via* l'hémolymphe (Fig. 41). Il n'est donc pas exclu qu'un priming immunitaire contre l'IIV-31 s'exprime localement, au niveau du tube digestif d'*A. vulgare* par exemple.

Si (2) notre résultat illustre l'absence d'un priming immunitaire, celui-ci pourrait s'expliquer par l'écologie de ce virus. Chez la drosophile par exemple, l'IIV-6 produit des inhibiteurs du système d'ARNi, lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire antivirale de son hôte (Bronkhorst et al., 2012 ; 2014 ; Kemp et al., 2013). Chez cette même espèce, l'IIV-6 inhibe la voie Toll et IMD et donc la production de Diptericin, et ce, même si l'IIV-6 est préalablement inactivé (West, 2018). Ainsi, il se pourrait que l'IIV-31 empêche – ou retarde – sa détection par le système immunitaire d'*A. vulgare*, ce qui l'empêcherait d'établir un priming immunitaire avant la seconde infection. L'IIV-31 pourrait aussi être trop virulent pour permettre au système immunitaire d'*A. vulgare* de se protéger contre ce virus. La seule étude portant sur la réponse immunitaire d'un isopode terrestre (*P. scaber*) face à l'IIV-31 révèle que les individus infectés par ce virus sont immunodéprimés (Dolar et al., 2020). Leur concentration totale en hémocytes est six fois moins élevée que les individus sains (Dolar et al., 2020). La viabilité des hémocytes et l'activité phénoloxydase de *P. scaber* infectés par l'IIV-31 sont elles aussi fortement diminuées (Dolar et al., 2020). De plus, les Iridovirus sont connus pour retarder l'apoptose des cellules qu'ils infectent, en inhibant la synthèse de protéines, d'ARN et d'ADN de leurs cellules hôtes (Paul et al., 2007 ; Chinchar et al., 2009 ; Williams, 1998). Or, l'apoptose est connue pour être un système antiviral chez les crustacés (Kulkarni et al., 2021). L'inhibition cellulaire causée par ce virus, couplée à la présence de virions dans les hémocytes, pourrait expliquer pourquoi les systèmes immunitaires de *P. scaber* (Dolar et al., 2020) et d'*A. vulgare* sont peu efficaces face à ce virus.

Dans notre étude, nous observons notamment que les hémocytes de femelles *A. vulgare* infectées par l'IIV-31 contiennent des virions, qui semblent restreint dans un compartiment cellulaire particulier (Fig. 44), tandis que les cellules adipeuses entourant la chaîne nerveuse sont chargées de virions dans le cytoplasme des cellules (Fig. 44).

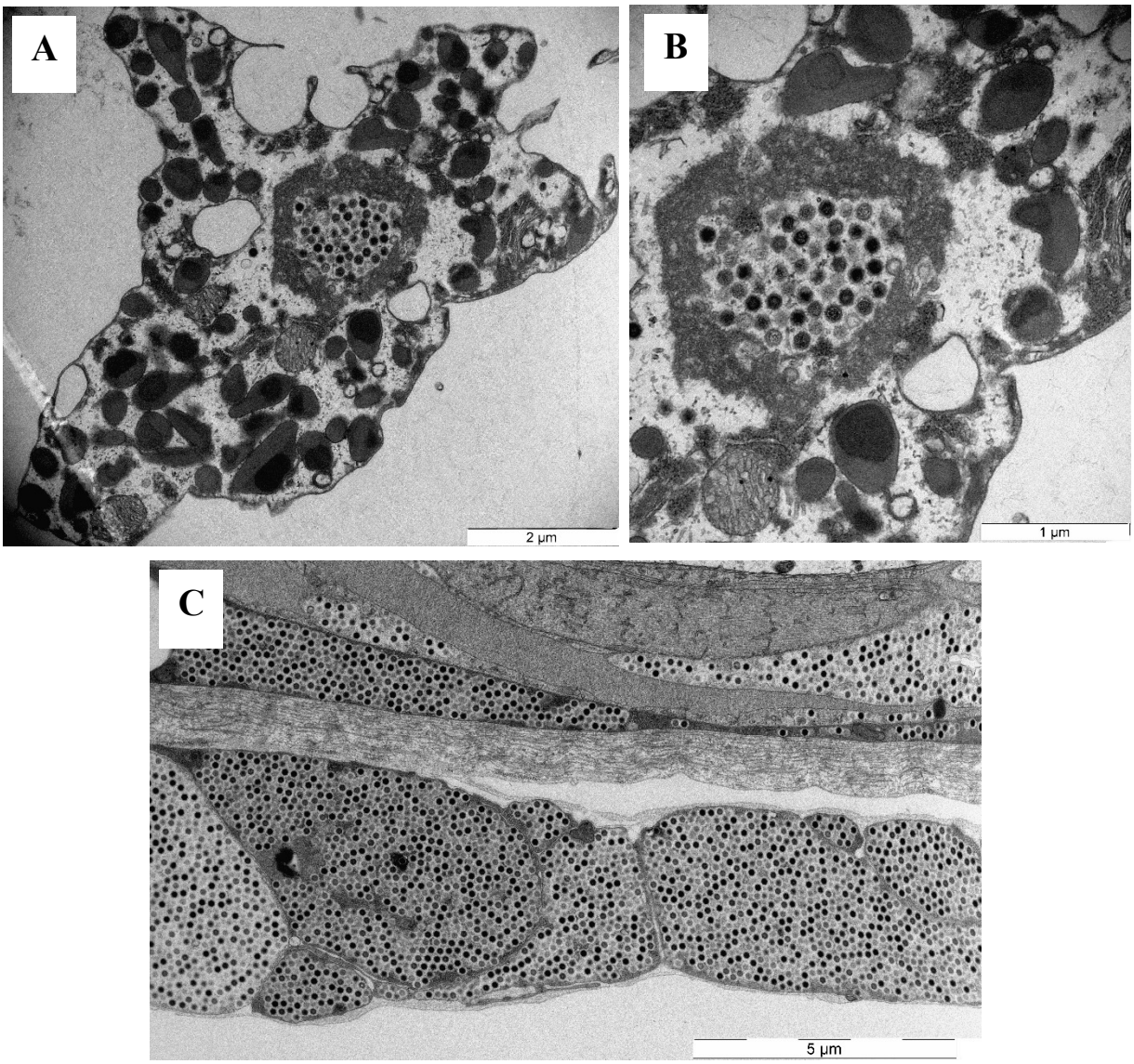


Figure 41. Virions de l'IIV-31 (**A et B**) à l'intérieur des hémocytes et (**B**) dans le cytoplasme des cellules adipeuses entourant la chaîne nerveuse d'*A. vulgare* femelle. Photos : Maryline Raimond

Nos observations de cellules adipeuses rejoignent les propos de Williams (1998), indiquant que les cellules infectées présentent un cytoplasme chargé de virions, dans lequel les organelles ne sont même plus visibles. Alors que les capsides virales sont normalement produites dans le cytoplasme des cellules (Fig. 44.B ; Loiseau et al., 2017 ; Williams, 1998), il semblerait que les virions présents dans les hémocytes soient contenu dans un compartiment. Ce compartiment pourrait être le noyau ou bien une structure intracellulaire, soit développée par l'hémocyte en réponse au virus, soit développée sous le contrôle du virus lui-même (Fig. 44). Quoi qu'il en soit, la présence de l'IIV-31 dans les hémocytes d'*A. vulgare* pourrait inhiber la réponse immunitaire antivirale de l'hôte, voire le priming immunitaire, l'empêchant ainsi de lutter efficacement contre ce virus.

Pour en revenir aux taux de survie des individus face à l'IIV-31, nous observons une différence de survie selon le sexe des individus : quel que soit le traitement, les femelles survivent plus longtemps que les mâles après l'infection par l'IIV-31 (Fig. 43). Des résultats similaires ont été observés chez la drosophile, où les femelles survivent mieux à une infection par le virus à ADN, Kallithea Virus, comparées aux mâles (Palmer et al., 2018). Ce résultat rejoint plus spécifiquement l'observation de Sassaman et Garthwaite, montrant que dans les populations naturelles, 5% des individus *A. vulgare* infectés sont des mâles, contre 2% de femelles (Hess & Poinar, 1985). Chez *A. vulgare*, les femelles ont généralement de meilleures capacités immunitaires (*i.e.* activité phénoloxydase et pourcentage d'hémocytes phagocytaires) que les mâles (Sicard et al., 2010 ; Pigeault et al., 2014). La résistance (ou la tolérance) plus importante des femelles face à l'IIV-31 pourrait donc s'expliquer par leur meilleure immunocompétence, même si tous les individus infectés (qu'ils soient mâles ou femelles) finissent par mourir.

III.2.b – Expérience 3 : effet de *Wolbachia* sur la mortalité face à l'IIV-31

Dans un premier temps, nous observons que la survie des individus (femelles WXiw, femelles WXA et mâles WXA) dépend du traitement (Chisq = 116.83, df = 2, $p < 0.0001$), mais pas du statut symbiotique des individus (Chisq = 4.66, df = 2, p = 0.09) ni de l'interaction entre ces facteurs (Chisq = 1.49, df = 4, p = 0.82 ; Fig. 45). Quel que soit le statut symbiotique des individus (femelles WXiw, femelles WXA ou mâles WXA), les individus infectés avec l'IIV-31 ont une mortalité plus élevée que les individus contrôles (H20 et NP ; Fig. 45). Ces résultats montrent que la présence de *Wolbachia* ne protège pas les individus contre l'IIV-31, même si une tendance à l'effet du statut symbiotique est observée.

Cependant, lorsque nous considérons le sexe des individus (mâles *vs* femelles génétiques et phénotypiques) et leur lignée (mâles et femelles WXA *vs* femelles WXiw), il s'avère que la survie des individus dépend toujours du traitement (H20, NP ou IIV31 ; Chisq = 117.29, df = 2, $p < 0.001$) mais également de leur sexe (Chisq = 3.92, df = 1, p = 0.04 ; Fig. 46). En revanche, la survie des individus ne dépend pas de leur lignée (Chisq = 0.05, df = 1, p = 0.81), ni de l'interaction entre le traitement, le sexe ou la lignée ($p > 0.05$). Les femelles (WXA et WXiw) infectées par l'IIV-31 survivent plus longtemps que les mâles infectés par l'IIV-31 (Fig. 46 ; test de Tuckey : estimate = -0.58, se = 0.28, p = 0.04).

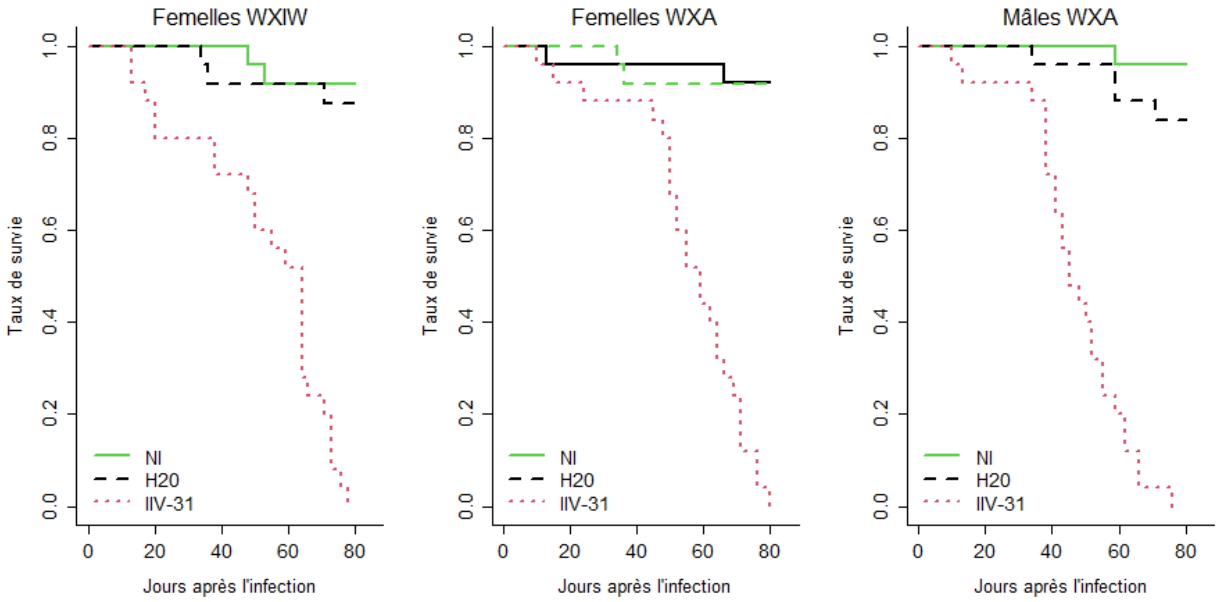


Figure 43. Survie des individus selon le traitement et le statut symbiotique. WXiw : femelles hébergeant *Wolbachia* (*w*VulC). WXA : femelles et mâles asymbiotiques. NI : individus contrôles, jamais infectés. H20 : individus ayant uniquement reçus une piqûre d'eau stérile. IIV-31 : individus infectés avec l'IIV-31 vivant.

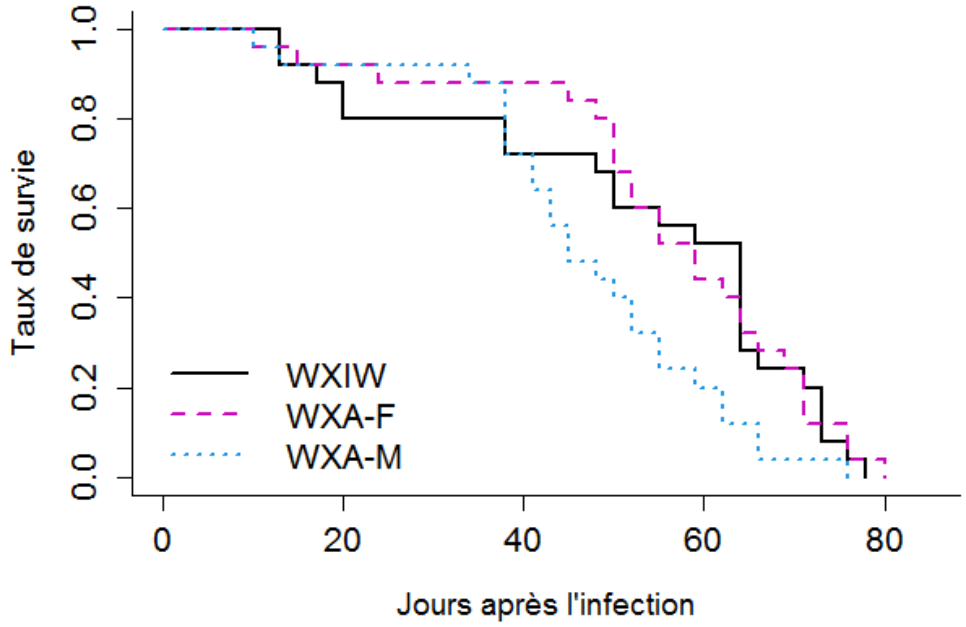


Figure 42. Survie des individus face à l'IIV-31 selon leur sexe (mâle ou femelle). WXiw : femelles génétiques phénotypiques hébergeant *Wolbachia* (*w*VulC). WXA-F : femelles génétiques asymbiotiques. WXA-M : mâles asymbiotiques.

Dans cette deuxième expérience, la présence de *Wolbachia* n'améliore pas les capacités de survie d'*A. vulgare* face à l'IIV-31, alors que *Wolbachia* et l'IIV-31 sont des micro-organismes intracellulaires obligatoires potentiellement en compétition. Ce résultat est en accord la littérature, montrant que *Wolbachia* n'interfère pas avec la réplication des virus à ADN, et ne protège donc pas son hôte contre ces virus, incluant l'IIV-6 (Pimentel et al., 2018 ; Texeira et al., 2008 ; Palmer et al., 2018 ; Graham et al., 2012 ; Parry et al., 2019). Dans certains cas, la présence de *Wolbachia* peut même stimuler la réplication de virus à ADN, grâce à la production de ROS et des dommages cellulaires que *Wolbachia* provoque dans les cellules hôtes (Parry et al., 2019 ; Altini et al., 2020).

Par ailleurs, nous observons une fois de plus que la résistance/tolérance accrue contre l'IIV-31 dépend du sexe des individus (*cf.* expérience 2). Les femelles (génétiques ou phénotypiques hébergeant *Wolbachia*) survivent plus longtemps que les mâles. Puisque la survie des individus dépend de leur sexe mais pas de leur lignée (WXA ou WXiw), ce résultat suggère que la résistance/tolérance accrue face à l'IIV-31 repose sur des capacités physiologiques liées au sexe apparent des individus, plutôt que des facteurs génétiques (*i.e.* issus de la lignée) ou même la présence de *Wolbachia*.

III.3 – Conclusion

Dans cette étude, nous n'avons pas observé de priming immunitaire chez *A. vulgare* contre l'IIV-31, lorsque les individus sont primo-injectés avec ce même virus inactivé ou du Poly (I:C). Même si nous supposons que ces observations soient liées à la biologie de ce virus, nous ne connaissons pas la manière dont l'IIV-31 interagit avec le système d'*A. vulgare*, ce qui limite les interprétations possibles de l'absence de priming immunitaire. Nous ne pouvons ainsi exclure qu'*A. vulgare* exprime un priming immunitaire contre l'IIV-31 selon d'autres conditions expérimentales que celles que nous avons utilisées (*i.e.* autre méthode d'inactivation, délais plus longs entre les infections, etc). De plus, le priming immunitaire dépend de la manière dont les individus sont infectés (*cf.* Introduction, partie II.2). Il serait alors pertinent de tester la virulence de l'IIV-31 et le priming immunitaire contre ce virus *via* une contamination orale.

Nous avons également montré que la présence de *Wolbachia* n'interfère pas avec la mortalité des individus induite par l'IIV-31, ce qui rejoint plusieurs observations retrouvées dans la littérature. Cependant, les femelles *A. vulgare* ont de meilleures capacités de

résistance et/ou de tolérance contre l'IIV-31 que les mâles, qu'elles hébergent *Wolbachia*, ou non. Cette différence pourrait s'expliquer par les caractéristiques physiologiques intrinsèques des femelles, qui semblent en général avoir une immunocompétence plus élevée que les mâles chez *A. vulgare* (Sicard et al., 2010 ; Pigeault et al., 2014). Cependant, *Wolbachia* réduit également l'immunocompétence des femelles phénotypiques (*cf.* Fig.12, page 53). Afin de comprendre comment et pourquoi les femelles paraissent plus résistantes/tolérantes à l'infection virale, nous menons actuellement des expériences complémentaires visant à analyser la réponse immunitaire et la potentielle septicémie provoquée par l'infection de l'IIV-31 chez des mâles et des femelles WXA. En effet, compte tenu de la charge virale que les individus présentent, il se pourrait que ces derniers meurent à cause d'infections opportunistes par des bactéries commensales, plutôt que par la virulence même de ce virus. Chez la drosophile par exemple, l'inoculation d'*Erwinia carotovora carotovora*, une bactérie commensale, engendre une mortalité de 50% chez les individus lorsqu'ils ont préalablement été infectés avec l'IIV-6, 8 jours plus tôt (West, 2018).

Chez *A. vulgare*, nous savons que l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia* influencent l'immunocompétence des individus (Sicard et al., 2010 ; Pigeault et al., 2014) et que *Wolbachia* protège *A. vulgare* contre *S. enterica* (Braquart-Varnier et al., 2015b). De ce fait, nous avons exploré dans la partie suivante, comment l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia* influencent l'expression du priming immunitaire contre *S. enterica* chez cette espèce.

CHAPITRE IV

Le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica* peut-il être impacté par certains facteurs intrinsèques ?

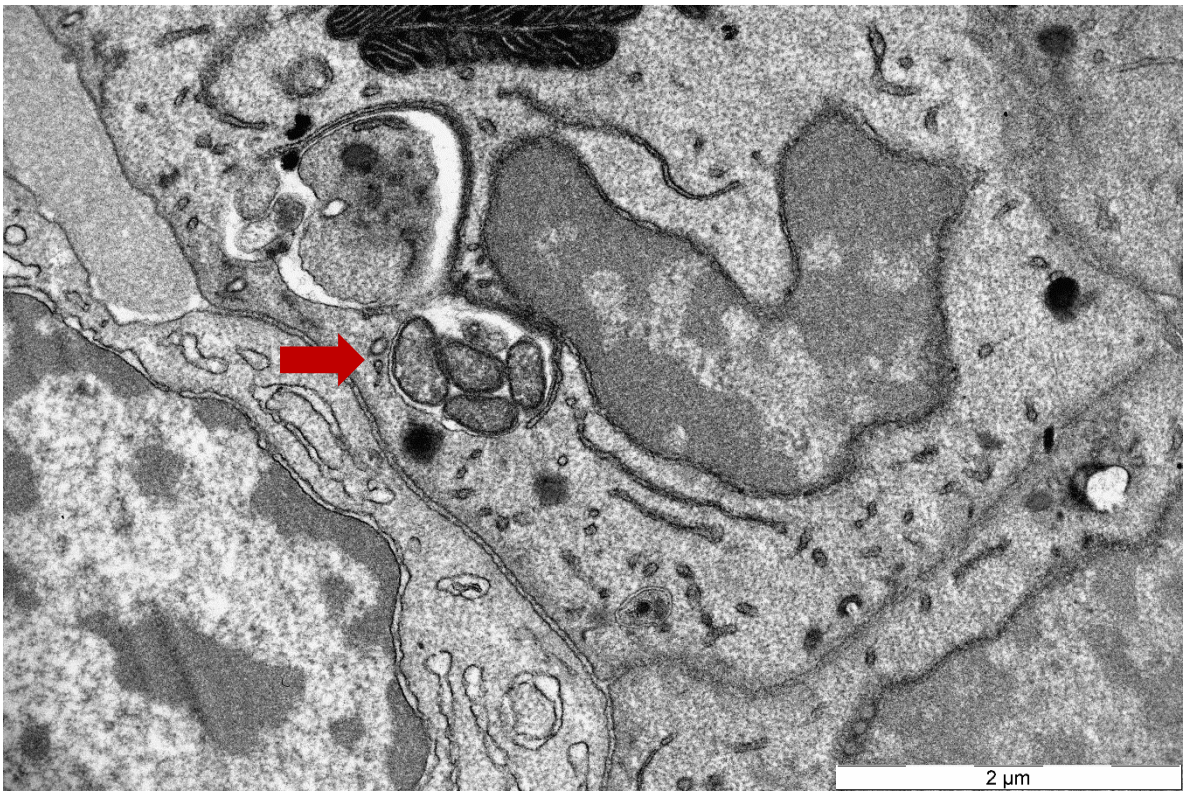
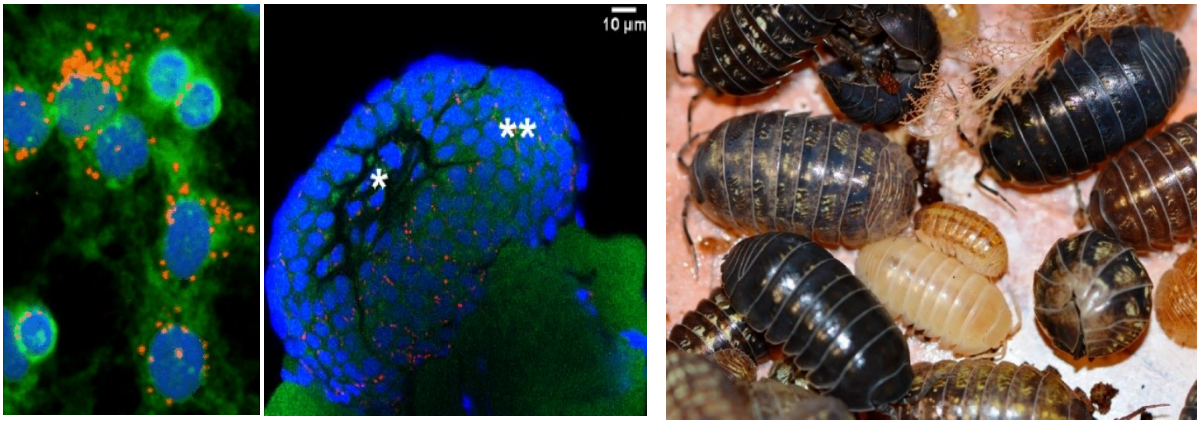


Photo : Présence de *Wolbachia* (flèche rouge) dans une cellule d'*A. vulgare.* Crédit photo : Christine Braquart-Varnier et Maryline Raimond.

Prologue

Dans ce chapitre, nous avons exploré l'influence de l'âge, du sexe et de la présence de *Wolbachia* sur l'expression du priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica*. *Wolbachia* est connue pour féminiser les mâles génétiques en femelles phénotypiques chez *A. vulgare*. Ainsi, nous avons choisi d'injecter des femelles et des mâles asymbiotiques ainsi que des femelles symbiotiques avec deux doses successives de *S. enterica* vivantes (séparées de 7 jours). Les individus injectés étaient âgés de 1 an ou de 2 ans. Leurs taux de survie après la seconde infection ont ensuite été comparés.

Dans la littérature, il s'avère que certains symbiotes protecteurs peuvent déclencher un priming immunitaire « symbiotique » chez leur hôte (cf. Introduction, II.3), c'est-à-dire que leur présence stimule le système immunitaire de l'hôte, ce qui le protège contre des pathogènes. Très peu d'études ont analysé l'interférence entre les primings immunitaires « symbiotique » et « pathogénique » au sein d'un même hôte. Ainsi, nous avons exploré le rôle du priming immunitaire dans les interactions hôtes/symbiotes protecteurs/pathogènes au travers d'un article de synthèse, visant à explorer pourquoi et comment les symbiotes protecteurs influencent le priming immunitaire « pathogénique » chez les invertébrés, de manière conceptuelle, mécanistique et évolutive.



Photos : Gauche : *Wolbachia* (rouge) dans les hémocytes et organe hématopoïétique d'*A. vulgare*, Droite : mâles et femelles *A. vulgare* de différents âges. Photos : Joanne Bertaux (gauche) et Isabelle Giraud (droite).

I. VARIATION DU PRIMING IMMUNITAIRE CONTRE *S. ENTERICA* SELON L'ÂGE, LE SEXE ET LA PRESENCE OU NON DE *WOLBACHIA*

[Partie entièrement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2021. Avec le support technique de C. Delaunay, (titrage de *Wolbachia*)]

I.1 – Contexte, objectifs et design expérimental

Le système immunitaire est un processus biologique plastique, influencé par divers facteurs environnementaux et/ou intrinsèques aux individus (Buchmann, 2014 ; Chiu et al., 2017). Chez les invertébrés, il est fréquent que les activités immunitaires des individus déclinent avec l'âge, selon un processus dit « d'immunosénescence » (Adamo et al., 2001 ; Klein & Flanagan, 2016 ; Stanley, 2012, Mackenzie et al., 2011 ; Doums et al., 2002 ; Park et al, 2011 ; Moret & Schmid-Hempel, 2009). Autrement dit, plus les individus vieillissent et plus leurs fonctions immunitaires sont altérées. Chez les bourdons *Bombus terrestris* et *B. lucorum* par exemple, les individus les plus vieux ont des capacités d'encapsulation et de mélanisation plus faibles que les jeunes individus (Doums et al., 2002). Le déclin des fonctions immunitaires avec l'âge peut aussi être lié à des compromis évolutifs entre l'allocation des ressources dans la reproduction ou le maintien somatique. Chez le charançon *Rhynchophorus ferrugineus* par exemple, les vieilles femelles survivent moins bien à une infection de *Metarhizium anisopliae* survenant après la reproduction, par rapport aux jeunes femelles (Pu et al., 2021). Par ailleurs, l'âge des individus peut affecter différemment les capacités immunitaires selon le sexe (Adamo et al., 2001 ; Mackenzie et al., 2011). Chez le grillon *Gryllus texensis*, les vieux individus (mâles et femelles) présentent un déclin similaire de leurs fonctions immunitaires avec l'âge, mais les vieux mâles sont moins résistants à une infection par *Serratia marcescens* comparés aux jeunes mâles et aux femelles (jeunes ou vieilles ; Adamo et al., 2001).

Souvent, les femelles ont de meilleures capacités immunitaires que les mâles (Arizza et al., 2013 ; Kurtz et al., 2000 ; May, 2007 ; Rheins & Karp, 1985 ; Rolff, 2001 ; Taylor & Kimbrell, 2007 ; Vogelweith et al., 2017 ; Yourth et al., 2002). Dans la littérature, l'hypothèse la plus répandue est que les femelles maximiseraient leur chance de survie face à des pathogènes pour assurer leur reproduction, tandis que les mâles favoriseraient les accouplements multiples au dépend de leur maintien somatique (Bateman, 1948 ; May, 2007 ; Rolff, 2002). Ces deux stratégies à l'égard des capacités immunitaires reposeraient sur un coût plus important de la reproduction chez les femelles (*i.e.* réserves pour les ovocytes, soins

maternels, etc) et une compétition/sélection sexuelle pour l'accès à la reproduction plus importantes chez les mâles (Metcalf et al., 2019).

Néanmoins, quel que soit le sexe des individus, la présence de symbiotes au sein des individus peut également modifier leur résistance contre des pathogènes (Hedges et al., 2008 ; Kim et al., 2015 ; Moreira et al., 2009 ; Scarborough et al., 2005 ; Teixeira et al., 2008 ; Walker et al., 2011 ; Ye et al., 2013). Chez le puceron *Acyrthosiphon pisum*, la présence de *Regiella* (une bactérie endosymbiotique) réduit la sporulation du champignon pathogène *Pandora neophidis,* ce qui augmente la résistance des individus face à ce dernier (Scarborough et al., 2005). Pour définir ce type de relation(s) entre l'hôte et un/des symbiote(s) protecteur(s), nous parlons généralement de « symbioses défensives » (Clay, 2014 ; Oliver & Moran, 2009 ; Oliver et al., 2014 ; *cf.* Chapitre IV, partie II). Les symbiotes protecteurs peuvent améliorer la résistance de leurs hôtes soit (1) en interférant directement avec les pathogènes *via* une compétition inter-microbienne, soit (2) en stimulant l'immunité de leur hôte *via* un priming immunitaire « symbiotique » (*cf.* Introduction, partie II.3).

Alors que plusieurs études démontrent que le priming immunitaire peut varier selon le sexe et l'âge des individus (Daukšte et al., 2012 ; Moret et al., 2019 ; Rheins et Karp, 1985 ; Mondotte et al., 2018 ; Brown et al., 2019), très peu d'expériences ont analysé l'influence des symbiotes protecteurs sur l'expression du priming immunitaire déclenché par des pathogènes (Braak et al., 2013 ; Contreras-Garduño et al., 2015 ; Futo et al., 2016 ; Rodrigues et al., 2010). À notre connaissance, aucune étude n'a exploré comment ces trois facteurs et leurs interactions influencent le priming immunitaire chez une même espèce. Pourtant, déterminer si ces facteurs affectent le priming immunitaire pathogénique permettrait de mieux appréhender ses fonctions et son évolution.

A. vulgare demeure un bon modèle pour investiguer cette question. Chez cette espèce à longue durée de vie (*cf.* Introduction, partie III.1), des variations d'immunocompétences sont observées en fonction de l'âge et du sexe des individus (Depeux et al., 2020 ; Sicard et al., 2010). Aussi, *Wolbachia* est naturellement présente dans les populations naturelles d'*A. vulgare* (*cf.* Introduction, partie III.3). Chez cette espèce, *Wolbachia* féminise les mâles génétiques en femelles phénotypiques, mais elle est également capable de protéger *A. vulgare* contre *S. enterica* et *L. ivanovii* (Braquart-Varnier et al., 2015b). En effet, les individus symbiotiques ont de meilleures capacités de survie contre ces pathogènes comparées aux individus asymbiotiques (Braquart-Varnier et al., 2015b). *Wolbachia* induit également une surrégulation des gènes de l'immunité, ainsi qu'un déclin général des fonctions immunitaires

avec l'âge (*cf.* Fig. 12, page 53). Par ailleurs, nous avons précédemment démontré que les individus *A. vulgare* sont capables d'exprimer un priming immunitaire suivant une première injection de *S. enterica* vivantes ou inactivées, ce qui les protègent contre une infection létale ultérieure de *S. enterica* survenant 7 jours plus tard (*cf.* Chapitre II, partie I, Prigot-Maurice et al., 2019). Compte tenu de ces informations, nous avons exploré comment l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia* influencent l'expression du priming immunitaire chez *A. vulgare*.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une expérience de priming immunitaire avec des mâles et femelles asymbiotiques (lignée WXA, appelée *w*- dans cette partie et dans l'article associé : Prigot-Maurice et al., 2021), ainsi que des femelles symbiotiques (lignée WXiw, appelée ici *w*+, hébergeant la souche *w*VulC de *Wolbachia*) de 1 an et de 2 ans. Puisque *Wolbachia* induit une féminisation des mâles génétiques en femelles phénotypiques (Martin et al., 1973 ; Rigaud & Juchault, 1993 ; Bourtzis & Miller, 2008), nous n'avons pas pu inclure un groupe de mâles symbiotiques dans notre expérience. Il est important de garder à l'esprit que les femelles symbiotiques *w*+ utilisées ici regroupent théoriquement des mâles féminisés en femelles fonctionnelles (*i.e.* « phénotypiques ») ainsi que de vraies femelles génétiques, indissociables les unes des autres. Chaque type d'individus a reçu trois traitements différents : soit (1) une primo-injection avec 10^3 *S. enterica* vivantes, soit (2) une primo-injection avec du LB stérile, soit (3) aucune primo-injection. Sept jours plus tard, tous les individus ont été injectés avec une DL_{50} de *S. enterica*, puis nous avons relevé la survie des individus quotidiennement durant 7 jours. Nous avons ensuite comparé la survie des individus selon leurs statuts symbiotiques et leur sexe (mâles asymbiotiques, femelles asymbiotiques ou femelles symbiotiques) ainsi que leur âge (1 an ou 2 ans) afin de déterminer l'influence de ces facteurs sur l'expression du priming immunitaire. Certaines études montrent que la quantité de *Wolbachia* au sein d'un individu est parfois positivement corrélée avec la résistance contre des pathogènes (Lu et al., 2012, Osborne et al., 2012). Nous avons alors également mesuré et comparé la quantité systémique de *Wolbachia* entre les jeunes (*i.e.* 1 an) et les vieilles (*i.e.* 2 ans) femelles symbiotiques.

Cette étude fait l'objet d'un article scientifique publié en 2021 dans *Journal of Evolutionnary Biology*. Pour tous les détails concernant la méthode, les effectifs et les analyses statistiques de survie utilisées, cet article est disponible en Annexe 4.

I.2 – Résultats et discussion

I.2.a – Effet de l'âge et du sexe chez les individus asymbiotiques

Concernant les individus asymbiotiques (*i.e. w*-, n'hébergeant pas *Wolbachia*), nous observons que la survie de ces individus dépend du traitement qu'ils ont reçu lors de la primo-injection (*S. enterica*, LB ou sans injection), de leur âge (1 ou 2 ans) et de leur sexe (mâle ou femelle, Fig. 47, Annexe 4). Quel que soit le sexe et l'âge des individus, les individus primo-injectés avec *S. enterica* ont de meilleures capacités de survie par rapport aux individus contrôles (LB et sans injection ; Fig. 47 ; Tab. 17).

Ce premier résultat confirme la présence d'un priming immunitaire chez les femelles *A. vulgare* contre *S. enterica* (Prigot-Maurice et al., 2019 ; Chapitre II, partie I). Il nous indique également, pour la première fois, que les mâles *A. vulgare* sont capables d'un priming immunitaire contre cette bactérie. Ces observations rejoignent celles de la littérature, montrant que le priming immunitaire s'exprime chez les deux sexes (Khan et al., 2016 ; Moreno-Garcia et al., 2015 ; Roth et al., 2009b), même si chez *A. vulgare*, les mâles et les femelles asymbiotiques ont une immunité basale différente (les femelles ont une activité phénoloxydase plus élevée mais une concentration en hémocytes circulants plus faible que les mâles ; Sicard et al., 2010).

Le priming immunitaire s'exprime aussi bien chez les jeunes (1 an) que chez les vieux (2 ans) individus asymbiotiques (Fig. 47, Tab. 17). Alors que le priming immunitaire chez *Tenebrio molitor* n'est pas observé chez les vieux individus, le priming immunitaire de *Daphnia magna* semble encore plus prononcé chez les vieux individus comparés aux jeunes (Daukšte et al., 2012 ; Garbutt et al., 2014). Dans notre étude, la capacité à exprimer un priming immunitaire chez les individus asymbiotiques n'est pas altérée par l'âge, même si les vieux individus sont connus pour présenter des signes d'immunosénescence (Depeux et al., 2020a). Ce résultat pourrait s'expliquer par les caractéristiques biologiques d'*A. vulgare* (*cf.* Introduction, partie III.1). En conditions naturelles, cette espèce peut se reproduire jusqu'à 3 ans, dans un environnement riche en diversité et en quantité microbienne (Paris & Pitelka, 1962 ; Ranjard & Richaume, 2001 ; Torsvik et al., 1990). Compte tenu des risques d'infections élevés, ces caractéristiques pourraient ainsi favoriser la sélection d'un priming immunitaire même chez les individus âgés (Best et al., 2013).

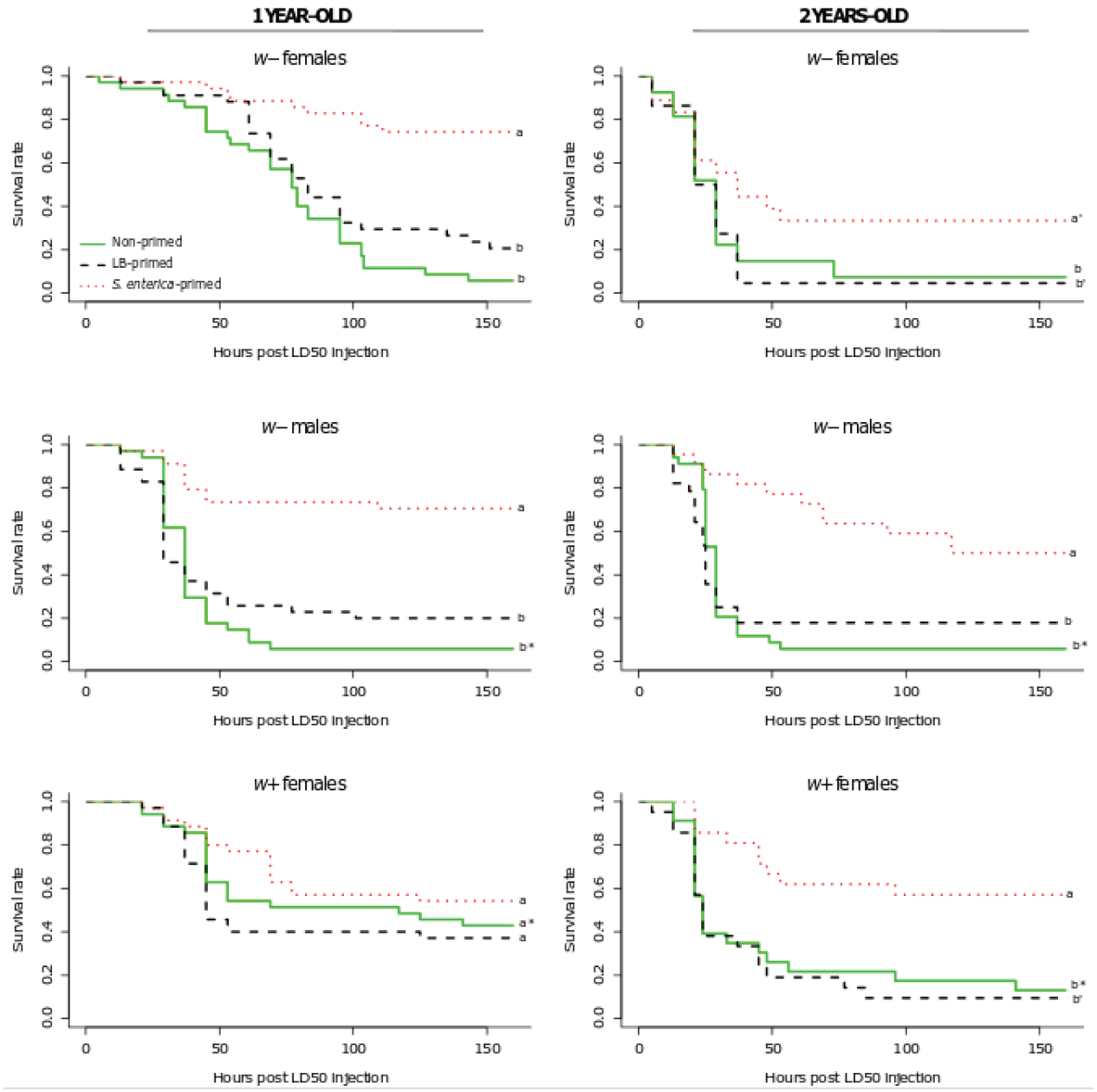


Figure 44. Taux de survie des individus selon leur âge, leur statut symbiotique (*w*- ou *w*+) et le traitement reçu. Non-primed : individus ayant uniquement reçus la DL_{50} de *S. enterica*. LB-primed : individus primo-injectés avec du LB stérile. *S. enterica*-primed : individus primo-injectés avec 10^3 *S. enterica*. *w*- : individus asymbiotiques (sans *Wolbachia*). *w*+ : femelles symbiotiques hébergeant *Wolbachia*.

Différentes lettres indiquent des différences significatives entre les traitements au sein d'un même statut symbiotique (exemple : les femelles *w*- *S. enterica*-primed de 1 an survivent mieux que les femelles *w*- LB-primed de 1 an). **Voir Tableau 17 pour les résultats statistiques.**

Les apostrophes indiquent des différences significatives du même traitement entre les individus de 1 an et de 2 ans d'un même statut symbiotique (exemple : les femelles *w*- *S. enterica*-primed de 1 an survivent mieux que les femelles *w*- *S. enterica*-primed de 2 ans). **Voir Tableau 18 pour les résultats statistiques.**

Les étoiles indiquent des différences significatives d'un même traitement entre différents statuts symbiotiques du même âge (exemple : les mâles *w*- non-primed de 1 an survivent moins bien que les femelles w- non-primed de 1 an). **Voir Tableau 19 pour les résultats statistiques.** Tiré de Prigot-Maurice et al., 2021 ; Annexe 4).

Tableau 17. Comparaisons deux à deux (ajustement de Tuckey) et hazard ratio de la survie des individus selon le traitement, pour chaque âge et chaque statut symbiotique. Non-primed : individus ayant uniquement reçus la DL_{50} de *S. enterica*. LB-primed : individus primo-injectés avec du LB stérile. *S. enterica*-primed : individus primo-injectés avec 10^3 *S. enterica*. *w*- : individus asymbiotiques (sans *Wolbachia*). *w*+ : femelles symbiotiques hébergeant *Wolbachia*. Quand l'intervalle de confiance du hazard ratio ne chevauche pas 1, le risque de mourir est moins important pour les individus *S. enterica*-primed.

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	SE	*p-value*	Hazard ratio
1-year-old/ w^- females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.649	0.415	**.0002**	**0.13 CI: [0.06;0.27]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.34	0.423	**.004**	**0.19 CI: [0.09;0.42]**
LB-primed/ Non-primed	0.30	0.314	.586	0.65 CI: [0.39;1.08]
2-year-old/ w^- females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.174	0.413	**.012**	**0.47 CI: [0.24;0.95]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.288	0.438	**.009**	**0.43 CI: [0.21;0.9]**
LB-primed/ Non-primed	−0.114	0.378	.951	1.09 CI: [0.61;1.96]
1-year-old/ w^- males				
S. enterica-primed/ Non-primed	2.089	0.406	**<.001**	**0.16 CI: [0.07;0.34]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.821	0.410	**<.001**	**0.2 CI: [0.09;0.4]**
LB-primed/ Non-primed	0.267	0.314	.670	0.83 CI: [0.49;1.38]
2-year-old/ w^- males				
S. enterica-primed/ Non-primed	2.044	0.401	**<.001**	**0.24 CI: [0.12;0.49]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.717	0.415	**.0001**	**0.25 CI: [0.12;0.52]**
LB-primed/ Non-primed	0.327	0.331	.987	0.95 CI: [0.55;1.63]
1-year-old/ w^+ females				
S. enterica-primed/ Non-primed	0.335	0.379	.65	0.70 CI: [0.36;1.3]
S. enterica-primed/ LB-primed	0.587	0.373	.257	0.53 CI: [0.28;1.0]
LB-primed/ Non-primed	−0.252	0.356	.758	1.30 CI: [0.71;2.4]
2-year-old/ w^+ females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.679	0.452	**.0006**	**0.28 CI: [0.13;0.61]**
S. enterica-primed/ LB-primed	2.019	0.461	**<.001**	**0.24 CI: [0.11;0.54]**
LB-primed/ Non-primed	−0.340	0.388	.656	1.15 CI: [0.61;2.16]

Cependant, les capacités de survie des individus sont différentes selon l'âge au sein d'un même sexe. Les femelles asymbiotiques de 2 ans primo-injectées avec du LB ou *S. enterica* ont de plus faibles capacités de survie après la DL_{50} de *S. enterica*, comparées aux femelles asymbiotiques de 1 an des mêmes traitements (Fig. 47, Tab. 18). Cette différence n'est pas observée chez les mâles : qu'ils soient âgés de 1 an ou de 2 ans, leurs capacités de survie après la seconde infection de *S. enterica* sont similaires, quel que soit le traitement (Fig. 47, Tab. 18).

Tableau 18. Comparaison deux à deux (ajustement de Tuckey) et hazard ratio de la survie des individus selon l'âge, pour chaque statut symbiotique et chaque traitement. Non-primed : individus ayant uniquement reçus la DL_{50} de *S. enterica*. LB-primed : individus primo-injectés avec du LB stérile. *S. enterica*-primed : individus primo-injectés avec 10^3 *S. enterica*. *w-* : individus asymbiotiques (sans *Wolbachia*). *w+* : femelles symbiotiques hébergeant *Wolbachia*. Quand l'intervalle de confiance du hazard ratio ne chevauche pas 1, le risque de mourir est plus important chez les individus de 2 ans.

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	SE	*p-value*	Hazard ratio
w^- females				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−1.698	0.645	**.008**	**4.6 CI: [1.9;11]**
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−1.646	0.572	**.004**	**5.6 CI: [3;11]**
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−1.001	0.550	.068	**2.7 CI: [1.6;4.7]**
w^- males				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−0.971	0.606	.109	1.8 CI: [0.76;4.2]
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−0.867	0.513	.090	1.6 CI: [0.93;2.8]
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−0.927	0.493	.060	**1.9 CI: [1.2;3.2]**
w^+ females				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−0.342	0.614	.576	1 CI: [0.45;2.3]
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−1.089	0.545	**.045**	**2.8 CI: [1.5;5.1]**
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−1.001	0.550	.068	**2.9 CI: [1.6;5.5]**

Nous supposons que le déclin de survie chez les vieilles femelles asymbiotiques résulte d'une sénescence plus importante dûe à l'âge chez les femelles. Chez *A. vulgare*, les vieux mâles et les vieilles femelles sont autant impactés par une sénescence cellulaire (Depeux et al., 2020a ; Sicard et al., 2010). Cependant, pour un âge similaire, les femelles ont une activité β-galactosidase plus élevée et des hémocytes moins viables que les mâles, montrant que les femelles sont physiologiquement plus sénescentes que les mâles (Depeux et al., 2020a). Cet état de sénescence chez les femelles pourrait s'expliquer par un investissement plus prononcé dans la reproduction comparé aux mâles (Bonduriansky et al., 2008 ; Lawniczak et al., 2007 ; Sheldon & Verhulst, 1996 ; Thiel, 2003 ; Vinogradov, 1998). Bien que les individus de cette expérience soient vierges, les femelles *A. vulgare* qui ne se sont jamais accouplées développent des marsupiums lors de mues parturielles, dans lesquels elles déposent et incubent des œufs non-fécondés (Appel et al., 2011 ; Hornung, 2011 ; Warburg, 2001). C'est ce que nous appelons les « pontes blanches ». En raison de leur âge, les vieilles femelles (2 ans) produisent plus de pontes blanches que les jeunes femelles (1 an). Ainsi, les vieilles femelles ont probablement utilisé plus d'énergie dans ce processus au cours

de leur vie que les jeunes femelles. Par conséquent, elles ont sûrement moins d'énergie disponible pour lutter contre une seconde infection de *S. enterica*, d'autant plus que ce priming immunitaire est corrélé à des changements cellulaires soutenus (*cf.* Chapitre I, partie I ; Prigot-Maurice et al., 2019). En raison de cette allocation énergétique, les vieilles femelles pourraient avoir une réponse immunitaire moins efficace et donc une survie diminuée après la DL_{50} de *S. enterica* par rapport aux jeunes femelles. Les mâles quant à eux n'effectuent que des mues de croissance et n'investissent donc pas autant d'énergie dans la reproduction selon leur âge, comparés aux femelles. Chez *A. vulgare*, les mâles dispersent plus loin que les femelles afin de trouver des partenaires sexuels (Howard, 1980 ; Caubet et al., 2008 ; Broly et al., 2013 ; Durand et al., 2019). Ainsi, ils sont probablement plus souvent exposés à différents pathogènes. Le risque de rencontrer divers pathogènes pourrait ainsi être une force sélective expliquant le maintien des capacités de survie indépendamment de l'âge chez les mâles *A. vulgare*.

I.2.b – Effet de *Wolbachia* et de l'âge chez les individus symbiotiques

La présence de *Wolbachia* affecte différemment les capacités de survie des femelles symbiotiques selon leur âge (Fig 47. Tab. 17). En effet, les jeunes femelles symbiotiques primo-injectées avec *S. enterica* n'ont pas de meilleures capacités de survie comparées aux jeunes femelles symbiotiques contrôles (Fig. 47, Tab. 17, *cf.* Annexe 4). Par contre, les vieilles femelles symbiotiques primo-injectées avec *S. enterica* ont de meilleures capacités de survie comparées aux veilles femelles symbiotiques contrôles, de la même manière que les individus asymbiotiques (Fig. 47 ; Tab. 17). En d'autres termes, les jeunes femelles hébergeant *Wolbachia* ne montrent pas de priming immunitaire, alors que ce dernier est observé chez les vieilles femelles symbiotiques. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

(1) Chez les jeunes femelles symbiotiques, il se pourrait que les femelles contrôles (primo-injectées avec du LB ou non-injectées) expriment déjà un priming immunitaire symbiotique (*i.e.* induit par la présence de *Wolbachia ;* Kambris et al., 2009 ; Pan et al., 2018 ; Rancès et al., 2012), ce qui nous empêche de desceller le priming immunitaire pathogénique des femelles primo-injectées avec *S. enterica*. En effet, si nous comparons la survie des individus contrôles selon leurs statuts symbiotiques (Tab. 19), les jeunes femelles symbiotiques non-injectées survivent mieux que les jeunes mâles asymbiotiques non-injectés

et ont moins de chance de mourir que les jeunes femelles asymbiotiques non-injectées (Tab. 19). Il semblerait donc que la présence de *Wolbachia* protège les jeunes femelles contrôles contre *S. enterica.* Ce résultat va dans le sens de celui de Braquart-Varnier et al. (2015b), montrant que les femelles de 1 an sont protégées de *S. enterica* grâce à la présence de *Wolbachia*, qui montre notamment une diminution de la charge bactérienne de *S. enterica* dans les 24h suivant l'infection.

Tableau 19. Comparaisons deux à deux (ajustement de Tuckey) et hazard ratio de la survie des individus selon le statut symbiotique, pour chaque âge et chaque traitement. Non-primed : individus ayant uniquement reçus la DL_{50} de *S. enterica*. LB-primed : individus primo-injectés avec du LB stérile. *S. enterica*-primed : individus primo-injectés avec 10^3 *S. enterica*. *w-* : individus asymbiotiques (sans *Wolbachia*). *w+* : femelles symbiotiques hébergeant *Wolbachia*. Quand l'intervalle de confiance du hazard ratio ne chevauche pas 1, le risque de mourir est moins important pour les mâles w- ou les femelles w+.

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	SE	*p-value*	Hazard ratio
1-year-old/ Non-primed				
w^- females/ w^- males	−0.652	0.525	.421	**2.61 CI: [1.57;4.34]**
w^- females/ w^+ females	0.636	0.543	.470	**0.52 CI: [0.29;0.91]**
w^- males/ w^+ females	−1.288	0.545	**.04**	**0.20 [CI: 0.11;0.36]**
1-year-old/ LB-primed				
w^- females/ w^- males	−0.693	0.535	.397	**1.96 CI: [1.15;3.3]**
w^- females/ w^+ females	0.075	0.545	.989	0.98 CI: [0.56;1.7]
w^- males/ w^+ females	−0.768	0.544	.333	**0.50 CI: [0.29;0.88]**
1-year-old/ *S. enterica*-primed				
w^- females/ w^- males	−0.212	0.652	.943	1.3 CI: [0.53;3.2]
w^- females/ w^+ females	−0.677	0.623	.521	2.1 CI: [0.9;4.8]
w^- males/ w^+ females	0.465	0.615	.729	1.60 CI: [0.73;3.5]
2-year-old/ Non-primed				
w^- females/ w^- males	−0.355	0.509	.765	0.9 CI: [0.53;1.5]
w^- females/ w^+ females	0.858	0.547	.259	0.79 CI: [0.43;1.4]
w^- males/ w^+ females	−1.213	0.439	**.015**	0.87 CI: [0.49;1.5]
2-year-old/ LB-primed				
w^- females/ w^- males	0.085	0.549	.986	0.77 CI: [0.42;1.4]
w^- females/ w^+ females	0.632	0.571	.510	0.78 CI: [0.41;1.5]
w^- males/ w^+ females	−0.547	0.455	.451	1.0 CI: [0.55;1.9]
2-year-old/ *S. enterica*-primed				
w^- females/ w^- males	0.514	0.599	.666	0.48 CI: [0.21;1.1]
w^- females/ w^+ females	1.363	0.637	.08	0.44 CI: [0.18;1]
w^- males/ w^+ females	−0.848	0.551	.271	0.9 CI: [0.37;2.2]

(2) *Wolbachia* et *S. enterica* sont deux bactéries intracellulaires à gram (-). Ainsi, il se pourrait qu'elles soient en compétition directe pour leur niche écologique et les ressources au sein de l'hôte (Caragata et al., 2013 ; Chiu et al., 2017 ; Pan et al., 2018). Ainsi, *Wolbachia* pourrait directement réduire la charge bactérienne de *S. enterica* chez les jeunes femelles symbiotiques (Braquart-Varnier et al., 2015b), ce qui expliquerait les meilleures capacités de survie des jeunes femelles symbiotiques contrôles par rapport aux individus asymbiotiques

contrôles. Dans la mesure où nous n'observons pas de priming immunitaire pathogénique chez les jeunes femelles symbiotiques (Fig. 47, Tab. 17), nous ne pouvons être certain de son expression au sein de ce groupe de femelles. Cependant, le priming immunitaire pathogénique contre *S. enterica* s'exprime chez les vieilles femelles symbiotiques (Fig. 47, Tab. 17). Si les vieilles femelles symbiotiques sont capables d'un priming immunitaire pathogénique, alors ce processus devrait également s'établir chez les jeunes femelles symbiotiques. La question résultante de ces observations est : pourquoi les vieilles femelles montrent-elles un priming immunitaire et pas les jeunes ? Deux nouvelles hypothèses peuvent alors être proposées :

(1) L'observation d'un priming immunitaire chez les vieilles femelles symbiotiques pourrait être le résultat d'une immunosénescence plus avancée. Sicard et al. (2010), montre que la présence de *Wolbachia* chez les vieilles femelles symbiotiques de 2 ans est corrélée à une diminution de la concentration totale en hémocytes et de l'activité phénoloxydase (Sicard et al., 2010). Ainsi, si les capacités immunitaires des vieilles femelles symbiotiques sont diminuées, le priming immunitaire symbiotique déclenché par *Wolbachia* pourrait lui aussi être diminué. Par conséquent, *Wolbachia* ne protège plus les vieilles femelles symbiotiques contrôles, et donc le priming immunitaire pathogénique contre *S. enterica* est observé. Nos résultats tendent à rejoindre cette hypothèse, puisque les vieilles femelles symbiotiques contrôles (primo-injectées avec du LB ou non-injectées) n'ont globalement pas de meilleures capacités de survie comparées aux vieux mâles et aux vieilles femelles asymbiotiques contrôles (excepté pour les mâles non-injectés ; Fig. 47, Tab. 19). Il semblerait donc que l'absence de priming immunitaire symbiotique ne masque plus le priming immunitaire pathogénique déclenché par la primo-injection de *S. enterica*.

(2) La deuxième hypothèse serait que la quantité de *Wolbachia* est différente selon l'âge des femelles symbiotiques. Dans la littérature (en l'absence de priming immunitaire pathogénique induit) il est fréquent d'observé que la quantité de *Wolbachia* est positivement corrélée à la résistance des hôtes contre des pathogènes (López-Madrigal & Duarte, 2019 ; Lu et al., 2012 ; Osborne et al., 2012). Or, les vieux individus ont souvent des quantités de *Wolbachia* plus faibles que les jeunes individus, ce qui les protègent moins bien contre des pathogènes (Binnington & Hoffman, 1989 ; Breeuwer & Werren, 1993 ; Ikeda et al., 2003). De ce fait, l'absence de protection médiée par *Wolbachia* chez les vieilles femelles symbiotiques contrôles pourrait s'expliquer par une diminution de la quantité de *Wolbachia* au sein de ces femelles. Or, nous n'observons pas de différence de quantité de *Wolbachia* entre les jeunes et les vieilles femelles symbiotiques (*cf.* Annexe 4). Néanmoins, nous avons

mesuré la quantité totale de *Wolbachia* des femelles. Il n'est donc pas exclu que la quantité de *Wolbachia* selon l'âge des femelles soit différente dans des organes ou des tissus spécifiques, tels que les hémocytes ou les organes hématopoïétiques par exemple, puisque *Wolbachia* est capable d'infecter les hémocytes (Braquart-Varnier et al., 2015a).

I.3 – Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que les deux sexes (mâles et femelles) chez *A. vulgare* sont capables d'exprimer un priming immunitaire pathogénique contre *S. enterica* (Fig. 48). Ce priming immunitaire s'exprime aussi bien chez les jeunes que chez les vieux individus asymbiotiques, même si les vieilles femelles ont un déclin général des capacités de survie comparées aux jeunes femelles (Fig. 48). En revanche, *Wolbachia* semble interférer avec le priming immunitaire pathogénique. Les jeunes femelles symbiotiques primo-injectées avec *S. enterica* ne montrent pas de priming immunitaire pathogénique, parce que les femelles symbiotiques contrôles semble déjà être protégées par *Wolbachia*. Ce résultat montre que lorsque la protection médiée par *Wolbachia* et le priming immunitaire par *S. enterica* sont simultanément établis, les protections ne s'additionnent pas au sein du même hôte.

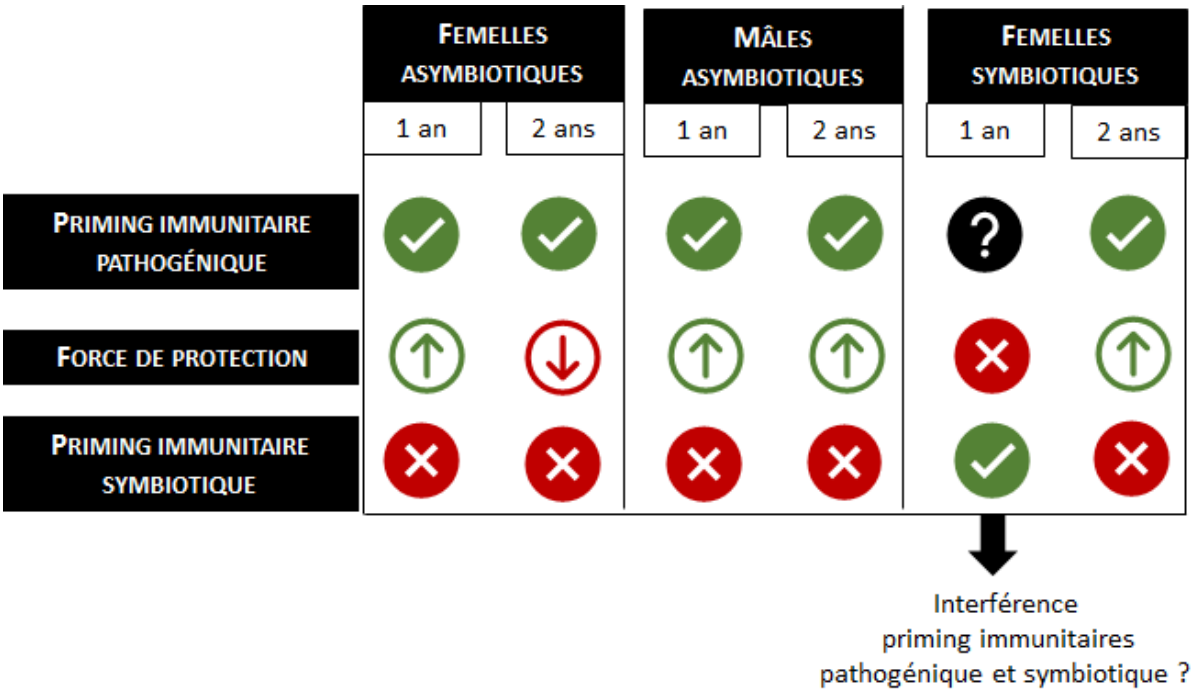


Figure 45. Tableau récapitulatif des résultats observés. Asymbiotiques : individus n'hébergeant pas *Wolbachia*. Symbiotiques : femelles hébergeant *Wolbachia*. Priming immunitaire pathogénique : protection résultante de la primo-infection de *S. enterica*. Priming immunitaire symbiotique : protection résultante de la présence de *Wolbachia*. V vert : présent. X rouge : absent. Flèche verte : protection augmentée. Flèche rouge : protection diminuée. (?) : indéterminé.

En revanche, chez les vieilles femelles symbiotiques, la protection médiée par *Wolbachia* est diminuée, et donc, nous observons une amélioration de survie similaire aux vieux individus (mâles et femelles) asymbiotiques (Fig. 48).

Dans la littérature, il est estimé que seulement 10% des études sur le système immunitaire se sont intéressées aux différences mâles/femelles (Klein et Flanagan, 2016). D'après Tate et Rudolf (2012), peu de données empiriques sont disponibles concernant la variation d'expression du priming immunitaire à l'échelle individuelle, alors que certains facteurs, tel que l'âge, peuvent influencer la dynamique des populations ainsi que la sélection du priming immunitaire. Par exemple, si les juvéniles sont moins résistants aux pathogènes que les adultes, alors le priming immunitaire favoriseraient la survie des adultes au sein des populations (Moret et al., 2019 ; Tate et Rudolf, 2012). Dans ce cas, un priming immunitaire transgénérationnel serait également favorisé, ce qui protégerait davantage les juvéniles des générations suivantes face aux pathogènes. À l'inverse, si ce sont les adultes qui sont moins résistants que les juvéniles, le priming immunitaire devrait être favorisé au sein même de la génération affectée par les pathogènes (Moret et al., 2019 ; Tate et Rudolf, 2012).

Dans notre étude, tous les individus asymbiotiques (mâles et femelles, jeunes ou vieux) expriment un priming immunitaire. Ainsi, si nous transposons les suppositions théoriques de Tate et Rudolf (2012) à notre étude, il se pourrait que les pressions de sélection exercées selon l'âge des individus favorisent aussi bien le maintien du priming immunitaire au sein de la même génération, qu'un potentiel priming immunitaire transgénérationnel (*cf.* Synthèse générale, partie II). Pour vérifier cette hypothèse de manière plus pertinente, nous pourrions alors tester le priming immunitaire chez des juvéniles n'ayant pas encore atteint leur maturité sexuelle (*cf.* Synthèse générale, partie II.3). Cependant, afin d'être sélectionné d'un point de vue évolutif, les bénéfices à exprimer un priming immunitaire pathogénique doivent être supérieurs aux coûts (Moret et al., 2019). Même si nous observons une fois de plus un avantage en termes de survie, et que les coûts sur la reproduction des jeunes femelles asymbiotiques ne semblent pas être proéminents (*cf.* Chapitre I, partie II), des expériences complémentaires sont nécessaires pour étudier la valeur sélective du priming immunitaire selon l'âge et le sexe chez *A. vulgare* (*cf.* Synthèse générale, partie II.3).

Nous avons montré que la présence de *Wolbachia* chez les jeunes femelles contrôles est suffisante pour les protéger contre de potentielles infections par des pathogènes. Même si dans cette expérience nous n'avons pas testé si la protection conférée par *Wolbachia* est causée par un priming immunitaire symbiotique (*i.e.* surexpression de la réponse immunitaire

de l'hôte) et/ou par une compétition microbienne entre *Wolbachia* et *S. enterica*, une première infection par *S. enterica* ne protège pas mieux les jeunes femelles symbiotiques contre une infection ultérieure en raison de la présence de *Wolbachia.* Ainsi*,* nous supposons que *Wolbachia* devrait réduire les pressions de sélection exercées sur le priming immunitaire pathogénique chez les jeunes femelles symbiotiques. À l'inverse, le priming immunitaire pathogénique est observé chez les vieilles femelles symbiotiques, qui ne semblent pas être protégées grâce à *Wolbachia.* L'évolution du priming immunitaire pathogénique dans un contexte symbiotique (ici, en présence de *Wolbachia* dans les populations) serait donc étroitement liée à l'âge des individus chez *A. vulgare*.

Ces suppositions théoriques ne sont pas si facilement interprétables. Dans les populations naturelles, *Wolbachia* biaise le sex-ratio envers les femelles (10 à 20% de mâles en moyenne ; Rigaud et al., 1992 ; Rigaud et al., 1997 ; Bourtzis et Miller, 2008), mais le nombre d'individus hébergeant *Wolbachia* varie entre 6 et 60 % (Juchault et al., 1992). De plus, *Wolbachia* induit certains coûts chez *A. vulgare* : sa présence réduit la fertilité et la durée de vie des femelles symbiotiques (Braquart-Varnier et al., 2008 ; Lachat, 2009) et affaiblit leur système immunitaire (Braquart-Varnier et al., 2008 ; Chevalier et al., 2012 ; Sicard et al., 2010). Ces coûts pourraient alors contrebalancer les bénéfices tirés de la protection par *Wolbachia*. Ainsi, l'expression et la sélection du priming immunitaire d'*A. vulgare* (en conditions naturelles) sont probablement des processus complexes, qui dépendent à la fois du nombre de femelles symbiotiques et de leurs âges ainsi que de la proportion de jeunes et de vieux individus mâles et femelles asymbiotiques.

La protection conférée par *Wolbachia* pourrait aller au-delà de sa propre présence. Par exemple, une expérience d'évolution expérimentale montre que l'exposition régulière au DVC virus d'une lignée symbiotique de drosophiles hébergeant *Wolbachia* conduit à la sélection de gènes de résistance chez ces individus (Faria et al., 2018). Ces derniers deviennent alors plus résistants contre le DVC virus, même si *Wolbachia* est éliminée de la lignée par des traitements antibiotiques (Faria et al., 2018). Chez *A. vulgare*, nous avons récemment conduit une expérience pilote afin de tester si l'élément f, un fragment du génome de *Wolbachia* inséré dans le génome d'*A. vulgare* (Leclercq et al., 2016 ; Cordaux et al., 2011), pouvait conférer à lui seul une protection contre *S. enterica*. Bien que nos résultats soient préliminaires, les femelles disposant seulement de l'élément f dans leur génome ont de meilleurs taux de survie lors d'une simple infection de *S. enterica*, comparées aux femelles issues de la même portée et n'ayant pas l'élément f. Ainsi, il se pourrait que même les individus asymbiotiques des populations naturelles comportant l'élément f aient une

meilleure résistance au pathogène. Cela augmente d'un niveau supplémentaire la difficulté à établir des hypothèses sur l'influence de *Wolbachia* sur la sélection d'un priming immunitaire pathogénique chez *A. vulgare*.

En montrant que l'âge, le sexe et la présence de *Wolbachia* influencent la force de protection du priming immunitaire chez *A. vulgare*, nos résultats contribuent à la caractérisation phénoménologique du priming immunitaire. Compte tenu de leurs implications dans la dynamique des populations, l'âge, le sexe et la présence de symbiotes protecteurs pourraient en partie expliquer l'hétérogénéité du priming immunitaire observé au sein de différentes populations naturelles chez les invertébrés (Khan et al., 2017).

La présence de symbiotes protecteurs est un phénomène répandu chez les organismes vivants (incluant les invertébrés ; Weinert et al., 2015). Nous avons alors exploré, au travers de la littérature scientifique, quelle est l'influence générale des symbiotes protecteurs sur l'expression et la sélection du priming immunitaire pathogénique chez les invertébrés.

II. POURQUOI ET COMMENT LES SYMBIOTES PROTECTEURS INFLUENCENT LE PRIMING IMMUNITAIRE PATHOGÉNIQUE CHEZ LES INVERTÉBRÉS

[Partie entièrement valorisée dans Prigot-Maurice et al., 2022]

II.1 – Contexte et objectifs

Comme évoqué en Introduction, la diversité des mécanismes immunitaires est le résultat d'une course aux armements incessante entre les hôtes et les microbes (Danilova, 2006 ; Buchmann, 2014). Alors que le terme « microbes » a longtemps été associé à des pathogènes (Gest, 2004 ; *cf.* Introduction, partie I.1), les hôtes sont capables de tolérer la présence permanente de microbes commensaux (*i.e.* symbioses commensales) et/ou bénéfiques (*i.e.* symbiotes mutualistes ; Bourtzis & Miller, 2008 ; Combes et al., 2018). Dans la littérature, il est largement démontré que les microbes bénéfiques ont un impact considérable sur l'évolution du système immunitaire de l'hôte (Feldhaar & Gross, 2008 ; Gross et al., 2009). Néanmoins, nous manquons de connaissances au sujet de l'influence que peuvent avoir ces symbiotes sur l'expression et la sélection de divers processus immunitaires dressés contre les pathogènes, tel que le priming immunitaire chez les invertébrés.

Parmi les divers symbiotes bénéfiques, certains d'entre eux sont considérés comme de réels assistants du système immunitaire, parfois même comme une « extension » de l'immunité de l'hôte (Chiu et al., 2017). Ces derniers, appelé « symbiotes protecteurs », sont en effet capables de protéger leurs hôtes contre des pathogènes, que ce soient des virus, des bactéries, des champignons ou même des parasites (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022). Cette protection résulte soit d'une compétition microbienne au sein du même hôte, soit d'une stimulation du système immunitaire de l'hôte par les symbiotes (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022). Dans ce deuxième cas, nous avons parlé dans ce manuscrit de « priming immunitaire symbiotique » (*cf.* Introduction, partie II.3 ; Chapitre IV, partie I), un processus similaire au « priming immunitaire pathogénique », mais qui est déclenché par l'infection persistante de symbiotes alors dit « protecteur », et non pas par une première infection par un pathogène.

Face à ce constat, plusieurs questions se posent : (1) Est-ce que les mécanismes du priming immunitaire symbiotique sont différents de ceux du priming immunitaire pathogénique ? (2) Existe-t-il des interactions/interférences entre les primings immunitaires symbiotique et pathogénique au sein d'un même hôte ? (3) Si oui, quelles sont les

conséquences évolutives sur le priming immunitaire pathogénique lorsqu'un priming immunitaire symbiotique est déjà mis en place à l'intérieur du même hôte ?

Ces trois interrogations nous ont mené à rédiger un article de synthèse, accepté en 2021 (mais publié pour 2022) dans le journal *Comparative and Developmental Immunology*, à la suite d'une invitation à contribution au numéro spécial « Invertebrate Immune Priming ». L'article de synthèse présenté ci-après s'organise en quatre parties.

Dans la première partie, nous traitons la signification biologique et sémantique du priming immunitaire pathogénique, d'un point de vue mécanistique et évolutif. Cette partie a été partiellement utilisée pour construire le contexte général de cette thèse (*cf.* Introduction, partie II).

Dans la deuxième partie, grâce à de nombreuses publications de la littérature, nous mettons en évidence l'importance des symbiotes bénéfiques dans l'évolution du système immunitaire des invertébrés,

Dans la troisième partie, nous explorons le phénomène de symbiose défensive et les mécanismes associés au priming immunitaire symbiotique, en nous focalisant particulièrement sur la bactérie endosymbiotique *Wolbachia*.

Dans la quatrième partie, nous tentons d'apporter des hypothèses pertinentes aux trois questions précédemment énoncées. Pour cela, nous avons comparé les mécanismes du priming immunitaire symbiotique et du priming immunitaire pathogénique. Puis, en s'appuyant sur le peu d'études explorant le priming immunitaire pathogénique en présence (ou en absence) de symbiotes protecteurs chez les invertébrés, nous avons essayé de déterminer les potentielles interactions entre les priming immunitaires symbiotique et pathogénique ainsi que les conséquences sur l'évolution du priming immunitaire contre les pathogènes.

II.2 – Article de synthèse

Developmental and Comparative Immunology 126 (2022) 104245

Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/devcompimm

Why and how do protective symbionts impact immune priming with pathogens in invertebrates?

Cybèle Prigot-Maurice [*], Sophie Beltran-Bech [1], Christine Braquart-Varnier [1]

Université de Poitiers - UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267, Bâtiment B8-B35, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106, F, 86073, POITIERS Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Immune priming
Invertebrates
Protective symbionts
Pathogens
Interactions

ABSTRACT

Growing evidence demonstrates that invertebrates display adaptive-like immune abilities, commonly known as "immune priming". Immune priming is a process by which a host improves its immune defences following an initial pathogenic exposure, leading to better protection after a subsequent infection with the same – or different – pathogens. Nevertheless, beneficial symbionts can enhance similar immune priming processes in hosts, such as when they face repeated infections with pathogens. This "symbiotic immune priming" protects the host against pathogenic viruses, bacteria, fungi, or eukaryotic parasites. In this review, we explore the extent to which protective symbionts interfere and impact immune priming against pathogens from both a mechanical (proximal) and an evolutionary (ultimate) point of view. We highlight that the immune priming of invertebrates is the cornerstone of the tripartite interaction of hosts/symbionts/pathogens. The main shared mechanism of immune priming (induced by symbionts or pathogens) is the sustained immune response at the beginning of host-microbial interactions. However, the evolutionary outcome of immune priming leads to a specific discrimination, which provides enhanced tolerance or resistance depending on the type of microbe. Based on several studies testing immune priming against pathogens in the presence or absence of protective symbionts, we observed that both types of immune priming could overlap and affect each other inside the same hosts. As protective symbionts could be an evolutionary force that influences immune priming, they may help us to better understand the heterogeneity of pathogenic immune priming across invertebrate populations and species.

1. Introduction

The immune system is the set of mechanisms that defends an organism against exogenous elements, mostly of microbial origin. This includes the ability to recognise non-self elements and immune effectors (e.g., immune cells, antimicrobial compounds) to deal with the intruders (Chaplin, 2010; Dzik, 2010). The immune system is considered one of the most ancient biological processes that allows organisms to discriminate their own biological components from those of pathogens (including eukaryotic parasites) or other congeners (Danilova, 2006; Cooper, 2012). The ability of self cells in an organism to cooperate to combat non-self cells (e.g., pathogens) may have led to the development of multicellular organisms (Danilova, 2006; Cooper, 2012). All organisms ranging from bacteria to vertebrates possess an immune system, and some analogous ancestral mechanisms can even sense and silence invaders (CRISPR for prokaryotes and RNAi system for eukaryotes; Travis, 2009; Cooper, 2012). Millennia of evolution have led to the emergence of a huge diversity of immune mechanisms across different animal taxa (Danilova, 2006).

For decades, immunologists classified the immune system according to the cellular immune abilities of the host, namely (1) innate immunity based on immune cells with germline-encoded receptors with non-specific* immune responses (*cf. Glossary Box 1) and (2) adaptive immunity, which emerged in jaw vertebrates and uses specialised cells (B and T cells) that remember past pathogens using the recombination of antigen receptors (i.e., immune memory; Cooper and Alder, 2006). However, many researchers have debated this dichotomisation and increasingly view immunity as an evolutionary continuum (Netea et al., 2011, 2019; Cooper, 2012; Criscitiello and de Figueiredo, 2013). Recent research revealed that innate immune cells of vertebrates can be reprogrammed with enhanced immune abilities when repeatedly facing the same pathogens (i.e., trained immunity; Netea et al., 2019). In

* Corresponding author.
E-mail address: cybele.prigot@univ-poitiers.fr (C. Prigot-Maurice).
[1] Co-last authors.

https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104245
Received 11 May 2021; Received in revised form 29 July 2021; Accepted 24 August 2021
Available online 25 August 2021
0145-305X/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

addition, organisms that only have innate immunity can adapt their immune responses according to the type of pathogens encountered, thus demonstrating that innate immunity also has adaptive features (Kurtz, 2005; Milutinović and Kurtz, 2016; Gourbal et al., 2018). This ability is now commonly termed "immune priming". Mainly applied to invertebrates, immune priming is a process by which a host improves its immune defences following an initial infection, leading to better protection after a second exposure with the same – or different – pathogens (Kurtz, 2005; Contreras-Garduño et al., 2016; Lanz-Mendoza and Garduño, 2018).

Although the resulting protections induced by innate immunity (trained immunity or immune priming) are similar when comparing vertebrates and invertebrates, the underlying mechanisms slightly differ to a certain extent (Rimer et al., 2014; Buchmann, 2014). In the literature, immune priming with pathogens includes two major immune processes:

(1) "memory-like immune priming" when prior exposure to a low dose or attenuated pathogen, which is subsequently cleared from the host, provides protection against the same pathogen after re-exposure; this mechanism is functionally similar to adaptive immunity in vertebrates.
(2) "sustained immune response" when prior exposure, which may be cleared – or not – from the host, induces a general enhanced immunity to subsequent infections, thus protecting against a range of the same or different pathogens (see more details in Part 1 below).

The diversity of immune mechanisms mostly results from the unceasing evolutionary race between hosts and microbes (Danilova, 2006; Buchmann, 2014). Hosts constantly set up different defence mechanisms, while microbes deploy new infection strategies. The term "microbes" has long been associated with "pathogens" (Gest, 2004), but among the microbes that shape host immunity, most are commensal or beneficial (mutualistic symbionts) rather than harmful to the host (i.e., pathogenic symbionts; Bourtzis and Miller, 2008). By studying *Hydra* sp (cnidarian), a "basal metazoan" with rudimentary immunity, Bosch (2014) demonstrated that the immune system first evolved to control resident and beneficial microbes. Constant interactions with mutualistic symbionts also exerted strong selective pressures on the host's immune system, sometimes leading to obligatory interdependence (Bourtzis and Miller, 2008; Gilbert et al., 2012). For example, mice and tsetse fly require *Bacillus fragilis* and *Wigglesworthia*, respectively, without which the host's immune system fails to properly develop (see Part 2 below; Mazmanian et al., 2005; Weiss et al., 2011). Although mutualistic symbionts have a considerable impact on the evolution of host immunity (Part 2; Feldhaar and Gross, 2008; Gross et al., 2009), we lack knowledge about their influence in the expression of some immune processes such as the immune priming response that is "strictly" induced following the two pathogenic infections defined above.

In our literature review on the plasticity of the innate immune system in invertebrates, we observed that some mutualistic symbionts induce similar immune priming processes in their hosts such as when they face repeated infections with pathogens (see Part 3 below). Several studies have shown that these protective symbionts "prime" the host immune system that protects it against pathogens such as viruses, eukaryotic parasites, fungi, or bacteria (Part 3). We maintain that "immune priming" is a generic term, which also refers to the protection conferred by the protective symbiont against pathogens. In this case, immune priming is a persistent infection with beneficial microbes (symbionts or endosymbionts that remain in the host), which provide protection against pathogenic microbes (Part 3).

Several questions arise regarding the role of these protective symbionts in immune priming. Are the mechanisms of immune priming

Box 1
Glossary.

Adaptive immunity in jaw vertebrates: parasites/pathogens specific recognition performed by clonal expansion of antigen-specific lymphocytes (Murphy, 2011; Du Pasquier, 2006).

Commensalism: Facultative, temporary, or permanent relationship of different species, which is beneficial to the commensal organism and neutral (neither beneficial nor harmful) to the host.

Defensive symbiosis: Protection-mediated by symbionts (mutualist/beneficial symbionts in this case) for the hosts against its pathogens.

Holobiont: Supra-organism composed of several biological entities; a macroscopic host and its microscopic symbionts (bacteria, archaea, fungi, etc.), that interact in a synergistic and interdependent association (Bosch, 2008; Suarez et al., 2020).

Immune priming: Immune process where the host improves its immune defences following a first infection, that leads to a better protection upon second pathogenic exposure with same - or different - pathogens (Kurtz, 2005).

Immune resistance: active immune state of enhanced response to microbes' antigens.

Immune tolerance: active immune state of unresponsiveness to microbes' antigens.

Mutualistic symbiosis: Sustainable interspecific interaction in which the outcome of the cost-benefit balance improves the fitness in partners (both the host and the symbionts).

Parasitic symbiosis: Sustainable interspecific interaction in which the outcome of the cost-benefit balance improves the fitness of the pathogen/parasites and decreases the fitness of the host.

Pathogenic immune priming: Sustained immune response of the host that is induced by the first exposure with pathogens. This improves the survival abilities of the host against same - or different - pathogens upon the second infection event.

Specificity: degree of recognition/discrimination to which immune reactions differentiate antigens from different pathogens (definition of Kurtz, 2005).

Symbiosis: Sustainable interspecific interaction (meaning "living together") between a host and its symbionts, that could be commensal, mutualist, or parasitic.

Symbiotic immune priming: Sustained immune response of the host that is mostly induced by non-native (or experimentally injected) beneficial symbionts. This improves the survival abilities of the host against subsequent pathogenic infection.

induced by protective symbionts similar to those induced by pathogens? Are there interactions between the different kinds of immune priming inside the same host? And what are the evolutionary consequences of immune priming with pathogens, assuming that protective symbionts already "prime" the immune system? To our knowledge, few studies have explored immune priming responses against pathogens in the presence or absence of protective symbionts in invertebrates (Rodrigues et al., 2010; Braak et al., 2013; Contreras-Garduño et al., 2015; Futo et al., 2016; Prigot-Maurice et al., 2020).

In this literature review, we explore the extent to which protective symbionts can impact the immune priming against pathogens from both a mechanical (proximal) and evolutionary (ultimate) point of view. For this purpose, we divide this review into four parts. Firstly, we reconsider the biological and semantic meaning of immune priming against pathogens (Part 1). Secondly, we provide relevant examples about the importance of beneficial symbionts in shaping the immune system of invertebrate species (Part 2). Thirdly, we explore the concept of defensive symbiosis and the associated mechanisms of immune priming with protective symbionts (Part 3). Finally, we compare the immune priming mechanisms driven by protective symbionts or pathogens and discuss their potential interaction in the same host (Part 4). Due to the complex interactions when considering communities of beneficial symbionts (i.e., microbiota), this review mostly focuses on well-defined species of protective symbionts for which symbiosis processes are well developed. Since this subject is yet to be addressed in terms of immune priming, we contribute pertinent hypotheses to the three previous questions (Part 4). We observe the importance of including protective symbionts in research on invertebrate immune priming and suggest further avenues for investigation to improve our knowledge in this field.

2. Part 1. Invertebrate immune priming: What does it mean and what research tells us about this process?

2.1. Historical aspects of immune priming

Immune priming is an emergent research topic, which investigates how the innate immune system can also carry adaptive features (Netea et al., 2019). At the beginning of the 20th century, entomologists observed acquired resistance against pathogens (initially named "immunisation") in invertebrates, while they do not have the "adaptive immunity" observed in vertebrates (see Box 1 for definitions). According to Wagner (1961) who published one of the first review articles on "acquired immunity" in insects, several pioneering researchers "independently succeeded in protecting insects against infection by inoculating them with homologous – or heterologous – vaccines" (Paillot, 1920; Metalnikoff and Gaschen, 1921; Ishimori and Metalnikoff, 1924; Chorine, 1929). These initial attempts involved infecting individuals of various invertebrate species (e.g., *Galleria mellonella, Apis mellifera, Aporia crataegi, Pieris brassicae, Lithosa complana*) with attenuated pathogens and then monitoring their resistance after a second lethal infection with living pathogens. These demonstrations of "acquired immunity" showed an ability to survive the second infection in "immunised" individuals, with different degrees and durations of protection (Wagner, 1961). For example, Chorine (1931) reported that an oral challenge with heat-killed *Coccobacillus ellingeri* in *Ostrinia nubilalis* larvae 3 days before a lethal infection with the same bacterium decreased the mortality of "immunised" individuals by 24%. At that time, several researchers failed to prove this innate acquired resistance (Couvreur, 1923; Zernoff, 1934). Although these negative results were often due to methodological bias (e.g., injected dosage, route of infection, type of pathogens, virulence; Wagner, 1961), the immune response "acquired" by invertebrates received even less interest in the following years. This research axis was later revived by experiments on tissue graft rejection, which showed that invertebrate immunity could have specific recognition abilities (Cooper, 1969; Hildemann et al., 1977, 1979) . Thanks to the development of new immunological techniques, research over the past 30 years has demonstrated that this "acquired immunity", now known as "immune priming", has evolved in several invertebrate species (Milutinović and Kurtz, 2016; Lanz-Mendoza and Garduño, 2018).

2.2. Main features of immune priming in invertebrates

In general, immune priming is initially shown by better survival abilities after a second lethal infection in individuals previously primed with a non-lethal dose of pathogens (whether or not cleared from the host) compared to non-primed individuals (Table 1). This allows primed hosts to survive the second infection by up to 70% in some species (compared to non-primed hosts; Table 1) or to be protected for several months after the first immune challenge (Lafont et al., 2017). The first immune challenge occurs with different elicitors, with living or dead pathogens (heat-killed, formalin-inactivated, etc.) or with non-living microbial components (lipopolysaccharides, peptidoglycan, fungal cell wall, or anti-fungal components; Bergin et al., 2006; Kelly and Kavanagh, 2011; Chang et al., 2018). Immune priming has also been observed in response to abiotic factors such as temperature or physical stress (Wojda and Jakubowicz, 2007; Mowlds et al., 2008; Browne et al., 2014). When observing a large range of species, the resulting protection of immune priming (in the event of second pathogenic exposure) was found with some pathogens but not with others. Immune priming can be specific to the same pathogen strain encountered in the initial immune challenge (Schmid-Hempel, 2005; Pham et al., 2007; Roth et al., 2009; Wu et al., 2015a,b; Taszłow et al., 2017; Medina-Gomez et al., 2018), or conversely, it can give non-specific protection to the host against a wide range of pathogens (Faulhaber and Karp, 1991; Bergin et al., 2006; Eleftherianos et al., 2006; Wu et al., 2014; Meriggi et al., 2019). In addition, the strength of protection conferred by immune priming may be influenced by a range of different factors such as the age of individuals (Daukšte et al., 2012; Prigot-Maurice et al., 2020), their gender (Khan et al., 2016; Prigot-Maurice et al., 2020), the route of infection (e.g., digestive system, cuticles, or injection; Mondotte et al., 2018), the compound and dosage during the initial immune challenge, the type of pathogen (e.g., gram (+) or gram (−) bacteria, virus, parasitic nematodes), and many other factors (Tate and Rudolf, 2012; Tidbury et al., 2012; Best et al., 2013). Overall, immune priming is a highly variable process with few general trends. The only criterion used for classifying immune priming is the protection accorded for a subsequent infection, regardless of whether it is specific to the pathogen (Little and Kraaijeveld, 2004). This lack of clarity about immune priming stems from the many semantic debates since its discovery.

2.3. Etymological issues

"Immune priming" is a generic term used by researchers to encompass all situations in which invertebrates have enhanced immune responses, sometimes without understanding the precise mechanisms involved (see Part 1.4 below). The literature uses many other terms such as "innate immune memory" (Milutinović and Kurtz, 2016), "responsive mode prophylaxis" (Moret and Siva-Jothy, 2003), "tolerance" (Kurtz and Armitage, 2006), and "potentiation" (Boraschi and Italiani, 2018b). This phenomenon-based definition of immune priming mainly stems from a disagreement between its mechanistic and evolutionary point of views, where the term "adaptive" has a different meaning (Little and Kraaijeveld, 2004; Kurtz, 2005). From a mechanistic perspective, the adaptability of the immune system depends on the specific recognition and long-lasting recollection of the pathogen, known as "immune memory". This recognition is supported by specialised cells yet to be observed in invertebrates (Kurtz, 2005). The main semantic issue with the term "innate immune memory" is that not all invertebrate species have a specific immune response, while the duration of protection between pathogenic infections is sometimes too short to be considered as such (Klein, 1989; Brehélin and Roch, 2008; Milutinović and Kurtz,

Table 1
Examples of immune priming protection against pathogens (survival improvement) in invertebrates' species (non-exhaustive list).“First pathogenic exposure” is performed either with inactivated pathogens (formaldehyde, formalin, heat-killed, UV), bacterial elicitors (LPS, Poly:IC, spore-culture supernatant) or living pathogens (living low doses). “Second lethal exposure” is performed with living pathogens. “Time between infections” is the time between the first pathogenic exposure and the second lethal exposure. “Increase of survival” is the difference percentage survival between non-primed and primed individuals (i.e. survival improvement of primed individuals; graphically read on articles). “Time post lethal infection” is the last time where survival rates were measured (end of the experiment, or when non-primed controls were all dead).

Taxa	Host species	Pathogen	First pathogenic exposure	Second lethal exposure	Route of infection	Individual's state	Time between infections	Increase of survival	Time post letal injection	Reference
Cnidarian	*E. pallida*	*V. coralliilyticus*	Living (low exposition)	*V. coralliilyticus*	Balneation	Adult	2 weeks	30%	10 days	(Brown and Rodriguez-Lanetty, 2015)
							4 weeks	30%	10 days	
Coleopteran	*T. castaneum*	*S. aureus*	Formaldehyde	*S. aureus*	Thoracic pricking	Adult	20 days	25%	14 days	(Dhinaut et al., 2018)
		B.thuringiensis		*B.thuringiensis*			20 days	20%	14 days	
		E. coli		*E. coli*			20 days	15%	14 days	
	T. castaneum	*B.thuringiensis “bts"*	Spore-culture supernatant	*B.thuringiensis “bts"*	Oral exposure	Larvae	5 days	20%	8 days	Futo et al., 2016
		B.thuringiensis “btt"		*B.thuringiensis “btt"*			5 days	30%	8 days	
	T. castaneum	*B.thuringiensis “bt1"*	Heat killed	*B.thuringiensis “bt1"*	Thoracic pricking	Larvae	8 days	70%	17 days	Roth et al. (2009)
		B.thuringiensis “bt2"		*B.thuringiensis “bt2"*			8 days	35%	17 days	
		B. subtilis		*B. subtilis*			8 days	25%	17 days	
	T. molitor	*M. brunneum*	Living (low dose)	*M. brunneum*	Injection in haemolymph	Larvae	10 days	20%	45 days	(Contreras-Garduño et al., 2019)
	T. molitor	*B.thuringiensis*	Living (low dose)	*B.thuringiensis*	Injection in haemolymph	Larvae	10 days	30%	10 days	Medina Gomez et al., 2018
	T. molitor	LPS	LPS	*M. anisopliae*	Deeping	Larvae	4 days	25%	40 days	(Moret and Siva-Jothy, 2003)
							7 days	30%	40 days	
Mollusk	*C. gigas*	Poly:IC	Poly:IC	OsHV-1	Injection in haemolymph	Juvenil	10 days	100%	10 days	Lafont et al. (2020)
	C. gigas	Poly:IC	Poly:IC	OsHV-1	Injection in haemolymph	Juvenil	1 days	75%	10 days	Lafont et al. (2017)
							14 days	60%	10 days	
							28 days	60%	10 days	
							56 days	60%	10 days	
							126 days	20%	10 days	
Crustacean	*L. vannamei*	*V. alginolyticus*	Heat killed Formalin	*V. alginolyticus*	Injection in haemolymph	Adult	7 days	25%	7 days	(Lin et al., 2013)
							7 days	40%	7 days	
	A. vulgare	*S. enterica*	Living (low dose)	*S. enterica*	Injection in haemolymph	Adult	7 days	25%	7 days	(Prigot-Maurice et al., 2019)
Dipteria	*D. melanogaster*	DCV virus	UV (312 nm) 15 min	DCV virus	Injection in haemolymph	Larvae to adult	8 days	20%	12 days	Mondotte et al. (2018)
	D. melanogaster	*S. pneumoniae*	Heat killed	*S. pneumoniae*	Injection in haemolymph	Adult	1 days	20%	30 days	Pham et al. (2007)
							3 days	15%	30 days	
							7 days	10%	30 days	
							10 days	15%	30 days	
							14 days	20%	30 days	
	Ae. Aegypti	*E.coli*	Living (low dose)	*E.coli*	Injection in haemolymph	Larvae to adult	1 days	45%	20 days	(Moreno-García et al., 2015)
Lepidoptera	*P. plantaginis*	*S. marcescens*	Living (low dose)	*S. marcescens*	Oral exposure	Larvae	5 days	60%	5 days	(Mikonranta et al., 2014)
	G. mellonella	LPS	LPS	*P. luminescens TT01*	Injection in haemolymph	Larvae	2 days	70%	3 days	Wu et al. (2015)
	G. mellonella	*B. thuringiensis*	Living (low dose)	*B. thuringiensis*	Injection in haemolymph	Larvae	3 days	20%	1 days	Taszłow et al., 2017
	G. mellonella	*A. fumigatus*	Living (low dose)	*A. fumigatus*	Injection in haemolymph	Larvae	1 days	30%	3 days	Fallon et al. (2011)
Hymenoptera	*C. pennsylvanicus*	*S. marcescens*	Heat-killed	*S. marcescens*	Injection in haemolymph	Larvae	3 days	30%	8 days	(Rosengaus et al., 2013)
	B. terrestris	*P. alvei*	Living (low dose)	*P. alvei*	Injection in haemolymph	Adult	8 days	20%	7 days	Sadd and Schmid Hempel, 2006.
							22 days	30%	7 days	
		P. larvae		*P. larvae*			8 days	45%	7 days	
							22 days	50%	7 days	
		P. fluorescens		*P. fluorescens*			8 days	45%	7 days	
							22 days	20%	7 days	

2016). However, the issue regarding the specificity of immune priming is still being debated as in "primitive" invertebrates, and we can already observe specific humoral immune responses. For example, *Caenorhabditis elegans* produce specific kinds of antimicrobial peptides according to the pathogenic bacteria encountered, thus demonstrating an ancestral adaptability to pathogens from a basal lineage of invertebrates (Alper et al., 2007; Willis et al., 2020). Non-specific immune priming responses also constitute a primitive adaptability, which is probably advantageous in species exposed to several strains of pathogens during their lifetime.

Nevertheless, the phenomenological consequence of immune priming is similar: hosts are better protected against subsequent infections (Table 1). This resulting protection is adaptive in an evolutionary way, since invertebrates can adapt their immune responses following their past encounters with pathogens (Moret et al., 2019). From an evolutionary perspective, the adaptability of innate immunity is reinforced by the transfer of immune priming to the next generation (i.e., transgenerational immune priming; Roth et al., 2018). Progenitors exposed to a certain pathogen can transfer the immune protection against the same – or different – pathogens to their offspring, which never encountered the pathogen(s) (Moret, 2006; Dubuffet et al., 2015; Pigeault et al., 2016; Bernier et al., 2019; Ben-Ami et al., 2020). In the apomictic parthenogenetic *Artemia*, specific immune priming with *Vibrio campbellii* increases the resistance against the same strain of *Vibrio* in three successive generations (Norouzitallab et al., 2015). Immune priming may be transferred to offspring by epigenetic modifications or direct modifications of DNA sequences (Gegner et al., 2019). As long as acquired immune responses from past infections pass on to the next generation(s), immune priming is thus no longer a matter of acclimatisation provided that the genetic modifications become fixed in the populations.

As stated by Klein (1989), "to understand how invertebrates defend themselves from parasites, maintain the integrity of their bodies, and distinguish self from non-self, it might be best to forget what we have learned from vertebrates and start a fresh search, unbiased by preconceived ideas".

2.4. Mechanisms underlying immune priming against pathogens

To better understand the adaptive-like mechanisms that enable immune priming, many studies have explored immune priming by analysing the immune responses of hosts following the first and/or second infection (Little and Kraaijeveld, 2004; Melillo et al., 2018; Gourbal et al., 2018; Lanz-Mendoza and Garduño, 2018; Moret et al., 2019). Currently, three main mechanisms have been demonstrated for invertebrate species: (1) recalled immune response, (2) immune shift, and (3) sustained immune response (Fig. 1; Coustau et al., 2016; Moret et al., 2019). We summarised these mechanisms with relevant examples in Fig. 1. "Recalled response" assumes that the immune system specifically remembers the pathogen from the first infection and responds more effectively with the same immune effector during the second infection (Contreras-Garduño et al., 2015; Serrato-Salas et al., 2018). This implies a specific recognition with a biphasic immune response that returns to basal levels (i.e., extinction of the immune response) between successive infections. "Immune shift" involves a switch from one immune effector during the first infection towards another during the second pathogen exposure (Pinaud et al., 2016; Greenwood et al., 2017). In this case, the host adapts its defence using a different – and probably more efficient – immune effector. "Sustained immune response" is a long-lasting expression of the first immune response, which lasts until the second infection event. This protects the host against pathogens using enhanced immune responses that are already established in the host of the lethal infection event (Mikonranta et al., 2014; Lafont et al., 2020; Prigot-Maurice et al., 2020). Because the sustained immune response is the main mechanism observed with both protective symbionts and pathogens (see Part 4 below), we refer to this mechanism as "pathogenic immune priming" in the following sections. Each mechanism used to

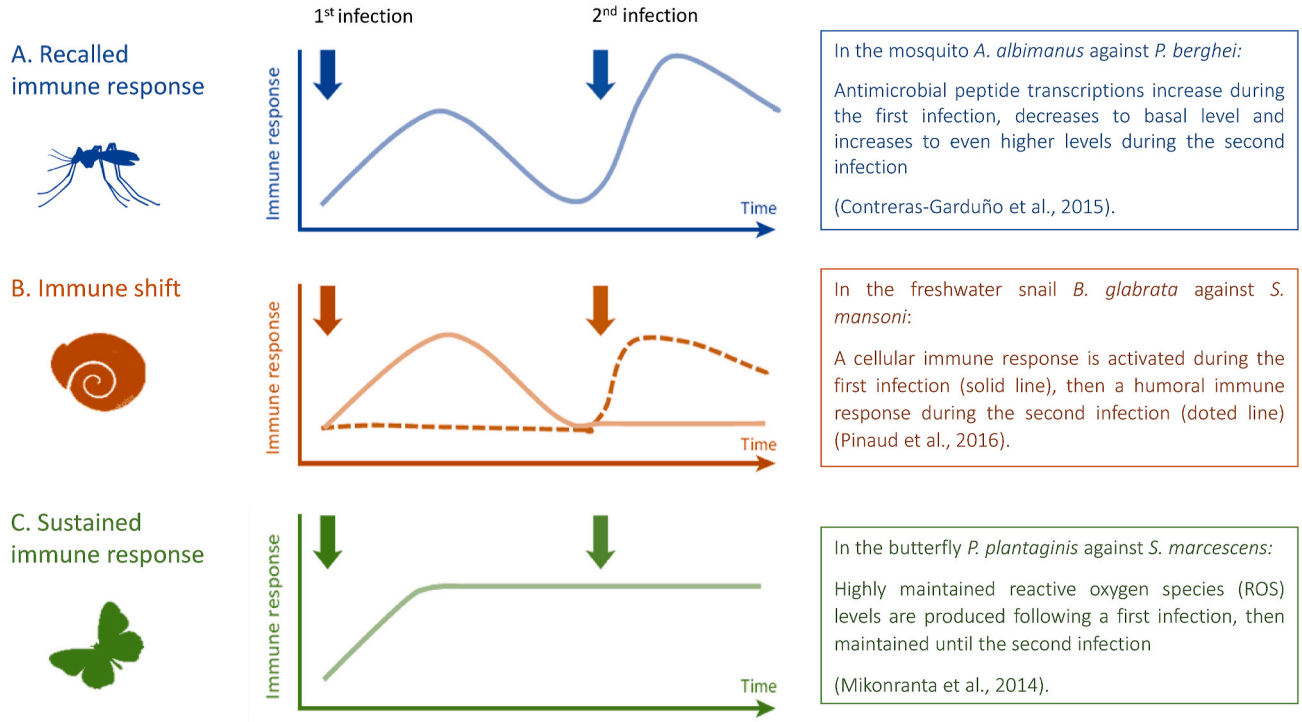


Fig. 1. Mechanisms and related examples of immune priming with pathogens in invertebrates' species.
A) Recalled immune response implies biphasic immune response that involves the same immune effectors, with return to basal levels between the first and the second infection (illustrated by bold arrows). B) Immune shift is a switch from one immune effector in the first infection, toward another immune effector in the second infection event. C) Sustained immune response is a long-lasting immune response, which lasts until the second infection with the same immune effector. Each immune priming mechanism enhances the protection of hosts against the second pathogenic/parasitic exposure. Diagram adapted from Coustau et al. (2016).

mount an immune priming response may depend on the degree of co-evolution with pathogens and the evolutionary costs and benefits to express them (Moret et al., 2019; Gourbal et al., 2018). These mechanisms are probably not mutually exclusive but may all be expressed (and interact) inside the same host. The specificity of immune priming may also be provided by any of these mechanisms that rely on a large variety of invertebrate immune components, ranging from enhanced phagocytosis to the adapted production of antimicrobial compounds (Roth and Kurtz, 2009; Contreras-Garduño et al., 2015; Melillo et al., 2018). Because invertebrate haemocytes recognise intruders and generate most of the immune responses, the production of a subset of these innate immune cells is expected to be the main support of immune priming (Gourbal et al., 2018; Melillo et al., 2018). Following the initial pathogenic exposure, hosts can activate or generate a competent subpopulation of haemocytes with improved abilities, that protect against the second exposure (Pham et al., 2007; Roth and Kurtz, 2009; Rodrigues et al., 2010; Pope et al., 2011; Wu et al., 2015a,b; Yi et al., 2019).

As stated previously, immune priming may be effective against a variety of pathogens or only against the pathogen encountered during the primary infection. However, given the lack of diversity of receptors discriminating the various pathogens, as in the case of jaw vertebrates, how can the second immune response be specific to the previously encountered pathogens? Some research has provided potential answers (Tetreau et al., 2017). Invertebrates recognise microbe-associated molecular patterns (MAMPs) thanks to germline-encoded pattern recognition receptors (PRRs; Rolff and Reynolds, 2009). Among PRRs, toll-like receptors (TLRs) can form hundreds of gene variants in sea urchins (Rast et al., 2006; Sodergren et al., 2006; Hibino et al., 2006), thus raising the possibility that surface molecules of innate cells may be variable. Recently, researchers discovered other probable candidates of hypervariable proteins that can generate a high diversity of protein isoforms (Watson et al., 2005; Yu et al., 2009; Cerenius and Söderhäll, 2013; Armitage et al., 2015). Named down syndrome cell adhesion molecules (Dscam) and fibrinogen-related proteins (FREPS), these cell surface proteins and soluble carbohydrate proteins, respectively, are related members of the immunoglobulin superfamily (Zhang and Loker, 2003; Hanington and Zhang, 2011; Ng et al., 2014, 2015; Armitage et al., 2015; Fugmann, 2018; Ng and Kurtz, 2020). Initially observed in *D. melanogaster* and *B. glabrata* (Leonard et al., 2001; Yu et al., 2009), Dscam and FREPS are also found in several species of insects and crustaceans (Crayton et al., 2006; Dong et al., 2006; Brites et al., 2008; Chou et al., 2009). Their isoforms are released by haemocytes and bind differently to various bacteria, fungi, and even parasitic trematodes in a single individual (Adema et al., 1997; Watson et al., 2005; Dong et al., 2006; Mone et al., 2010). As in vertebrates, the production of different isoforms is achieved by genetic alternative splicing, exon skipping, and gene conversions in some FREP families (Zhang and Loker, 2003; Beckage, 2008). Today, it is well known that Dscam and FREPS are involved in immune responses and probably in immune priming (Hanington and Zhang, 2011; Zhang et al., 2020). For example, Dscam levels are upregulated following an infection with the white spot syndrome virus in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Chiang et al., 2013). Silencing Dscam expression prior to this pathogenic exposure results in a higher mortality in infected shrimps (Fu et al., 2016). In the snail *Biomphalaria glabrata*, three FREP genes are specifically expressed with the injection of lipopolysaccharides or gram (+) bacteria (Adema et al., 2010). Schistosome-resistant *B. glabrata* overexpress a specific FREP family after exposure to *Schistosoma mansoni* compared to non-resistant snails (Hertel et al., 2005). Other candidates for diversified innate immune receptors have been described such as SpTransformer in *Strongylocentrotus purpuratus*, the variable region containing chitin-binding proteins (VCBPs) in *Cinoa intestinalis* (Dishaw et al., 2011), secondary viral small-interfering RNA (vsRNAs) in *D. melanogaster* (Tassetto et al., 2017), NLR genes in *Amphimedon queenslandica* (Degnan, 2015), or cytokine-like molecules (Litman et al., 2007; DeFilippo and Beck, 2018; Fugmann, 2018 for a review). These observations suggest that several molecular components could support a specific immune priming response in invertebrates. Encouraging results were notably observed in the mud crab *Scylla paramamosain*, where the TLR pathway is the main signalling pathway in individuals primed with heat-killed *V. parahaemolyticus* (Zhang et al., 2020)(). Further investigations of causal links are nevertheless needed to confirm whether these proteins allow invertebrates to discriminate and remember pathogens of past infections as adaptive immune receptors (Armitage et al., 2015). To quote Schmid-Hempel in 2005, the current observations of immune priming confirm that "insect immune defense is much more similar to that of vertebrates than previously thought".

In Part 1, we showed that immune priming has mainly been studied with pathogens by considering the immune system as the only actor responsible for the emergence and evolution of this innate immune ability. Numerous studies have nevertheless shown that mutualistic associations with non-harmful microbes can shape host immune functions, thus challenging our view of the exclusive role played by host immunity in protecting against pathogens.

3. Part 2. Beneficial symbionts: A major evolutionary force of the innate immune system in invertebrates

3.1. Historical aspects of symbiosis and definition

In the living world, no organism is isolated from microbes. At the time of their discovery in the 1660s, most biologists believed that all microbes were pathogenic, because they were mostly associated with infectious diseases (Gest, 2004). In the 1870s, pioneers like Frank, Van Beneden, and De Bary observed that microbes and hosts could interact without negatively impacting either one (Frank, 1877; De Bary, 1879). Following these observations, the term "symbiosis" was introduced to denote the harmonious relationship between two or more species (Perru, 2010). However, subsequent research on host-microbial interactions showed the difficulty in identifying the boundaries between symbiotic and pathogenic effects in hosts, thus highlighting the need to further refine the definition of symbiosis (Brown et al., 2012). For example, *Ilyanassa obsoleta* snails infected with the parasitic trematode *Zoogonus lasius* have heavier shells compared to non-infected snails (Cheng et al., 1983). Although this morphological modification protects snails against predators and environmental threats (Cheng et al., 1983), harbouring this parasitic trematode also decreases their reproductive efficiency (Sullivan et al., 1985), which limits the distinction between pathogenic and symbiotic effects in this host-microbial interaction. "Symbiosis" is currently defined as a continuum of interactions ranging from reciprocal and beneficial associations, known as "mutualistic symbiosis", to non-reciprocal and harmful interactions between hosts and pathogens, termed "parasitic or pathogenic symbiosis" (Box 1; Bourtzis and Miller, 2008; Sachs et al., 2011; Brown et al., 2012). Thus, symbiosis encompasses a range of different interactions (including commensalism*) between two species (one-to-one micro-organisms, macro-organisms, or one micro-organism and one macro-organism) or between several different species as in the case of bacterial communities (i.e., microbiota; Bourtzis and Miller, 2008). Here, we decided to develop the following parts in light of one-to-one mutualistic relationships for which the mechanisms of symbiosis and evolutionary pathways have already been identified and explained.

Symbiosis has revolutionised our understanding of immunity, since the key component that allows these close interactions between hosts and microbes is the host immune system (Eguileor and Ottaviani, 2011; Nyholm and Graf 2012). Due to its importance in maintaining the integrity of organisms, the immune system has long been studied with respect to pathogens. All the data collected over several hundred years demontrate that the immune system has mostly evolved as a strong defender of the host (Janeway, 1992; Read et al., 2008). While the immune system efficiently eliminates pathogens, it also tolerates countless beneficial symbionts, more numerous than the host's own cells (Cooper,

2012; Ciancio, 2016). However, if the immune system can only combat microbes, why do long-lasting and beneficial associations exist between hosts and symbionts in nature? Several studies highlighted that beneficial symbiosis results from millions of years of co-evolution between hosts and symbionts (estimated between 30 and 250 million years by Baumann, 2005; Ciancio, 2016). In these associations, beneficial symbionts evolved to be tolerated by hosts, and hosts evolved to tolerate beneficial symbionts through strong selective pressures exerted on their immune system.

3.2. Strategies of beneficial symbionts persist in hosts

Symbionts generally need hosts to persist and reproduce, as hosts constitute their ecological niches in contrast to other free-living microbes (Haine, 2008). Two major types of beneficial symbionts are described according to their dependence on the host: obligate or facultative (Moran, 2006). With obligate symbionts, neither the symbiont nor the host can live or complete its lifecycle without its partner (Nguyen and van Baalen, 2020; Moran, 2006). Symbiosis with the obligate symbiont mostly depends on the partner's interdependency for nutrition and results from the long co-evolution of species (Sachs et al., 2011; Nguyen and van Baalen, 2020; Ratzka et al., 2012). By contrast, facultative symbionts often develop from less ancient associations with hosts. Hosts can live without facultative symbionts, although their presence often provides additional benefits to hosts (Oliver et al., 2014; Nguyen and van Baalen, 2020; Kucuk, 2020). For example, gut symbionts, which are mainly extracellular and environmentally transmitted, play a role in nutrition and pathogen defence (Ponton et al., 2013). Facultative symbionts such as *Wolbachia* may also manipulate host reproduction (Werren et al., 2008). Obligatory and facultative symbionts can have intracellular (i.e., endosymbionts) and extracellular lifestyles, with a vertical transmission through host lineages and a horizontal transmission in the environment (Haine, 2008; Nguyen and van Baalen, 2020; Kucuk, 2020). The majority of endosymbionts (obligate or facultative) cannot live outside the host tissue (Pérez-Brocal et al., 2013). This lifestyle can even lead to the loss of certain genes in several endosymbiont species, which rely exclusively on host cells to perform their vital functions (Maniloff, 1996; Wernegreen, 2002; Akman et al., 2002; Degnan et al., 2009; Fisher et al., 2017). Adaptation to host niches was shown in the difficulty to culture symbionts in bacterial media, where the environmental conditions (lack of host cells and interactions with other microbes) are poorly suited to their growth (Baumann and Moran, 1997; Moran, 2006). Conversely, non-endosymbionts (found in cuticle or gut tissues, for example) can live in the external environment but are sometimes required by hosts (Pérez-Brocal et al., 2013). These different types of symbionts may have different interactions with the host, notably with the immune system.

Living inside a host implies that symbionts must set up diverse strategies to persist in the host without being eliminated by the immune system. Symbionts thus employ two main approaches: evading host immunosurveillance or manipulating the host immune response (Haine, 2008). Avoiding recognition by the immune system is firstly achieved by living inside the host's cells, where fewer antimicrobial components are produced (Eleftherianos et al., 2013). Gram (−) bacteria such as *Sodalis glossinidius* (endosymbiont) and *Hamiltonella defensa* (having endosymbiotic and non-endosymbiotic state) may invade the host cells through different secretion systems (Hueck, 1998; Dale et al., 2002; Degnan et al., 2009; Chevignon et al., 2018). Another strategy used by symbionts is to modify, lose, or hide their antigen surface molecules, which normally trigger the host immune response (Feldhaar and Gross, 2008; Haine, 2008). The mutualistic endosymbiont *S. glossinidius* has a truncated lipopolysaccharide structure that limits its detection and reduces the immune response of its host, *Glossina* tsetse fly (Hao et al., 2001; Toh et al., 2006; Weiss et al., 2008; Trappeniers et al., 2019). Several authors suggest that mutualistic symbionts promote host tolerance by actively interfering with the immune response (Detournay et al., 2012; Jacobovitz et al., 2021; Kremer et al., 2012; Ratzka et al., 2012) . Common mutualistic symbionts downregulate the immune-related genes of their cnidarian hosts, thus reducing the immune responses and enabling their colonisation. By contrast, non-common mutualistic symbionts from the same *Symbiodiniaceae* family upregulate the immunity of cnidarians, thus preventing the establishment of symbiosis (Mansfield and Gilmore, 2019). Mutualistic symbionts are also less susceptible to some antimicrobial peptides produced by hosts (Hao et al., 2001; Eleftherianos et al., 2013; Onchuru and Kaltenpoth, 2019), thus evolving towards an enhanced resistance of beneficial symbionts that face the host immune response.

Both beneficial symbionts and pathogens use these processes to persist in their host (Finlay and McFadden, 2006; Degnan et al., 2009). Even though most microbes encountered during the host's lifecycle are not pathogenic, Paillot stated in 1933 that "symbiosis could have initially been a bacterial, pathogenic infection; but the slow adaptation of these bacteria to hosts had gradually decrease their virulence, until they become completely harmless to the host" (Paillot, 1933; Dale et al., 2002, 2005; Degnan et al., 2009). Unlike pathogens, which cause damage to the host, mutualistic symbionts provide significant benefits, thus facilitating the emergence of mutualistic symbioses (Moran, 2006). Beneficial symbionts are involved in several physiological functions of their hosts such as metabolism (Zientz et al., 2004), nutrition (Douglas, 2009; Rio et al., 2016; Bredon et al., 2019), reproduction (Dedeine et al., 2001), nest hygiene (Currie et al., 1999; Kaltenpoth et al., 2005), thermal tolerance (Dunbar et al., 2007; Quigley et al., 2021), and many others (Feldhaar, 2011; Clay, 2014; Oliver et al., 2014; Kucuk, 2020). These enhanced capacities for the host, which are provided exclusively by beneficial symbionts, directly or indirectly improve the host's fitness in terms of diet, reproduction, body maintenance, and colonisation of novel ecological niches (Feldhaar, 2011; Clay, 2014; Kucuk, 2020). Given the benefits of harbouring beneficial symbionts, the host immune system has also strongly evolved in maintaining these symbionts.

3.3. Immune system tolerance to maintain beneficial symbionts

As stated previously, the innate immune system of invertebrates discriminates self and non-self elements using cell receptors (PRRs), which can recognise the surface antigens (MAMPs) of microbes (Feldhaar and Gross, 2008; Rolff and Reynolds, 2009). Because MAMPs are present in both pathogens and mutualistic symbionts, researchers stress how the immune system can discriminate between "good" and "bad" microbes (Ratzka et al., 2012). Although the mechanisms supporting the maintenance of mutualistic symbionts and the removal of pathogens are still poorly understood (Nyholm and Graf, 2012), several experiments have put forward pertinent hypotheses.

One of the intrinsic factors allowing hosts to perform such immune adaptations is the detection of cellular damage. Pathogens cause diverse harmful effects to the host, triggering inflammatory responses via endogenous molecules released by dying cells or damage-associated molecular patterns (DAMPs). Beneficial symbionts are expected to induce less production of DAMPs (Nyholm and Graf, 2012), thus allowing the host to generate tolerance* instead of resistance* through a damage threshold (Moreno-García et al., 2014 for review; Palmer, 2018). Bosch et al. (2009) highlighted that *Hydra* spp, an ancient lineage of multicellular organisms, distinguishes mutualistic symbionts from pathogens using MAMP and DAMP signals to mount an appropriate immune response. Another recent explanation concerning the recognition of beneficial symbionts relates to the "innate immune memory" of invertebrates (see Part 1 above). If invertebrates can specifically recognise pathogens in subsequent infections, they might be able to distinguish mutualistic symbionts from pathogens (Nyholm and Graf, 2012). Nyholm et al. (2009) demonstrated that *E. scolopes* haemocytes specifically change their phagocytic abilities according to the presence of its environmentally transmitted mutualistic symbiont *V. fisheri.* This specificity is mediated by the binding system of haemocytes, suggesting

that the innate immune cells of *E. scolopes* are educated by *V. fisheri*. Because invertebrates can generate various Dscam isoforms implied in the specific binding abilities of microbes (Watthanasurorot et al., 2011; Hung et al., 2013, see Part 1), Dscam could also play a role in this recognition. Few studies have raised this question, but silencing Dscam in *Laodelphax striatellus* reduces both rice stripe virus and *Wolbachia* titres in hosts without changing the titre of its extracellular symbiont *Acinetobacter rhizosphaerae* (Zhang et al., 2016). Since symbiotic bacteria are expected to avoid immune detection by the host, this speculation remains in its infancy. Indeed, even mitochondria, which have co-evolved with their host cells for around 1.4 billion of years, still induce an immune response (Rongvaux, 2018). We thus strongly believe that mutualistic symbionts cannot completely escape the immune surveillance of their hosts.

In accordance, the host can regulate its immune effectors against different types of microbes (Nyholm and Graf, 2012; Ratzka et al., 2012). For example, some invertebrates produce specific immunoproteins such as peptidoglycan recognition protein (PGRP), which degrades the peptidoglycan antigens of gram (−) bacteria, thus removing the bacterial elicitor and downregulating the immune response (Kim et al., 2003). In tsetse flies, PGRP expression is induced at the specific location of the endosymbiont *Wigglesworthia*, which prevents damage caused by the immune response (Wang et al., 2009; Wang and Aksoy, 2012). Similar downregulation patterns were observed in weevils, fruit flies, and mosquitoes. In these species, the expression of PGRP and its down regulator (PIMS) limit the production of antimicrobial peptides against mutualistic symbionts (Anselme et al., 2006; Zaidman-Rémy et al., 2006; Bischoff et al., 2006; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008; Pan et al., 2018). Hence, hosts can form immune tolerance to beneficial microbes by detecting their surface molecules and their non-harmful behaviour (Nyholm and Graf, 2012). As stated by Loker et al. (2004) "the presence of specific, selective, and well-managed bacterial populations living within invertebrates suggests the presence of sophisticated recognition systems that go well beyond the capabilities of PRRs".

The immune system of invertebrates has evolved not only to adapt its response to beneficial symbionts but also to control and actively limit the symbiont populations (Reynolds and Rolff, 2008). One way to keep beneficial symbionts under control is to harbour them in cell compartments or tissues (Hinde, 1971; Reynolds and Rolff, 2008). In some cases, hosts evolved with specialised organs to harbour mutualistic symbionts such as bacteriocytes (Reynolds and Rolff, 2008; Heddi and Zaidman-Rémy, 2018; Baumann et al., 2000). This adaptation of hosts in response to mutualistic symbionts was observed in several species such as ants, cockroaches, and aphids (Douglas, 1989; Moran and Telang, 1998). In *Sitophilus oryzae*, an analysis of the gene expression of bacteriocytes showed that hosts controlled mutualistic endosymbiont *Sodalis pierantonius* populations with specific antimicrobial peptides (Login et al., 2011; Heddi and Zaidman-Rémy, 2018), which favour symbiosis homeostasis. By studying the development of bacteriocytes in *Acyrthosiphon pisum* aphid harbouring *Buchnera aphidicola*, Braendle et al. (2003) showed that aphids expressed specific hox genes, which differentiated cell subpopulations into bacteriocytes before the transmission of *Buchnera*. Mimicking the loss of *Buchnera* led to the regression of bacteriocytes (Braendle et al., 2003). These findings suggest that these host cells underwent extensive molecular adaptations towards mutualistic endosymbionts. Nevertheless, this adaptation probably required the long co-evolution of hosts and beneficial symbionts. Note, however, that the mutual benefits for hosts and symbionts are not always fully aligned, as slight boundaries between beneficial and pathogenic symbiosis can rapidly lead to the harmful exploitation of each partner, if the symbiosis has not been co-evolving for a long time (e.g., Sicard et al., 2004; Chapuis et al., 2009; Pérez-Brocal et al., 2013). Hox genes were also described in the development of bacteriocytes in the seed bug *Nysius plebeius* (Matsuura et al., 2015), although the symbiosis is quite recent compared to that observed in aphids. This cellular adaptation to tolerate and control beneficial symbionts may thus appear relatively quickly at the scale of symbiogenesis. In all these examples, it is impossible to determine whether hosts or symbionts initiated the mutualistic symbiosis. Many researchers assume that both partners are involved following the loss of virulence in symbionts (Nyholm et al., 2009).

3.4. Mutualistic symbiosis: interdependency in light of the holobiont level

In the context of mutualistic symbiosis, Bourtzis and Miller (2008) stated that "these tolerances can rapidly lead to interdependencies when these adaptations become fixed in the population". The most striking example relates to mitochondria: no eukaryotic cells can live without this organelle (except for erythrocytes and *Monocercomonoides* that lose mitochondria; Karnkowska et al., 2016; Zhang et al., 2016), despite their symbiotic origin between archaeal-derived cells and bacteria (Rongvaux, 2018). Douglas (1989) estimated that around 10% of insect species need endosymbionts to provide limited nutrients (Moran and Telang, 1998). A lack of endosymbionts compromises the development and vital functions of the host, thus weakening the immune system. The tsetse fly *Glossina* provides an example of the profound involvement of symbionts in host immunity. The development of a viable immune system is achieved by the presence of the obligatory mutualistic endosymbiont *Wigglesworthia* (Weiss et al., 2012). This maternally transmitted symbiont triggers its host during development to generate an odorant-binding protein responsible for the production of a certain subset of haemocytes (Benoit et al., 2017). Without *Wigglesworthia*, the immune system of *Glossina* is compromised (with a 99% reduction in circulating haemocytes compared to symbiotic individuals), leading to a higher susceptibility to non-pathogenic bacteria in aposymbiotic individuals. This phenotype is reversible when *Wigglesworthia* is reimplanted in hosts (Weiss et al., 2011, 2012).

Beneficial symbionts are ultimately the driving force in the evolution of hosts and their immune system. Thus, immune functions are not only intrinsic to hosts but are also induced and modulated by mutualistic symbionts. As mutualistic symbionts develop such close relationships with their hosts, they can be considered an integral part of the same biological unit (i.e., holobiont), a functional entity composed of different species (Pradeu, 2010, 2012; Gilbert et al., 2012; Ronai et al., 2020). From these inextricable associations also emerged the concept of co-immunity, referring to the cooperation between the host and resident microbes in immune responses (Chiu et al., 2017, McLaren and Callahan, 2020). Hosts protect beneficial symbionts, while symbionts also protect their hosts to ensure the good functioning and integrity of the "super-organism", notably against pathogens (Feldhaar, 2011; Bordenstein and Theis, 2015).

4. Part 3. Mediated protection of beneficial (or protective) symbionts

4.1. Emergence of defensive symbiosis

As pathogens decrease the reproduction and survival abilities of hosts, they negatively impact the beneficial symbionts that they harbour. Mutualistic symbionts, especially when maternally transmitted (because the host needs time to reproduce for the symbiont to be transmitted), develop different strategies to defend their host against pathogens and favour their own transmission (Hurst and Hutchence, 2010). In this respect, researchers predict that hosts are selected to maintain protective symbionts that extend their immune abilities and reduce their energetic costs in immune responses against pathogens (McLaren and Callahan, 2020). For instance, pea aphid populations exposed to parasitoid wasps show a higher frequency of protective symbionts *Hamiltonella defensa*, which decrease without parasitoids (Oliver et al., 2008; Clay, 2014). Interestingly, for an invertebrate species, pea aphids have a reduced immune system in terms of both immune-related genes and products (Gerardo et al., 2010). This loss of immune function may have been driven by protective endosymbionts

(*Regiella insecticola* and *Hamiltonella defensa*), which protect aphids against pathogenic fungus and parasitoid wasps (Oliver et al., 2003; Scarborough, 2005; Lukasik et al., 2013).

Some protective symbionts can be viewed as real assistants to the immune system in a phenomenon known as "defensive symbiosis" (Eleftherianos et al., 2013; Hamilton and Perlman 2013; Clay, 2014; Oliver et al., 2014; Vorburger and Perlman, 2018). Defensive symbiosis, in which the protection of the host is partly or totally ensured by protective symbionts or endosymbionts, has been observed in a range of invertebrate species when comparing the ability of symbiotic and asymbiotic hosts to overcome pathogenic infections (with fungi, viruses, bacteria, or eukaryotic parasites; Oliver and Moran, 2009). If a symbiont-mediated defence is established, symbiotic hosts show better resistance to pathogens in terms of survival improvement, enhanced immune response, and pathogen clearance (Gerardo and Parker, 2014). Protective symbionts may thus influence the host populations and communities by increasing the host abundance in the presence of pathogens or parasitoids (Oliver et al., 2008; Sanders et al., 2016). In *A. pisum*, for example, the introduction of the defensive form of *H. defensa* increases the population growth rate compared to the non-defensive form (Sanders et al., 2016).

Even though endosymbionts represent a tiny fraction of beneficial symbionts across invertebrate species, defensive symbiosis also occurs with facultative and obligatory symbionts with an intracellular or extracellular lifestyle (Ballinger and Perlman, 2019; Hamilton and Perlman 2013). The strain of protective symbionts could differently promote protection against pathogens (Koch and Schmid-Hempel, 2012; Ye et al., 2013; Chrostek et al., 2013). This symbiont-mediated protection is achieved by the direct interaction between protective symbionts and pathogens and/or the stimulation (through the presence of symbionts) of the host immune response against pathogens (Clay, 2014; Eppler et al., 2020; McLaren and Callahan, 2020).

4.2. Microbiological war enabling host protection

Inside a host, microbes (symbionts or pathogens) that share the same ecological niche compete for nutritional and space resources (Gerardo and Parker, 2014), using many competitive mechanisms to interfere

Table 2
Examples of defensive symbiosis against pathogens (survival improvement) induced by protective symbionts (non-exhaustive list)."Experimentally native" is a protective symbiont that was added in the host since several generations in laboratory lineages. In this case, the defensive symbiosis was tested by removing the symbionts with antibiotic treatments. "Non-native symbionts" were injected in the host – or not – during the experiment. "Native" is a symbiont naturally harboured in the host (sampled in nature). "Route of infection" is the same for both symbionts and pathogens. "Increase of survival" is the difference in percentage survival between non-primed and primed individuals (i.e survival improvement of primed individuals; graphically read on articles). "Time post lethal infection" is the last time where survival rates were measured (end of the experiment, or when asymbiotic controls were all dead).

Host Taxa	Host species	Protective symbiont	Symbiont's state	Pathogen	Route of infection	Increase of survival	Time post letal injection	Reference
Crustacean	*A. vulgare*	*Wolbachia wVulC*	Native	*S. enterica typhimurium*	Injection in haemolymph	50–80%	7 days	Braquart-Varnier et al. (2015)
				L. ivanovii		50–75%	7 days	
	P. dilatatus	*Wolbachia wDil*	Native	*S. enterica typhimurium*		20%	7 days	
Dipterian	*A. aegypti*	*Wolbachia wMel*	Experimentally native	*E. carotovora*	Pricking or injection	25%	8 days	Ye et al. (2013)
				S. enterica typhimurium		20%	2 days	
		Wolbachia wMelPop	Non-native, injected (or not)	*E. carotovora*		50%	7 days	
				B. cepacia		20%	6 days	
				S. enterica typhimurium		30%	3 days	
				M. marinum		40%	12 days	
	D. melanogaster	*Wolbachia wMelCS-like*	Experimentally native (removed with antibiotics treatments)	DCV (RNA virus)	Thoracic pricking	50%	10 days	Faria et al. (2018)
	D. melanogaster	*Wolbachia*	Experimentaly native (removed with antibiotics treatments)	DCV (RNA virus)	Injection in haemolymph	60%	15 days	Teixeira et al. (2008)
				Flock House virus (RNA virus)		70%	15 days	
				Iridovirus 6 (DNA virus)		−20%	40 days	
	A. aegypti	*Wolbachia*	Experimentaly native (removed with antibiotics treatments)	*E. cloacae*	Pricking	20%	15 days	Pan et al. (2018)
				M. luteus		25%	15 days	
				B. bassiana		20%	10 days	
	D. melanogaster	*Wolbachia wMelCS*	Experimentaly native (removed with antibiotics treatments)	DCV(RNA virus)	Injection in haemolymph	40%	8 days	Hedges et al. (2008)
		Wolbachia wMelPop		DCV (RNA virus)		70%	8 days	
				CrPV (Cricket paralysis virus)		80%	8 days	
				FHV (Flock House virus)		100%	8 days	
	A. aegypti	*Wolbachia wMelPop*	Experimentaly native (removed with antibiotics treatments)	*E. carotovora*	Thoracic pricking	70%	4 days	Kambris et al. (2009)
	A. aegypti	*Wolbachia wAlbB*	Experimentaly native (removed with antibiotics treatments)	DENV (virus)	Oral exposure	10%	26 days	Bian et al. (2010)
Heteroptera	*R. pedestris*	*Burkholderia*	Non-native, injected (or not)	*E. coli*	Injection in haemolymph	30%	12 days	Kim et al. (2015)
				S. aureus		40%	12 days	
Hemipteria	*A. pisum*	*R.insecticola*	Non-native, injected (or not)	Pandora (Erynia) neoaphidis	Injection in haemolymph	20–50%	8 days	Scarborough, 2005
	A. mellifera	*S. alvi*	Non-native; injected (or not)	*S. marcenscens*	Oral exposure	45%	10 days	Horak et al. (2020)

with each other (McLaren and Callahan, 2020; Gerardo and Parker, 2014). As stated by Oliver and Perlman (2020), the most common mechanisms employed by protective symbionts relate to the production of antimicrobial compounds to harm and/or inhibit their microbial competitors (Fenical et al., 1992; Kaltenpoth et al., 2005; Van Arnam et al., 2018; Palmer-Young et al., 2019; Eppler et al., 2020; Figueiredo and Kramer, 2020; Oliver and Perlman, 2020). If the competing microbes are pathogens for the host, the production of these compounds decreases the pathogen load in hosts, which gain resistance. For example, *Streptomyces* extracellular symbionts isolated from pollen stores of the honeybee *Apis Mellifera* produce antimicrobial compounds that inhibit the growth of the honeybee's pathogen *Paenibacillus larvae* (Grubbs et al., 2021). Symbionts can exploit other physiological components of hosts to interfere with competitors (Gerardo and Parker, 2014). For example, the endosymbiont *Wolbachia* may interfere with the cholesterol production of host cells and thus limit the development of the RNA virus, which requires the same intracellular component as *Wolbachia* for its replication (Caragata et al., 2013; Geoghegan et al., 2017; Pimentel et al., 2021).

In these cases, the protection mediated by beneficial symbionts relies exclusively on microbiological competition (Figueiredo and Kramer, 2020), with no – or little – involvement from the host immune responses.

4.3. Immune priming by protective symbionts

Protective symbionts are also capable of conferring protection (i.e., survival improvement) in hosts by sustainably activating their immune response (Table 2). In the honeybee *Apis mellifera*, the presence of living or heat-killed *Snodgrassella alvi* gut symbionts enhances the production of the host antimicrobial peptides. This response increases the clearance of *S. marcescens* and improves the host survival rate with this pathogenic bacterium (Table 2; Horak et al., 2020). Similar results were observed with *Burkholderia* gut symbiont and *Riptortus pedestris* host (Kim et al., 2015), although the main examples of this improved survival mediated by a symbiont occur with the endosymbiont *Wolbachia* (Table 2; Pimentel et al., 2021). In *Drosophila* and mosquitoes, *Wolbachia* upregulates the immune-related genes of hosts, thus conferring protection against various viruses, bacteria, and eukaryotic parasites (Kambris et al., 2009; Moreira et al., 2009; Hughes et al., 2011; Pan et al., 2012; Pinto et al., 2012; Rancès et al., 2012; Ye et al., 2013). One of the resulting immune responses involves the production of reactive oxygen species, which interfere directly with virus replications (Pan et al., 2012). Clearing *Wolbachia* from hosts with antibiotics significantly reduces the resistance of *Drosophila* against RNA viruses, thus confirming that this bacterium is the main trigger of host protection (Table 2; Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Extensive studies showed that *Wolbachia* stimulates the immune-gene transcription in the mosquito *Anopheles gambiae* through its major surface protein (WSP; Pinto et al., 2012; Pan et al., 2018). To confirm these findings, Epis et al. (2020) engineered the symbiont *Asaia* expressing WSP of *Wolbachia*. With this chimeric bacterium, they demonstrated that WSP is indeed responsible for the upregulation of immune-related genes in mosquitoes (compared to the original *Asaia* strain), thus resulting in the production of antimicrobial peptides that inhibit *Plasmodium* development (Epis et al., 2020).

Interestingly, this symbiont-mediated protection is also termed "immune priming", as in subsequent infections with pathogens (see Part 1 above). To differentiate each kind of immune priming, we use the term "symbiotic immune priming*" as opposed to "pathogenic immune priming*" (Box 1). In the previous examples, symbiotic immune priming is also induced by gut symbionts or endosymbionts and mostly relies on sustained immune responses. If the protective symbionts permanently "prime" the immune system as in the case of pathogens, it would be energetically costly for hosts (Gourbal et al., 2018), thus giving rise to many questions about its evolutionary conditions of emergence.

4.4. Importance of co-evolution in "symbiotic immune priming"

The majority of studies showing the upregulation of the host immune response in the presence of symbionts detected this "symbiotic immune priming" (notably with *Wolbachia*) in native or non-native hosts experimentally injected with protective symbionts (Table 2; Kambris et al., 2009; Moreira et al., 2009; Hughes et al., 2011; Pinto et al., 2012; Rancès et al., 2012; Braquart-Varnier et al., 2015; Zug et al., 2015; Zhang et al., 2020). For example, Rancès et al. (2012) demonstrated that the *Wolbachia* strain induces an upregulation of immune genes in non-native *A. aegypti* hosts, although no overexpression was observed in its native host *D. melanogaster*. Similar results were observed for mosquito survival with the recent association of *Wolbachia* (one generation) compared to older ones (several generations in the field; Zhang et al., 2020). Hence, symbiotic immune priming – mediated by *Wolbachia* or other symbionts – seems to mostly occur in recent symbioses, where the interactions are not yet well coordinated between the two partners. In this way, host immunity may initially be enhanced to eliminate non-native symbionts (Gerardo and Parker, 2014), which may be detected as an initial pathogenic infection for hosts. For example, the *Wolbachia* strain from *A. vulgare* injected in another isopod species (*P.d. dilatatus*) kills all the receiver hosts (Le Clec'h et al., 2012). The virulence of non-native *Wolbachia* is induced by an excessive autophagic response in non-native hosts *P.d. dilalatus*, which is not observed in the original host *A. vulgare*. The immune priming response to *Wolbachia* suggests that the tolerance of hosts to beneficial symbionts strongly depends on their degree of co-adaptation (Hamilton and Perlman, 2013). Similar results were observed in aphids, where the experimentally injected facultative symbiont *Hamiltonella defensa* reduces the lifespan and reproduction of aphids compared to those without this facultative symbiont (Oliver et al., 2008; Simon et al., 2011; Vorburger and Gouskov, 2011). Although these fitness costs may be partly explained by the infection costs, expressing the sustained immune responses in the permanent presence of protective symbionts may be energetically costly for hosts, thus altering the trade-off between life history traits. To be selected, the cost of symbiotic immune priming should be compensated by higher benefits such as a greater protection against recurrent infections or other physiological traits in hosts such as nutrient supply.

Considering the costs of upregulating immune responses and the uncommonness of symbiotic immune priming in natural associations (e.g., Weiss et al., 2012; Braquart-Varnier et al., 2015), many researchers argued that "symbiotic immune priming" is not the main mechanism of defensive symbiosis (Rancès et al., 2012; Hamilton and Perlman, 2013; Vorburger and Perlman, 2018; Zhang et al., 2015). According to Gerardo and Parker (2014), symbionts are more likely to evade the host immune system, thus limiting the stimulation of the immune response (see Part 2.2 above). Hosts would instead preferentially downregulate their immune responses, because beneficial symbionts take over part of the pathogen control (see Part 3.1 above). For example, *Drosophila* lineages harbouring *Wolbachia* over nine generations in the presence of Drosophila C virus (DVC) select weaker antiviral defences when *Wolbachia* is removed from individuals compared to asymbiotic lineages (Martinez et al., 2016). However, despite the upregulation of host immunity, protective symbionts are not directly cleared from the host. By contrast, activating the main immune pathways in hosts sometimes promotes the proliferation of protective symbionts. In *A. aegypti* and *D. melanogaster*, the upregulation of Imd and Toll pathways increased the *Wolbachia* and *Spiroplasma* (inherited symbiont) titres, that are not susceptible to immune effectors produced by their hosts (Herren and Lemaitre, 2011; Pan et al., 2018). While *Spiroplasma* lacks molecular surface patterns for its detection, *Wolbachia* is well recognised by the immune system and induces the production of antimicrobial compounds without inhibiting its own growth (Pan et al., 2018). The elevated load of *Wolbachia* is transmitted into *A. aegypti* progenies, and in many experiments, the higher *Wolbachia* load is correlated with the better

protection of hosts against pathogens (Osborne et al., 2012).

Although we cannot exclude that the symbiont tried to escape the host immunosurveillance, it appears that defensive symbiosis is less passive than it would seem. Protective symbionts (notably *Wolbachia)* can facilitate their own persistence by upregulating the host immune responses to eliminate microbial competitors (Braquart-Varnier et al., 2015; McLaren and Callahan, 2020). Symbiotic immune priming is thus not only part of the host's defence in detecting non-native symbionts as pathogens, but it could also be a strategy for protective symbionts to establish a symbiotic association with hosts (Zug et al., 2015; Pan et al., 2018). For this reason, we questioned the functional and evolutionary role of immune priming in invertebrates when it is induced by protective symbionts and/or pathogens, and more importantly, inside the same host.

5. Part 4. Immune priming: Cornerstone of the tripartite interaction between hosts, beneficial symbionts, and pathogens

5.1. Are immune priming mechanisms similar with symbiotic and pathogenic infections?

Invertebrate immune priming is defined as the enhanced protection of hosts following a second infection with the same – or different – pathogens. Immune priming is mediated by (1) memory-like immune responses, (2) immune shifts, and/or (3) sustained immune responses (see Part 1.4 above). Here, we explore the extent to which protective symbionts prime the immune system of hosts in the same way as pathogens do. Based on our literature review, we showed that invertebrate immune priming is initiated in response to pathogenic infection and in the presence of protective symbionts. For each case, we cannot exclude that one of the shared mechanisms mediating this protection is a memory-like immune response, although the most common mechanism identified for both types of immune priming is the sustained immune response of the host. This shared mechanism nevertheless differs and strongly depends on the degree of co-evolution between partners.

On the one hand, we showed that hosts implement different immune abilities to specifically discriminate between permanent beneficial symbionts or pathogens that frequently infect hosts (see Parts 1 and 2). While the discrimination of different pathogens sometimes relies on memory-like abilities (Dscam, FREPS, haemocyte subpopulations production), the discrimination of beneficial symbionts mostly depends on sustained immune tolerance (PGRP, bacteriocytes, etc.). Some studies suggest that hosts discriminate symbionts similarly to pathogens (changes in binding abilities of haemocytes or Dscam expression), although further mechanistic experiments are needed to confirm the memory-like abilities of beneficial symbionts. We highlighted that the functional role of this discrimination depends on the type of microbe. When invertebrates "remember" pathogens, they mostly improve their resistance in the second infection and eliminate the same pathogens more efficiently (Part 1). By contrast, when invertebrates "remember" beneficial symbionts, they reduce their immune response towards them in an immune tolerant way (Part 2). This tolerance could gradually lead to mutualistic symbiosis if the symbionts provide significant advantages to the hosts.

On the other hand, symbionts and pathogens share one similar immune priming mechanism: the sustained immune response of hosts (Parts 1 and 2). Initially, this mechanism seems non-specific to the microbes encountered. The arrival of symbionts (symbiotic immune priming) or pathogens (pathogenic immune priming) triggers long-lasting immune responses in hosts, thus efficiently protecting against subsequent pathogenic infections. Nevertheless, symbiotic immune priming is also exploited by protective symbionts when interacting with other microbes. When non-native protective symbionts sustainably "prime" host immunity, they improve the clearance of pathogens that are potential competitors for their ecological niches (see Part 3 above). However, symbiotic immune priming against pathogens can be specific, as one strain of protective symbionts may mediate the protection against some pathogens but not others (Part 3). This observation may be partially due to the (intra or extracellular) lifestyle of symbionts and pathogens.

Based on the common immune ability of hosts (pathogenic or symbiotic immune priming) at the beginning of the interaction, we supposed that sustained immune priming is gradually selected for eliminating detrimental microbes and accepting beneficial ones. Modulating the functional role of immune priming may be driven by the intrinsic features of microbes. Pathogens need hosts to replicate even if damage occurs, whereas mutualistic symbionts must preserve the hosts for their own perennity. The different degrees of virulence between pathogens and symbionts may promote the selection of plasticity as an outcome of immune priming. Another important factor that could modulate immune priming is the load of microbes. Hosts control the density of beneficial symbionts (Rio et al., 2006) and mount an immune priming response depending on the load of pathogens (e.g., Fallon et al., 2011; Wu et al., 2015a,b; see also Part 1), while the load of beneficial symbionts impacts the strength of the protection against pathogens (López-Madrigal and Duarte, 2019).

Overall, we hypothesised that immune priming is a shared mechanism with distinct roles, as the immune cornerstone involved in host-pathogen interactions, host-symbiont interactions, and symbiont-pathogen interactions inside the same host (Fig. 2). Given that invertebrates may be sustainably primed by protective symbionts, we questioned whether and how symbiotic and pathogenic immune priming impact each other inside the same host.

5.2. Can there be interference between symbiotic and pathogenic immune priming inside the same host?

One important point to recall when considering the interaction between symbiotic and pathogenic immune priming is the interaction between microbes (Figueiredo and Kramer, 2020). As stated by Hafer and Vorburger (2019), parasites affect protective symbiont frequencies and communities, although protective symbionts also affect parasite frequencies and communities. Since interdependence exists between microbes inside the same host, the immune priming responses that they induce (i.e., sustained immune response) should interfere with each other. To our knowledge, few publications have tested the influence of symbionts on pathogenic immune priming in invertebrates (Table 3). In these studies, pathogenic immune priming (i.e., two subsequent infections with pathogens) is tested in the presence or absence of protective symbionts (Braak et al., 2013; Prigot-Maurice et al., 2020) or with the alteration of gut microbiota, as it can provide a protective effect to hosts (Rodrigues et al., 2010; Contreras-Garduño et al., 2015; Futo et al., 2016). Among the five publications identified, three demonstrated that protective symbionts could interfere with pathogenic immune priming in two different ways.

Prigot-Maurice et al. (2020) highlighted that the simple presence of *Wolbachia* protects *Armadillidium vulgare* hosts against *Salmonella enterica* (See also Braquart-Varnier et al., 2015). When inducing pathogenic immune priming with *S. enterica* in young symbiotic hosts (harbouring *Wolbachia*), no protection was observed in primed hosts compared to controls, because both non-primed and primed hosts survived better thanks to *Wolbachia.* When hosts were old, the symbiotic immune priming (conferred by *Wolbachia*) was reduced, and the pathogenic immune priming was observable in hosts primed with *Salmonella*. Here, the symbiotic and pathogenic immune priming seem to be interdependent, which is probable as *Wolbachia* and *Salmonella* are both intracellular gram (−) bacteria. This finding suggests that symbiotic immune priming with *Wolbachia* probably uses the same immune signalling pathways as pathogenic immune priming with *Salmonella.* Because pathogenic immune priming does not improve the survival of young symbiotic hosts upon second infection with *S. enterica*, we hypothesised that the induction of immune priming depends on a

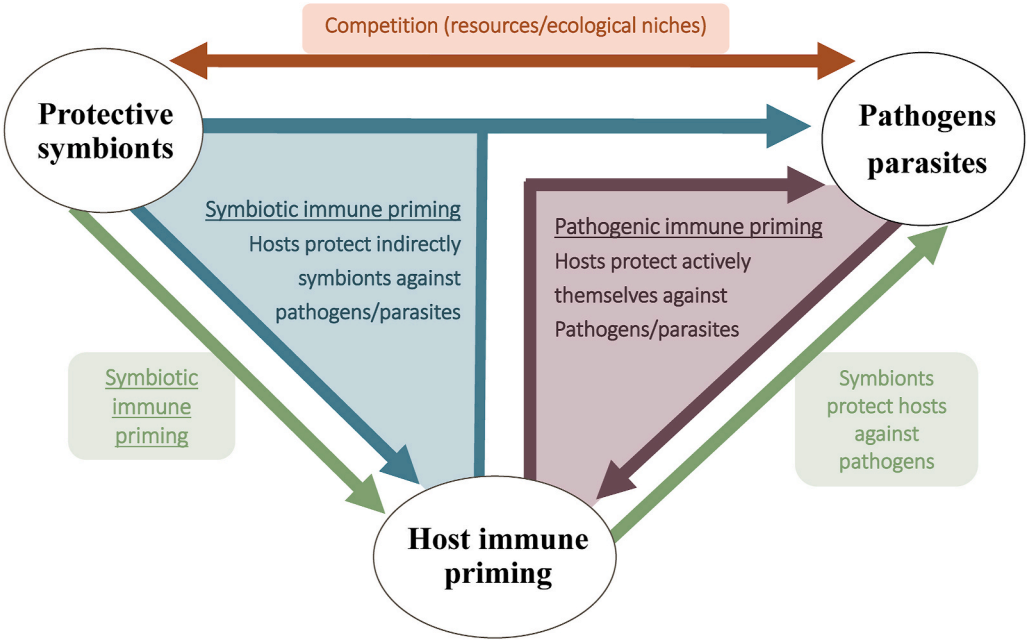


Fig. 2. Functional roles of immune priming in invertebrates, as immune cornerstone involved in host/symbiont/pathogen interactions.
Blues arrows and area: protective symbionts induce immune priming in the host (sustained immune response) that indirectly protects the symbionts against microbial competitors (pathogens and eucaryotic
parasites for the host). Green arrows and area: protective symbionts induce immune priming in the host (sustained immune response) that protects the host against
/parasites. Purple arrows and area: pathogens and parasites induce immune priming in the host (sustained immune response) that protects the hosts against same – or different - pathogens/parasites. Orange arrows and area: symbionts and pathogens/parasites directly use competitive compete for ecological niches in the same host.

threshold, already reached by *Wolbachia* when *S. enterica* infects hosts for the first time.

By contrast, the removal or diminution of the symbiont load (i.e., gut microbiota) prevents the expression of pathogenic immune priming in *Anopheles gambiae* or *Tribolium castaneum* hosts (Rodrigues et al., 2010; Futo et al., 2016). While no immune responses were analysed in detail in *T. castaneum*, the pathogenic immune priming in *A. gambiae* is mediated by the sustained production of one haemocyte subset with enhanced binding abilities and anti-*Plasmodium* activity in the gut (Rodrigues et al., 2010). This cellular response is especially induced by the gut microbiota during the first infection with *Plasmodium berghei*. However, an aseptic injury or phosphate buffer saline (PBS) injection disrupts the pathogenic immune priming in *A. gambiae* even when it harbours gut microbiota (Rodrigues et al., 2010). These authors suggested that primed haemocytes move to the injury site but do not mediate an enhanced immune response in the mosquitoes' gut when they are secondarily infected with *P. berghei*. It therefore appears that the interdependence of symbiotic and pathogenic immune priming in *A. gambiae* depends on the location inside hosts. While symbiotic and pathogenic immune priming use bacterium and parasitic immune signalling pathways, respectively, symbiotic immune priming still protects hosts against *P. berghei* (Rodrigues et al., 2010). Synergistic and complementary functions are thus possible in the expression of immune priming.

From this observation, Contreras-Garduño et al. (2015) showed that the antibacterial immune response could mask the parasite-induced response. Immune priming responses overlap in *A. gambiae*, making it difficult to distinguish between symbiotic and pathogenic ones. The authors thus performed complementary experiments on pathogenic immune priming against *Plasmodium* in *A. albimanus*, with or without microbiota (Table 2). In this closely related mosquito species, specific pathogenic immune priming against *Plasmodium* does not require gut microbiota (Contreras-Garduño et al., 2015). It instead relies on the biphasic production of antimicrobial peptides, whereas symbiotic immune priming in *A. gambiae* involves the sustained production of haemocyte subpopulation. Hence, symbiotic and pathogenic immune priming could both be expressed and interfere with each other using the same or different immune effectors depending on the invertebrate species. This interference could use specific receptors such as FREPs, which are involved in the responses of several microbes (Dong and Dimopoulos, 2009).

We assumed that symbiotic and pathogenic immune priming were inextricably associated, although certain conditions are required to observe such interference. Firstly, symbiotic and pathogenic immune priming should simultaneously be expressed in the same location time inside hosts. When they are expressed in different locations or at different times, they are independent, each being expressed in the respective part of their hosts. In *Drosophila*, the selective resistance induced by oral infections with *Pseudomonas entomophila* over several generations does not protect the host against systemic infections with the same pathogen (Martins et al., 2013). However, circulating haemocytes in invertebrates could carry immune information – or enhanced abilities – that make the immune priming systemic, regardless of the triggering event (symbiont or pathogen). Otherwise, this interference between symbiotic and pathogenic immune priming mostly relies on the same immune signalling pathways or immune effectors, which depend on the lifestyle of symbionts and pathogens in hosts (intracellular or extracellular). Given that protective symbionts induce an immune priming response that protects against one type of microbe (e.g., gram (−) bacteria) and that pathogen protects against another type of microbe (e.g., gram (+) bacteria), symbiotic and pathogenic immune priming should not interfere with each other but should rather promote complementary protections. By contrast, using the same immune components may not combine the immune priming protections (Prigot-Maurice et al., 2020; Rodrigues et al., 2010). Although our suggestions are based on a few studies, it is possible to observe the interference of immune priming in the same host. One resulting question is the evolutionary outcome of immune priming towards symbionts and/or pathogens.

5.3. *What are the evolutionary consequences for pathogenic immune priming when mutualist symbionts already prime the immune system?*

Since protective symbionts already prime host immunity, we expected that hosts would not need to implement pathogenic immune priming. In the experiment carried out by Prigot-Maurice et al. (2020), the first infection with *S. enterica* did not better protect young symbiotic hosts harbouring *Wolbachia*. Because pathogenic immune priming did not provide additional advantages to hosts, its selection is expected to decrease in favour of symbiotic immune priming. Also, when comparing approximated survival improvements resulting from symbiotic or

Table 3
Immune priming response with pathogens in the presence/absence of protective symbionts.Five publications experienced the interaction between protective symbionts and pathogens in immune priming in invertebrates. "Immune priming interference": if "Yes", symbionts impact the immune priming response induced by pathogens; if "No" symbionts does not impact immune priming response induced by pathogens. "Time between infection" is the time between the first and second pathogenic exposure. "Route of infection" in the same for both symbionts and pathogens/parasites.

Reference	Aim	Host species	Protective symbiont	Pathogen	Methods	Time between infections	Route of infection	Immune priming interference	Immune mecanisms (if identified, or related works)
Rodrigues et al., 2010	Immune priming response according to the alteration of the gut microbiota	*Anopheles gambiae*	Gut microbiota	*P. berghei*	Comparison of both the survival rate and the immune response of the hosts (symbiotic or asymbiotic, primed or non-primed with P. berghei) upon the second infection. The gut bacteria were eliminated by oral administration of antibiotics prior to the first infection. The first infection was performed with living P. berghei.	7 days	Oral exposure	Yes When the gut microbiota was present, the pathogenic immune priming was observed (reduced load of P. berghei upon lethal infection, enhanced antibacterial production) When the gut microbiota was removed, no pathogenic immune priming response against P. berghei was observed.	In the primed mosquitos, the gut microbiota comes in direct contact with the epithelial cells, that increase the granulocytes proportion. The granulocytes change their binding abilities after the challenge and enhance their anti-parasite activity. This change in granulocytes proportion in the haemocoel of the primed mosquitos reduces the quantity of P. berghei in re-exposure (compared to the non primed mosquitoes). Without the gut microbiota, the enhanced response of haemocytes was not observed.
Contreras-Garduño et al., 2016.	Immune priming response according to the alteration of the gut microbiota	*Anopheles albimanus*	Gut microbiota	P. berghei	Comparison of the immune response of the hosts (symbiotic or asymbiotic, primed or non-primed with P. berghei). The gut bacteria were eliminated by contact with antibiotics from eggs eclosion to the end of the experiment. The first parasitic infection was performed with inactivated P. berghei.	7 days	Oral exposure	No No differences in the immune priming response were observed (P. berghei titer) when mosquitoes were treated with antibiotics.	The immune priming response of the hosts (having the gut microbiota or not) is mediated by a biphasic antimicrobial production in the first and the second infection event.
Prigot-Maurice et al., 2020	Immune priming response according to age, gender and the presence of an endosymbiont	*Armadillidium vulgare*	*Wolbachia*	*S. enterica typhimurium*	Comparison of the survival rates of the hosts (young or old males and females, coming from symbiotic (with Wolbachia) or asymbiotic (without Wolbachia) lineages) upon the second lethal infection with *S. enterica*. The first infection was performed with non-lethal dose of living *S. enterica*.	7 days	Systemic infection in haemolymph (injection)	Yes Old symbiotic females mounted an immune priming response similar to the immune priming response of asymbiotic males and females, because non-primed hosts were already protected by Wolbachia. No immune priming response was observed in young females	Currently unknown, but: The immune priming response against *S. enterica* is probably mediated by the sustained immune response of the hosts (Prigot-Maurice et al. 2019). Wolbachia induces a defensive symbiosis in *A. vulgare* against *S. enterica* (Braquart-Varnier et al., 2015) and increases the hyaline

(*continued on next page*)

Table 3 (*continued*)

Reference	Aim	Host species	Protective symbiont	Pathogen	Methods	Time between infections	Route of infection	Immune priming interference	Immune mecanisms (if identified, or related works)
								harbouring Wolbachia.	and the semi-granular haemocyte populations in hosts of 1 year-old (Chevalier et al., 2012).
Futo et al. (2016)	Immune priming response according to the microbioal loads of the gut microbiota	*Tribolium castaneum*	Gut microbiota	*B. thuringiensis bv. tenebrionis*	Comparison of the survival rate of the hosts (with or without microbiota) upon the second lethal infection with B. thuringiensis. The microbiota alteration was performed by feeding the hosts with supplemented or sterile food. The first infection was performed with B. thuringiensis supernatant.	4 days	Oral exposure	Yes The hosts having lower microbial loads (microbiota) had lower survival rate after reexposure to B. thuringiensis compared to the hosts having higher microbial loads. The protection of immune priming was reestablish when the hosts without microbiota were re-feeding with food supplemented with the gut bacteria	Currently unknown, but: The immune priming response seems mediated by the sustained immune response or the immune-gene expression shift in the hosts primed with B. thuringiensis (Greenwood et al., 2017; Milutinović and Kurtz, 2016)
Braak et al. (2013)	Immune priming response in the presence of symbionts and effects on the winged offspring production	*Acyrthosiphon pisum*	*Buchnera aphidicola and/or Serratia symbiotica, Hamiltonella defensa, Regiella insecticola*	*E. coli* or *S. marcescens*	Comparison of survival rate of the hosts (from symbiotic or asymbiotic lineages, primed or non-primed) upon the second lethal infection. The first infection was performed with bacterial elicitors (heat-killed E.coli or Micrococcus)	24 h	Systemic infection in haemolymph	No No immune priming response was observed, neither in symbiotic hosts nor in asymbiotic hosts. The subsequent exposure did not influence the number of winged offspring.	Currently unknown

pathogenic immune priming in several species, the protection provided by protective symbionts was greater than after the first pathogenic infection (Tables 1 and 2).

In terms of the evolutionary outcome of biological processes, we should necessarily speak of the costs and benefits of expressing them. In this context, symbiotic immune priming in non-native hosts, which is permanently expressed without pathogens, seems costly for hosts. Indeed, mounting a permanent and sustained immune response would negatively impact the fitness-related traits of hosts. For example, *Wolbachia* and *H. defensa* protect *D. melanogaster* and *A. fabae* against viruses and parasitoids, respectively, but also significantly reduce their host's lifespan (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2015), while *Wolbachia* also reduces fertility in *A. vulgare* (Lachat, 2009). Expressing symbiotic immune priming would thus be less advantageous for hosts than expressing pathogenic immune priming but only after a first infection. Symbiotic immune priming would therefore be favoured if the probability of infection by pathogens is high (King and Bonsall, 2017; Cayetano et al., 2015) or if symbionts provide primordial benefits to hosts such as nutritional benefits.

In agreement with other authors (Hafer and Vorburger, 2019; Gerardo et al., 2020), we propose that the selection of immune priming (mediated by pathogens and/or symbionts) could be explored by experimental evolution on hosts. Testing pathogenic immune priming over several generations with or without protective symbionts could help us to understand which kind of immune priming (symbiotic or pathogenic) is preferentially selected in hosts and which evolutionary components are key. McLaren and Callahan (2020) stated that favouring protective symbionts allows hosts to increase resistance against pathogens, with lower costs than mounting their own immune response. This assumption is probably true when protective symbionts use mechanisms other than the sustained host immune response. Beyond considering this interference between symbiotic and pathogenic immune priming via the sustained immune response, we may expect that protective symbionts still profoundly influence the selection of pathogenic immune priming in long-term associations.

5.4. To what extent do protective symbionts impact pathogenic immune priming in long-term associations?

Theoretical studies demonstrate that the evolution of pathogenic

immune priming depends on many factors such as the strength of protection, the type of pathogen, its virulence, and the probability of host infection (Tate and Rudolf, 2012; Best et al., 2013; Moret et al., 2019; Gourbal et al., 2018). Empirically, Khan et al. (2016, 2017, 2018) showed a large variation in immune priming across *T. castaneum* populations against *Bacillus thuringiensis*. This variation is driven by the basal pathogen susceptibility of the host and the trade-off with fitness components when expressing immune priming (Khan et al., 2017). Interestingly, exposing *T. castaneum* populations to different states of *B. thuringiensis* (inactivated or not, with different dosages) over several generations modulates the immune priming abilities of hosts, which evolve with generalised resistance or specific immune memory (Khan et al., 2017). However, these studies made no reference to the presence of protective symbionts, even though they can influence the co-evolutionary race between hosts and pathogens (Vorburger and Perlman, 2018).

Symbiotic immune priming could impact the enhanced resistance against pathogens in hosts. In *Drosophila*, *Wolbachia* protects the hosts against the RNA DVC virus (Faria et al., 2018). When selecting the symbiotic lineage of *Drosophila* exposed to DVC viruses and removing *Wolbachia* with antibiotic treatment, hosts obtain resistance in only eight generations without *Wolbachia*, which then lasts for 35 generations (Faria et al., 2018). The co-evolution with *Wolbachia* (as the protective symbiont) resulted in the selection of independent intrinsic resistance to DVC in hosts, mediated by certain immune-related genes. As *Wolbachia* induces the genetic selection of resistance in the host, we expect that symbionts may – via symbiotic immune priming – provide the host with better resistance against pathogens. By contrast, pathogens co-evolving with protective symbionts generally display higher rates of evolution in terms of virulence and pathogenic success than those evolving without protective symbionts (Ford et al., 2017; Vorburger and Perlman, 2018). For example, the *Wolbachia* load in the native and natural host *Culex pipiens* sampled in the field is positively correlated with the DNA densovirus CpDV load (Altinli et al., 2020). Even though *Wolbachia* is not known to protect against DNA viruses (Pimentel et al., 2021), this demonstrates that pathogens can increase their pathogenicity in the presence of certain symbionts (with increased competition between symbionts and pathogens). Hosts would then evolve with strong defensive abilities provided that protective symbionts do not take over a major part of the pathogen control. We must nevertheless keep in mind that the nature of the symbiont (intracellular or extracellular; in the gut or in general circulation) may influence host resistance. An endosymbiont and an extracellular gut symbiont will not have the same interactions or the same frequency of interactions with competitors. Hence, different kind of symbionts would differently select the sustained host immune response or lead to better competition between microbes.

In a broader conceptual framework, protective symbionts could induce pathogenic immune priming in hosts. For instance, damage caused to mitochondria by pathogenic infections release signals in the host cells, thus triggering the host immune response (Rongvaux, 2018). Applying this finding to our topic of research, the alteration of protective symbionts (and their populations) by pathogens could be a key component that primes host immunity, not only the intrinsic response of hosts to pathogens. The findings of Rodrigues et al. (2010) are particularly relevant in this respect (Table 3), as protective symbionts could mount an immune priming response on their own. In *C. elegans*, adding both the pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis* and its more virulent competitor *Staphylococcus aureus* in the hosts within five generations leads to the emergence of defensive symbiosis from *E. faecalis* against *S. aureus* (King et al., 2016). This protection is mediated by the increased production of antimicrobial superoxide by *E. faecalis* against *S. aureus*. If protective symbionts produce antimicrobial components in response to an initial pathogenic infection and increase their production after a second exposure, then they perform pathogenic immune priming independently from the host.

In both cases, hosts would not need to develop intrinsic immune priming against pathogens but instead the immune abilities to recognise and tolerate specifically protective symbionts that perform immune priming for them. Some studies demonstrate that protective symbionts are responsible for the specificity of interactions between hosts and pathogens (Ford et al., 2017; Vorburger and Perlman, 2018 for review). Koch and Schmid-Hempel (2012) cross-transplanted the microbiota in *Bombus terrestris* individuals from six colonies and then exposed them to different parasite strains of *Crithidia bombi*. The intensity and diversity of parasite infections are mainly influenced by the colony source of the microbiota rather than the host genotypes. As stated by Koch and Schmid-Hempel (2012), "microbiota may therefore partially explain the observed 'specificity gap' in invertebrates (Little et al., 2005), namely the observation of specific immune phenotypes in invertebrate systems so far lacking a definite mechanistic explanation". Most studies aim to show an innate immune memory in invertebrates via subsequent infections with pathogens. However, considering the role of protective symbionts in the immune priming process, should we not search for an innate immune memory with protective symbionts?

Overall, protective symbionts could explain the variability of pathogenic immune priming among invertebrate species or populations, which explains why it is so difficult to identify the precise mechanisms of pathogenic immune priming in invertebrates. Baumann and Moran (1997) highlighted that repeated infections in different groups of hosts probably leads to endosymbiotic associations, but repeated infections are also expected to select immune priming in invertebrates (Moret et al., 2019). Studying symbiotic immune priming could provide key information to understand how (mechanistically) and why (evolutionarily) pathogenic immune priming emerged and varies in the same individual and between invertebrate species.

6. Conclusion and further investigations

In this review, we compared symbiotic and pathogenic immune priming as a mechanistic and evolutionary outcome for invertebrate hosts. Based on many experiments reported in the literature, we pointed out the following:

1) Immune priming in invertebrates is expressed in response to pathogenic and symbiotic "infections" but also used by protective symbionts in competition with other microbes.
2) Their expression mostly relies on sustained immune responses at the beginning of host-microbial interactions. Nevertheless, the evolutionary outcome of immune priming could lead to different discriminations from enhanced tolerance of beneficial symbionts to enhanced resistance against pathogens.
3) Interference and overlapping of symbiotic and pathogenic immune priming are observable inside the same hosts but probably require the use of the same immune pathways, location, and time of expression in hosts.
4) Considering this interference, symbiotic immune priming could influence the selective pressures exerted on pathogenic immune priming in hosts depending on the cost/benefit balance to mount such immune abilities.
5) Improving our understanding of symbiotic immune priming in hosts may shed light on immune priming mechanisms used against pathogens, especially in the variation of its expression across species.

Further experiments are needed to explore the plasticity of immune priming in the interactions between protective and harmful microbes. According to its characteristics, we suggest that *Wolbachia* remains a good symbiont to deepen our understanding about the emergence of immune priming in invertebrates. *Wolbachia* induces both parasitic and beneficial effects in the host (Zug et al., 2015; Kaur et al., 2021). Braquart-Varnier et al. (2015) showed the protection conferred with both native and non-native *Wolbachia* strains in two species of terrestrial isopods against pathogenic bacteria with an intracellular lifestyle

(Braquart-Varnier et al., 2015). In the native host *A. vulgare*, whose symbiotic lineage has been maintained in laboratory conditions since 1991, *Wolbachia* tends to downregulate immune-related genes in whole animals but upregulate the same genes in immune tissues (Chevalier et al., 2012). Hence, we believe that symbiotic terrestrial isopods constitute a promising model to provide knowledge about the emergence of the immune priming process in invertebrates and the influence of symbionts.

Nevertheless, we cannot exclude that these lines of research will come up against several analytical deadlocks. It is sometimes unknown whether invertebrates harbour protective symbionts, especially as most are not cultivable. Expanding research about microbiota genomic analyses will contribute to identifying which microbes are important for the protection of the host. Further, symbionts employ several mechanisms to defend their hosts. In *Drosophila*, *Wolbachia* may interfere directly with the viral replication of pathogenic viruses while simultaneously priming the immune system against the same viruses by upregulating the immune-related genes (Part 3), which makes it difficult to precisely determine the protective mechanism involved. Even if the mechanisms can be identified in future research, it remains impossible to generalise about the immune priming process in the diversity of invertebrate species, as each mechanism is adapted to certain symbionts and pathogens, which in turn interact specifically with each other.

To conclude this review, we quote Ford et al. that "defensive microbes are common within host populations and across numerous host species. As a result, we are only just beginning to realize their immense value to hosts" (2017), which notably applies in the case of invertebrate immune priming.

Declaration of interest

None.

Author's contribution

All authors discussed the literature and contributed to the presented idea. CPM wrote the manuscript, tables, figures and developed the theory. SBB and CBV verified the manuscript, drafted Tables 1 and 2, and supervised the final render of this work.

Funding

This work was supported by the Vivipary and Immune Priming grant (PEPS EXOMOD CNRS), State-Region Planning Contracts, the European Regional Development Fund, the French National Centre for Scientific Research, the French Ministry of Higher Education and Research, and the University of Poitiers.

Acknowledgements

We would particularly like to thank the two anonymous reviewers as well as Romain Pigeault for their constructive comments, which considerably improved this review. We would also like to thank Baptiste Lherault for lending us the Antidote software and Victoria Grace for editing the manuscript.

References

Adema, C.M., Hertel, L.A., Miller, R.D., Loker, E.S., 1997. A family of fibrinogen- related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (16), 8691e8696.

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., Aksoy, S., 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, Wigglesworthia glossinidia. Nat. Genet. 32, 402–407.

Alper, S., McBride, S.J., Lackford, B., Freedman, J.H., Schwartz, D.A., 2007. Specificity and complexity of the Caenorhabditis elegans innate immune response. Mol. Cell Biol. 27 (15), 5544–5553. https://doi.org/10.1128/MCB.02070-06.

Altinli, Mine, Lequime, Sebastian, Nten, Celestine, Justy, Fabienne, Weill, Mylène, Sicard, Mathieu, 2020. *Wolbachia* modulates prevalence and viral load of Culex pipiens densoviruses in natural populations. Mol. Ecol. 29 https://doi.org/10.1111/mec.15609.

Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.O., Heddi, A., 2006. Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil Sitophilus zeamais. Appl. Environ. Microbiol. 72, 6766–6772.

Armitage, S.A.O., Peuß, R., Kurtz, J., 2015. Dscam and pancrustacean immune memory – a review of the evidence. Dev. Comp. Immunol. 48 (2), 315–323. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004.

Ballinger, M.J., Perlman, S.J., 2019. The defensive Spiroplasma. Current Opinion in Insect Science 32, 36–41. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.10.004.

Baumann, 2005. P. Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annu. Rev. *Microbiol* 59, 155–189.

Baumann, P., Moran, N.A., 1997. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. Antonie Leeuwenhoek 72, 39–48. https://doi.org/10.1023/A:1000239108771.

Baumann, P., Moran, N.A., Baumann, L., 2000. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. In: Dworkin, M. (Ed.), The Prokaryotes. Springer, New York, p. 229.

Beckage, N.E., 2008. Insect Immunology. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373976-6.X5001-0.

Ben-Ami, F., Orlic, C., Regoes, R.R., 2020. Disentangling unspecific and specific transgenerational immune priming components in host-parasite interactions. BioRxiv. https://doi.org/10.1101/429498.

Benoit, J.B., Vigneron, A., Broderick, N.A., Wu, Y., Sun, J.S., Carlson, J.R., Aksoy, S., Weiss, B.L., 2017. Symbiont-induced odorant binding proteins mediate insect host hematopoiesis. eLife 6, 709–719. https://doi.org/10.7554/eLife.19535.

Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., Kavanagh, K., 2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of Galleria mellonella from a subsequent lethal infection by Candida albicans and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microb. Infect. 8 (8), 2105–2112. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.005.

Bernier, C., Boidin-Wichlacz, C., Tasiemski, A., Hautekèete, N., Massol, F., Cuvillier-Hot, V., 2019. Transgenerational immune priming in the field: maternal environmental experience leads to differential immune transfer to oocytes in the marine annelid Hediste diversicolor. Genes 10 (12), 1–18. https://doi.org/10.3390/genes10120989.

Best, A., Tidbury, H., White, A., Boots, M., 2013. The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in invertebrate hosts. J. R. Soc. Interface 10, 20120887. https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0887.

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) https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833.

Bischoff, V., Vignal, C.C., Duvic, B., et al., 2006. Downregulation of the Drosophila immune response by Peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. PLoS Pathog. 2, e14.

Bordenstein, S.R., Theis, K.R., 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. PLoS Biol. 13 (8), e1002226 https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226.

Bosch, T.C.G., 2014. Rethinking the role of immunity: lessons from Hydra. Trends Immunol. 35 (10), 495–502. https://doi.org/10.1016/j.it.2014.07.008.

Bosch, T.C.G., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Fraune, S., Hemmrich, G., Zill, H., Schröder, J.M., 2009. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. Dev. Comp. Immunol. 33 (4), 559–569. https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.10.004.

Bourtzis, K., Miller, T.A., 2008. Insect Symbiosis, ume 3. CRC Press. https://books.google.fr/books?id=VS9O27EfyEYC.

Braak, B., Laughton, A.M., Altincicek, B., Parker, B.J., Gerardo, N.M., 2013. Exposure to bacterial signals does not alter Pea aphids' survival upon a second challenge or investment in production of winged offspring. PloS One 8 (8), e73600. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073600.

Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A.W., Kambhampati, S., Stern, D.L., 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-Buchnera symbiosis. PLoS Biol. 1 (1) https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000021.

Braquart-Varnier, C., Altinli, M., Pigeault, R., Chevalier, F.D., Grève, P., Bouchon, D., Sicard, M., 2015. The mutualistic side of Wolbachia-isopod interactions: Wolbachia mediated protection against pathogenic intracellular bacteria. Front. Microbiol. 6 (DEC), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01388.

Bredon, M., Herran, B., Lheraud, B., Bertaux, J., Grève, P., Moumen, B., Bouchon, D., 2019. Lignocellulose degradation in isopods: new insights into the adaptation to terrestrial life. BMC Genom. 20 (1), 1–14. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5825-8.

Brehélin, M., Roch, P., 2008. Specificity, learning and memory in the innate immune response. Invertebr. Surviv. J. 5 (2), 103–109. ⟨hal-02662860⟩.

Brites, D., Mctaggart, S.J., Morris, K., Anderson, J.E., Thomas, K., Colson, I., et al., 2008. The Dscam homologue of the crustacean daphnia is diversified by alternative splicing like in insects. Mol. Biol. Evol. 25 (7), 1429–1439. https://doi.org/10.1093/molbev/msn087.

Brown, B.L., Creed, R.P., Skelton, J., Rollins, M.A., Farrell, K.J., 2012. The fine line between mutualism and parasitism: complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. Oecologia 170 (1), 199–207. https://doi.org/10.1007/s00442-012-2280-5.

Brown, T., Rodriguez-Lanetty, M., 2015. Defending against pathogens - immunological priming and its molecular basis in a sea anemone, cnidarian. Sci. Rep. 5 https://doi.org/10.1038/srep17425, 17425.

Browne, N., Surlis, C., Kavanagh, K., 2014. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in Galleria mellonella larvae. J. Insect Physiol. 63 (1), 21–26. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006.

Buchmann, K., 2014. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. Front. Immunol. 5 (September), 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459.

Caragata, E.P., Rancès, E., Hedges, L.M., Gofton, A.W., Johnson, K.N., O'Neill, S.L., McGraw, E.A., 2013. Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia*. PLoS Pathog. 9 (6), e1003459 https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459.

Cayetano, L., Rothacher, L., Simon, J.C., Vorburger, C., 2015. Cheaper is not always worse: strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. Proc. Biol. Sci. 282 (1799) https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2333.

Cerenius, L., Söderhäll, K., 2013. Commentary variable immune molecules in invertebrates. J. Exp. Biol. 216 (23), 4313–4319. https://doi.org/10.1242/jeb.085191.

Chang, Y.H., Kumar, R., Ng, T.H., Wang, H.C., 2018. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. Dev. Comp. Immunol. 80 https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003. Elsevier Ltd.

Chaplin, D.D., 2010. Overview of the immune response. J. Allergy Clin. Immunol. 125 (2) https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980. S3–S23.

Chapuis, E., Emelianoff, V., Paulmier, V., Le Brun, N., Pagès, S., Sicard, M., Ferdy, J.B., 2009. Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism. J. Evol. Biol. 22 (10), 2104–2117. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01829.x, 2009 Oct.

Cheng, T.C., Sullivan, J.T., Howland, K.H., Jones, T.F., Moran, H.J., 1983. Studies on parasitic castration: soft tissue and shell weights of Ilyanassa obsoleta (Mollusca) parasitized by larval trematodes. J. Invertebr. Pathol. 42 (2), 143–150. https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90055-1.

Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Bouchon, D., 2012. Feminizing Wolbachia: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in Armadillidium vulgare. BMC Microbiol. 12 (Suppl. 1), S1. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S1.

Chevignon, G., Boyd, B.M., Brandt, W., Oliver, K.M., Strand, M.R., 2018. Culture-facilitated comparative genomics of the facultative Symbiont *Hamiltonella defensa*. Genome Biology and Evolution 10 (3), 786–802. https://doi.org/10.1093/gbe/evy036.

Chiang, Y.A., Hung, H.Y., Lee, C.W., Huang, Y.T., Wang, H.C., 2013. Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine (SR)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. Fish Shellfish Immunol. 34, 209–219.

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaeverbeke, T., Delhaes, L., Pradeu, T., 2017. Protective microbiota: from localized to long-reaching Co-immunity. Front. Immunol. 8 (December), 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678.

Chorine, V., 1929. Immunité antitoxique chez les chenilles de *Galleria mellonella*. Ann. Inst. Pasteur. 43, 955–958.

Chorine, V., 1931. Contribution à l'étude de l'immunité chez les insectes. Bull. biol. France et Belg. 65, 291–393.

Chou, P.H., Chang, H.S., Chen, I.T., Lin, H.Y., Chen, Y.M., Yang, H.L., Wang, K.C., 2009. The putative invertebrate adaptive immune protein *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) is the first reported Dscam to lack a transmembrane domain and cytoplasmic tail. Dev. Comp. Immunol. 33, 1258–1267.

Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Esteves, S.S., Weinert, L.A., Martinez, J., Jiggins, F.M., Teixeira, L., 2013. Wolbachia variants induce differential protection to viruses in Drosophila melanogaster: a phenotypic and phylogenomic analysis. PLoS Genet. 9 (12) https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896.

Ciancio, A., 2016. Invertebrate Bacteriology: Function, Evolution and Biological Ties. *Springer* Netherlands. https://books.google.fr/books?id=kXH_DAAAQBAJ.

Clay, K., 2014. Defensive symbiosis: a microbial perspective. Funct. Ecol. 28 (2), 293–298. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258.

Contreras-Garduño, J., Méndez-López, T.T., Patiño-Morales, A., et al., 2019. The costs of the immune memory within generations. Sci. Nat. 106 (59) https://doi.org/10.1007/s00114-019-1657-2.

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Lanz-Mendoza, H., 2015. Plasmodium berghei induced priming in Anopheles albimanus independently of bacterial co-infection. Dev. Comp. Immunol. 52 (2), 172–181. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.004.

Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., Canales-Lazcano, J., 2016. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. Ecol. Entomol. 41 (4), 351–366. https://doi.org/10.1111/een.12300.

Cooper, E.L., 1969. Specific tissue graft rejection in earthworms. Science 166 (3911), 1414–1415. https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1414.

Cooper, E., 2012. Adaptive immunity from prokaryotes to eukaryotes: broader inclusions due to less exclusivity?. In: Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections. InTech, pp. 495–520. https://doi.org/10.5772/38054.

Cooper, M.D., Alder, M.N., 2006. The evolution of adaptive immune systems. Cell 124 (4), 815–822. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001.

Coustau, C., Kurtz, J., Moret, Y., 2016. A novel mechanism of immune memory unveiled at the invertebrate-parasite interface. Trends Parasitol. 32 (5), 353–355. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.005.

Couvreur, E., 1923. Celeb. 75ieme Anniv. Fond. Soc. Biol. 120.

Crayton, M.E., Powell, B.C., Vision, T.J., Giddings, M.C., 2006. Tracking the evolution of alternatively spliced exons within the Dscam family. BMC Evol. Biol. 6, 16.

Criscitiello, M.F., de Figueiredo, P., 2013. Fifty shades of immune defense. PLoS Pathog. 9 (2), e1003110 https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003110.

Currie, C.R., Scott, J.A., Summerbell, R.C., Malloch, D., 1999. Fungus growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. Nature 398, 701–704.

Dale, C., Plague, G.R., Wang, B., Ochman, H., Moran, N.A., 2002. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 12397–12402.

Dale, C., Jones, T., Pontes, M., 2005. Degenerative evolution and functional diversification of type-III secretion systems in the insect endosymbiont *Sodalis glossinidius*. Mol. Biol. Evol. 22, 758–766.

Danilova, N., 2006. The evolution of immune mechanisms. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 306 (6), 496–520. https://doi.org/10.1002/jez.b.21102.

Daukšte, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M.J., Krams, I., 2012. Senescence in immune priming and attractiveness in a beetle. J. Evol. Biol. 25 (7), 1298–1304. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02516.x.

De Bary, A., 1879. De la symbiose. Revue Inter Sci 3, 301–309.

Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M.E., et al., 2001. Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 6247–6252.

DeFilippo, J., Beck, G., 2018. Cytokines of invertebrate immunity. Reference Module in Life Sciences 1, 1–11. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.90751-9.

Degnan, S.M., 2015. The surprisingly complex immune gene repertoire of a simple sponge, exemplified by the NLR genes: a capacity for specificity? Dev. Comp. Immunol. 48 (2), 269–274. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.012.

Degnan, P.H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R.A., Moran, N.A., 2009. Hamiltonella defensa, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (22), 9063–9068. https://doi.org/10.1073/pnas.0900194106.

Detournay, O., Schnitzler, C.E., Poole, A., Weis, V.M., 2012. Regulation of cnidarian–dinoflagellate mutualisms: evidence that activation of a host TGFβ innate immune pathway promotes tolerance of the symbiont. Dev. Comp. Immunol. 38 (4), 525–537. https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.08.008.

Dhinaut, J., Chogne, M., Moret, Y., 2018. Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. J. Anim. Ecol. 87 (2), 448–463. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661. In press.

Dishaw, L.J., Giacomelli, S., Melillo, D., Zucchetti, I., Haire, R.N., Natale, L., Pinto, M.R., 2011. A role for variable region-containing chitin-binding proteins (VCBPs) in host gut-bacteria interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (40), 16747–16752. https://doi.org/10.1073/pnas.1109687108.

Dong, Y., Dimopoulos, G., 2009. *Anopheles* fibrinogen-related proteins provide expanded pattern recognition capacity against bacteria and malaria parasites. *J. Biol.* Chem. 284, 9835–9844.

Dong, Y., Taylor, H.E., Dimopoulos, G., 2006. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the Anopheles gambiae innate immune system. PLoS Biol. 4, e229.

Douglas, A.E., 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. 64, 409–434.

Douglas, A.E., 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. Funct. Ecol. 23, 38–47. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x.

Dubuffet, A., Zanchi, C., Boutet, G., Moreau, J., Teixeira, M., Moret, Y., 2015. Trans-generational immune priming protects the eggs only against gram-positive bacteria in the mealworm beetle. PLoS Pathog. 11 (10), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005178.

Dunbar, H.E., Wilson, A.C., Ferguson, N.R., Moran, N.A.(, 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. PLoS Biol. 5 https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050096.

Dzik, J.M., 2010. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. ACTA ABP Biochimica Polonica 57 (4), 443–466.

Eguileor, M., Ottaviani, Enzo, 2011. The central role of immunity in the symbiotic event referred as parasitism. Invertebr. Surviv. J.

Eleftherianos, I., Marokhazi, J., Millichap, P.J., Hodgkinson, A.J., Sriboonlert, A., ffrench-Constant, R.H., et al., 2006. Prior infection *of Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. Insect Biochem. Mol. Biol. 36 (6), 517–525. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.001.

Eleftherianos, I., Atri, J., Accetta, J., Castillo, J.C., 2013. Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? Front. Physiol. 4, 1–10. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046. MAR(March).

Epis, S., Varotto-Boccazzi, I., Crotti, E., Damiani, C., Giovati, L., Mandrioli, M., Bandi, C., 2020. Chimeric symbionts expressing a Wolbachia protein stimulate mosquito immunity and inhibit filarial parasite development. Communications Biology 3 (1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0835-2.

Eppler, M.E., Grimes, E.A., Hedden, E.S., Hodoameda, P., Jamie, M., 2020. Host Microbiota Influences Interactions between Hosts and Pathogens, vols. 1–25.

Fallon, J.P., Troy, N., Kavanagh, K., 2011. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. Virulence 2 (5), 413–421. https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17811.

Faria, V.G., Martins, N.E., Schlötterer, C., Sucena, É., 2018. Readapting to DCV infection without *Wolbachia*: frequency changes of *Drosophila* antiviral alleles can replace endosymbiont protection. Genome Biology and Evolution 10 (7), 1783–1791. https://doi.org/10.1093/gbe/evy137.

Faulhaber, L.M., Karp, R.D., 1991. A diphasic immune response against injected bacteria in the American cockroach. Dev. Comp. Immunol. 15 (Suppl. 1), 378–381. https://doi.org/10.1016/0145-305X(91)90227-.

Feldhaar, H., 2011. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. Ecol. Entomol. 36 (5), 533–543. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x.
Feldhaar, H., Gross, R., 2008. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. Microb. Infect. 10 (9), 1082–1088. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010.
Figueiredo, A.R.T., Kramer, J., 2020. Cooperation and conflict within the microbiota and their effects on animal hosts. Frontiers in Ecology and Evolution 8 (May), 1–15. https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00132.
Finlay, B.B., McFadden, G., 2006. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. Cell 124 (4), 767–782. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.034.
Fisher, R.M., Henry, L.M., Cornwallis, C.K., Kiers, E.T., West, S.A., 2017. The evolution of host-symbiont dependence. Nat. Commun. 8 (May), 1–8. https://doi.org/10.1038/ncomms15973.
Ford, S.A., Williams, D., Paterson, S., King, K.C., 2017. Co-evolutionary dynamics between a defensive microbe and a pathogen driven by fluctuating selection. Mol. Ecol. 26, 1778–1789.
Frank, A.B., 1877. Uber die biologischen Verhältnisse des Thallus eineger Krustenflechnten. Beitr Biol. Pflanz. 2, 123–200.
Fu, L.-L., Li, T.-P., Wang, Y., 2016. Potential role of LvDscam in specific immune response of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus by oral delivery of VP28 using Bacillus subtilis. Aquacult. Res. 47, 2068–2079. https://doi.org/10.1111/are.12661.
Fugmann, S.D., 2018. Invertebrate adaptive immunology. Reference Module in Life Sciences (June), 1–8. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20729-2.
Futo, M., Armitage, S.A.O., Kurtz, J., 2016. Microbiota plays a role in oral immune priming in *Tribolium castaneum*. Front. Microbiol. 6 (JAN), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01383.
Gegner, J., Baudach, A., Mukherjee, K., Halitschke, R., Vogel, H., Vilcinskas, A., 2019. Epigenetic mechanisms are involved in sex-specific trans-generational immune priming in the lepidopteran model host *Manduca sexta*. Front. Physiol. 10 (MAR), 1–13. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00137.
Geoghegan, V., Stainton, K., Rainey, S.M., Ant, T.H., Dowle, A.A., Larson, T., Hester, S., Charles, P.D., Thomas, B., Sinkins, S.P., 2017. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in *Wolbachia*-infected Aedes aegypti cells. Nat. Commun. 8 (1), 526. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8.
Gerardo, N.M., Parker, B.J., 2014. Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: an ecological and evolutionary framework. Current Opinion in Insect Science 4 (1), 8–14. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.002.
Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, M., Vos, M. De, et al., 2010. Immunity and other defenses in pea aphids. Genome Biol. 11 (R21), 1–17.
Gerardo, N.M., Hoang, K.L., Stoy, K.S., 2020. Evolution of animal immunity in the light of beneficial symbioses: host immune evolution and symbiosis. Phil. Trans. Biol. Sci. 375 (1808) https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0601rstb20190601.
Gest, H., 2004. The discovery of microorganisms by robert hooke and antoni van Leeuwenhoek, fellows of the royal society. Notes and Records of the Royal Society of London 58 (2), 187–201. http://www.jstor.org/stable/4142050.
Gilbert, S.F., Sapp, J., Tauber, A.I., 2012. A symbiotic view of life: we have never been individuals. QRB (Q. Rev. Biol.) 87 (4), 325–341. https://doi.org/10.1086/668166.
Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G.J.M., Van Der Meer, J.W.M., Conrath, U., Netea, M.G., 2018. Innate immune memory: an evolutionary perspective. Immunol. Rev. 283 (1), 21–40. https://doi.org/10.1111/imr.12647.
Greenwood, J.M., Milutinović, B., Peuß, R., Behrens, S., Esser, D., Rosenstiel, P., Kurtz, J., 2017. Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. BMC Genom. 18 (1), 329. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3705-7.
Gross, R., Vavre, F., Heddi, A., Hurst, G.D.D., Zchori-Fein, E., Bourtzis, K., 2009. Immunity and symbiosis. Mol. Microbiol. 73 (5), 751–759. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06820.x.
Grubbs, K.J., May, D.S., Sardina, J.A., Dermenjian, R.K., Wyche, T.P., Pinto-Tomás, A.A., Currie, C.R., 2021. Pollen Streptomyces produce antibiotic that inhibits the honey bee pathogen *Paenibacillus* larvae. Front. Microbiol. 12 (February) https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.632637.
Hafer, N., Vorburger, C., 2019. Diversity begets diversity: do parasites promote variation in protective symbionts? Current Opinion in Insect Science 32, 8–14. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.08.008.
Haine, E.R., 2008. Symbiont-mediated protection. Proc. Biol. Sci. 275 (1633), 353–361. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1211.
Hamilton, P.T., Perlman, S.J., 2013. Host defense via symbiosis in *Drosophila*. PLoS Pathog. 9 (12), 1–4. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003808.
Hanington, P.C., Zhang, S.M., 2011. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. Journal of Innate Immunity 3 (1), 17–27. https://doi.org/10.1159/000321882.
Hao, Z., Kasumba, I., Lehane, M.J., Gibson, W.C., Kwon, J., Aksoy, S., 2001. Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (22), 12648–12653. https://doi.org/10.1073/pnas.221363798.
Heddi, A., Zaidman-Rémy, A., 2018. Endosymbiosis as a source of immune innovation. Comptes Rendus Biol. 341 (5), 290–296. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2018.03.005.
Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. Science 322 (5902). https://doi.org/10.1126/science.1162418, 702–702.
Herren, J.K., Lemaitre, B., 2011. *Spiroplasma* and host immunity: activation of humoral immune responses increases endosymbiont load and susceptibility to certain Gram-negative bacterial pathogens in *Drosophila melanogaster*. Cell Microbiol. 13 (9), 1385–1396. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01627.x.
Hertel, L.A., Adema, C.M., Loker, E.S., 2005. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes Schistosoma mansoni and *Echinostoma paraensei*. Dev. Comp. Immunol. 29, 295–303.
Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., et al., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. Dev. Biol. 300, 349–365. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.065.
Hildemann, W.H., Raison, R.L., Cheung, G., Hull, C.J., Akaka, L., Okamoto, J., 1977. Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. Nature 270 (5634), 219–223. https://doi.org/10.1038/270219a0.
Hildemann, W.H., Johnson, I.S., Jokiel, P.L., 1979. Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges. Science 204 (4391), 420–422. https://doi.org/10.1126/science.441730.
Hinde, R., 1971. The control of the mycetome symbiotes of the aphids *Brevicoryne brassicae, Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*. J. Insect Physiol. 17, 1791–1800.
Horak, R.D., Leonard, S.P., Moran, N.A., 2020. Symbionts shape host innate immunity in honeybees. Proc. Biol. Sci. 287 (1933) https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1184.
Hueck, C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 379–433.
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), 3–10. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002043.
Hung, H.Y., Ng, T.H., Lin, J.H., Chiang, Y.A., Chuang, Y.C., Wang, H.C., 2013. Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. Fish Shellfish Immunol. 35, 1272–1281.
Hurst, G.D.D., Hutchence, K.J., 2010. Host defence: getting by with a little help from our friends. Curr. Biol. 20 (18), R806–R808. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.038.
Ishimori, N., Metalnikoff, S., 1924. Immunisation de la chenille de *Galleria mellonella* par des substances nonspecifiques. Compt. rend. 178, 2136–2138.
Jacobovitz, M.R., Rupp, S., Voss, P.A., et al., 2021. Dinoflagellate symbionts escape vomocytosis by host cell immune suppression. Nat Microbiol. https://doi.org/10.1038/s41564-021-00897-w.
Janeway, C.A., 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol. Today 13 (1), 11–16. https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90198-G.
Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., Strohm, E., 2005. Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. Curr. Biol. 15 (5), 475–479. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.084.
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. https://doi.org/10.1126/science.1177531.
Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Hampl, V., 2016. A eukaryote without a mitochondrial organelle. Curr. Biol. 26 (10), 1274–1284. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053.
Kelly, J., Kavanagh, K., 2011. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. J. Med. Microbiol. 60 (2), 189–196. https://doi.org/10.1099/jmm.0.025494-0.
Khan, I., Prakash, A., Agashe, D., 2016. Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. Ecology and Evolution 6 (21), 7847–7855. https://doi.org/10.1002/ece3.2532.
Khan, I., Prakash, A., Agashe, D., 2017. Experimental evolution of insect immune memory versus pathogen resistance. Proc. Biol. Sci. 284 (1869), 20171583. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1583.
Khan, I., Prakash, A., Agashe, D., 2018. Pathogen susceptibility and fitness costs explain variation in immune priming across natural populations of flour beetles. J. Anim. Ecol. 88 (9), 1332–1342. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13030.
Kim, M.S., Byun, M., Oh, B.H., 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from Drosophila melanogaster. Nat. Immunol. 4, 787–793.
Kim, J.K., Lee, J.B., Huh, Y.R., Jang, H.A., Kim, C., Yoo, J.W., Lee, B.L., 2015. *Burkholderia* gut symbionts enhance the innate immunity of host *Riptortus pedestris*. Dev. Comp. Immunol. 53 (1), 265–269. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.006.
King, K.C., Bonsall, M.B., 2017. The evolutionary and coevolutionary consequences of defensive microbes for host-parasite interactions. BMC Evol. Biol. 17 (1), 1–12. https://doi.org/10.1186/s12862-017-1030-z.
King, K.C., Brockhurst, M.A., Vasieva, O., Paterson, S., Betts, A., Ford, S.A., Hurst, G.D.D., 2016. Rapid evolution of microbe-mediated protection against pathogens in a worm host. ISME J. 10 (8), 1915–1924. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.259.
Klein, J., 1989. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? Scand. J. Immunol. 29 (5), 499–505. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1989.tb01152.x.
Kleino, A., Myllymäki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.-M., Oksanen, K., Ulvila, J., Rämet, M., 2008. Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. J. Immunol. 180 (8), 5413–5422. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5413.
Koch, H., Schmid-Hempel, P., 2012. Gut microbiota instead of host genotype drive the specificity in the interaction of a natural host-parasite system. Ecol. Lett. 15 (10), 1095–1103. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01831.x.
Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Gavory, F., Wincker, P., Mavingui, P., Vavre, F., 2012. Influence of *Wolbachia* on host gene expression in an obligatory symbiosis. BMC Microbiol. 12 (Suppl. 1), 1–16. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S7.
Kucuk, R.A., 2020. Gut bacteria in the holometabola: a review of obligate and facultative symbionts. J. Insect Sci. 20 (4), 1–12. https://doi.org/10.1093/JISESA/IEAA084.
Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. Trends Immunol. 26 (4), 186–192. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001.

Lachat, M., 2009. Impact de deux souches de *Wolbachia* sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes Armadillidium vulgare. Université de Poitiers, p. 167. Thèse de doctorat d'Etat.

Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pauletto, M., Segarra, A., Gourbal, B., Montagnani, C., 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Sci. Rep. 7 (1), 13143. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13564-0.

Lafont, M., Vergnes, A., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Haffner, P., Montagnani, C., 2020. A sustained immune response supports long-term antiviral immune priming in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. mBio 11 (2), 1–17. https://doi.org/10.1128/mBio.02777-19.

Lanz-Mendoza, H., Garduño, J.C., 2018. Insect innate immune memory. Advances in Comparative Immunology 193–211. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_9.

Le Clec'h, W., Braquart-Varnier, C., Raimond, M., Ferdy, J., Bouchon, D., Sicard, M., 2012. High virulence of *Wolbachia* after host switching: when autophagy hurts. PLoS Pathog. 8 (8), e1002844 https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002844.

Leonard, P.M., Adema, C.M., Zhang, S.-M., Loker, E.S., 2001. Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on the diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. Gene 269, 155–165. PubMed: 11376947.

Lhocine, N., Ribeiro, P.S., Buchon, N., Wepf, A., Wilson, R., Tenev, T., Leulier, F., 2008. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating *Drosophila* innate immune signaling. Cell Host Microbe 4 (2), 147–158. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.004.

Lin, Y.C., Chen, J.C., Morni, W.Z.W, Putra, D.F., Huang, C.L., et al., 2013. Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. PloS One 8 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069722.

Litman, G., Dishaw, L., Cannon, J., Haire, R., Rast, J., 2007. Alternative mechanisms of immune receptor diversity. Curr. Opin. Immunol. 19 (5), 526–534. https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.001.

Little, T.J., Kraaijeveld, A.R., 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. Trends Ecol. Evol. 19 (2), 58–60. https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011.

Little, T.J., Hultmark, D., Read, A.F., 2005. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. Nat. Immunol. 6, 651–654.

Login, F.H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., Rochat, D., Heddi, A., 2011. Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. Science 334, 362–365. https://doi.org/10.1126/science.1209728.

Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.-M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol. Rev. 198 (1), 10–24. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x.

López-Madrigal, S., Duarte, E.H., 2019. Titer regulation in arthropod-*Wolbachia* symbioses. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 366 (23), 1–30. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz232.

Maniloff, J., 1996. The minimal cell genome: "On being the right size. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10004–10006.

Mansfield, K.M., Gilmore, T.D., 2019. Innate immunity and cnidarian-Symbiodiniaceae mutualism. Dev. Comp. Immunol. 90, 199–209. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.09.020. July 2018.

Martinez, J., Ok, S., Smith, S., Snoeck, K., Day, J.P., Jiggins, F.M., 2015. Should symbionts be nice or selfish? Antiviral effects of *Wolbachia* are costly but reproductive Parasitism Is Not. PLoS Pathog. 11 (7), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005021.

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

Martins, N.E., Faria, V.G., Teixeira, L., Magalhães, S., Sucena, É., 2013. Host adaptation is contingent upon the infection route taken by pathogens. PLoS Pathog. 9 (9) https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003601.

Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Miura, T., Fukatsu, T., 2015. Ultrabithorax is essential for bacteriocyte development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (30), 9376–9381. https://doi.org/10.1073/pnas.1503371112.

Mazmanian, S.K., Cui, H.L., Tzianabos, A.O., Kasper, D.L., 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell 122 (1), 107–118. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007.

McLaren, M.R., Callahan, B.J., 2020. Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome: pathogen resistance by the microbiome. Phil. Trans. Biol. Sci. 375 (1808) https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0592rstb20190592.

Medina Gomez, H., Adame Rivas, G., Hernández-Quintero, A., González Hernández, A., Torres Guzmán, J.C., Mendoza, H.L., Contreras-Garduño, J., 2018. The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. Microb. Pathog. 118, 361–364. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.063.

Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., Boraschi, D., 2018. Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal. Front. Immunol. 9, 1915. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915.

Meriggi, N., Di Paola, M., Vitali, F., Rivero, D., Cappa, F., Turillazzi, F., Cavalieri, D., 2019. *Saccharomyces cerevisiae* induces immune enhancing and shapes gut microbiota in Social Wasps. Front. Microbiol. 10 (October), 1–14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02320.

Metalnikoff, F.S., Gaschen, H., 1921. Sur la rapidité d'immunisation chez la chenille de *Galleria mellonella*. Compt. rend. soc. biol. 85, 224–226.

Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M., et al., 2014. Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. Front. Zool. 11 (23) https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23.

Milutinović, B., Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. Semin. Immunol. 28 (4), 328–342. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004.

Mondotte, J.A., Gausson, V., Frangeul, L., Blanc, H., Lambrechts, L., Saleh, M.C., 2018. Immune priming and clearance of orally acquired RNA viruses in *Drosophila*. Nature Microbiology 3 (12), 1394–1403. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0265-9.

Mone, Y., Gourbal, B., Duval, D., Du Pasquier, L., Keiffer-Jaquinod, S., Mitta, G., 2010. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. PLoS Neglected Trop. Dis. 4, e813.

Moran, N.A., 2006. Symbiosis. Curr. Biol. 16 (20), 866–871. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.019.

Moran, N.A., Telang, A., 1998. Bacteriocyte-associated symbiotic of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. Bioscience 48 (4), 295–304. https://doi.org/10.2307/1313356.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., O'Neill, S.L., 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and *Plasmodium*. Cell 139 (7), 1268–1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042.

Moreno-García, M., Condé, R., Bello-Bedoy, R., Lanz-Mendoza, H., 2014. The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects. Infect. Genet. Evol. 24, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.010.

Moreno-García, M., Vargas, V., Ramírez-Bello, I., Hernández-Martínez, G., Lanz-Mendoza, H., 2015. Bacterial exposure at the larval stage induced sexual immune dimorphism and priming in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. PloS One 10 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133240.

Moret, Y., 2006. "Trans-generational immune priming": specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proc. Biol. Sci. 273 (1592), 1399–1405. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3465.

Moret, Y., Coustau, C., Braquart-Varnier, C., Gourbal, B., 2019. Immune priming and trans-generational protection from parasites. In: Encyclopedia of Animal Behavior. Elsevier, pp. 764–774. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90726-X.

Moret, Y., Siva-Jothy, M.T., 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. Proc. Biol. Sci. 270 (1532), 2475–2480. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511.

Mowlds, P., Barron, A., Kavanagh, K., 2008. Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. Microb. Infect. 10 (6), 628–634. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.02.011.

Netea, M.G., Quintin, J., Van Der Meer, J.W.M., 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. Cell Host Microbe 9 (5), 355–361. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006.

Netea, M.G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L.A.B., Schultze, J.L., 2019. Innate and adaptive immune Memory: an evolutionary continuum in the host's response to pathogens. Cell Host Microbe 25 (1), 13–26. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006.

Ng, T.H., Kurtz, J., 2020. Dscam in immunity: a question of diversity in insects and crustaceans. Dev. Comp. Immunol. 105, 103539. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103539.

Ng, T.H., Chiang, Y.A., Yeh, Y.C., Wang, H.C., 2014. Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. Dev. Comp. Immunol. 46 (2), 129–138. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.002.

Ng, T.H., Chiang, Y.A., Yeh, Y.C., Wang, H.C., 2015. Reprint of "Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. Dev. Comp. Immunol. 48 (2), 306–314. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.017.

Nguyen, P.L., van Baalen, M., 2020. On the difficult evolutionary transition from the free-living lifestyle to obligate symbiosis. PloS One 15 (7 July), 15–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235811.

Norouzitallab, P., Biswas, P., Baruah, K., Bossier, P., 2015. Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic artemia to a pathogenic *Vibrio campbellii*. Fish Shellfish Immunol. 42 (2), 426–429. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.029.

Nyholm, S.V., Graf, J., 2012. Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. Nat. Rev. Microbiol. 10 (12), 815–827. https://doi.org/10.1038/nrmicro2894.

Nyholm, S.V., Stewart, J.J., Ruby, E.G., McFall-Ngai, M.J., 2009. Recognition between symbiotic *Vibrio fischeri* and the haemocytes of *Euprymna scolopes*. Environ. Microbiol. 11 (2), 483–493. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01788.x.

Oliver, K.M., Moran, N.A., 2009. Defensive Symbionts in Aphids and Other Insects. Defensive Mutualism. In: White, J.F., Torres, M.S. (Eds.), in Microbial Symbiosis. Taylor & Francis, London.

Oliver, K.M., Perlman, S.J., 2020. Chapter Eight - toxin-mediated protection against natural enemies by insect defensive symbionts. In: Oliver, K.M., Russell, J.A. (Eds.), In Advances in Insect Physiology. Academic Press, Cambridge, pp. 277–316. https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2020.03.005.

Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., Hunter, M.S., 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 100 (4), 1803–1807.

Oliver, K.M., Campos, J., Moran, N.A., Hunter, M.S., 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. Proc. Biol. Sci. 275 (1632), 293–299. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1192.

Oliver, K.M., Smith, A.H., Russell, J.A., 2014. Defensive symbiosis in the real world - advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. Funct. Ecol. 28 (2), 341–355. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12133.

Onchuru, T.O., Kaltenpoth, M., 2019. Established cotton stainer gut bacterial mutualists evade regulation by host antimicrobial peptides. Appl. Environ. Microbiol. 85 (13), 1–14. https://doi.org/10.1128/AEM.00738-19.

Osborne, S.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., Johnson, K.N., 2012. Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and tissue tropism in

Drosophila simulans. Appl. Environ. Microbiol. 78 (19), 6922–6929. https://doi.org/10.1128/AEM.01727-12.
Paillot, A., 1920. L'immunité acquise chez les insectes. Compt. rend. soc. biol. 83, 278–280.
Paillot, A., 1933. L'infection chez les insectes (Trévoux).
Palmer, C.V., 2018. Immunity and the coral crisis. Communications Biology 1 (1), 1–7. https://doi.org/10.1038/s42003-018-0097-4.
Palmer-Young, E.C., Raffel, T.R., McFrederick, Q.S., 2019. pH-mediated inhibition of a bumble bee parasite by an intestinal symbiont. Parasitology 146 (3), 380–388. https://doi.org/10.1017/S0031182018001555.
Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., Xi, Z., 2012. *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am. 109 (1), E23–E31. https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108.
Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M.J., Lu, P., Xi, Z., 2018. The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. ISME J. 12 (1), 277–288. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.174.
Pérez-Brocal, V., Latorre, A., Moya, A., 2013. Symbionts and pathogens: what is the difference? Curr. Top. Microbiol. Immunol. 358, 215–243. https://doi.org/10.1007/82_2011_190.
Perru, O., 2010. Vrin. In: De la société à la symbiose, 1870-1930, une histoire des découvertes sur les associations dans le monde vivant, 2e édition, ume 1. 308, 2-910245-28-4. ?hal-00842130.
Pham, L.N., Dionne, M.S., Shirasu-Hiza, M., Schneider, D.S., 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. PLoS Pathog. 3 (3) https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026.
Pigeault, R., Garnier, R., Rivero, A., Gandon, S., 2016. Evolution of transgenerational immunity in invertebrates. Proc. Biol. Sci. 283 (1839) https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1136.
Pimentel, A.C., Cesar, C.S., Martins, M., Cogni, R., 2021. The antiviral effects of the symbiont bacteria *Wolbachia* in insects. Front. Immunol. 11 (January), 1–10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626329.
Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F.C., Olive, M.A., Allienne, J.F., Gourbal, B., 2016. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. PLoS Pathog. 12 (1), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361.
Pinto, S.B., Mariconti, M., Bazzocchi, C., Bandi, C., Sinkins, S.P., 2012. *Wolbachia* surface protein induces innate immune responses in mosquito cells. BMC Microbiol. 12 (Suppl. 1), S11. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S11.
Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A.J., Cotter, S.C., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2013. Integrating nutrition and immunology: a new frontier. J. Insect Physiol. 59 (2), 130–137. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.011.
Pope, E.C., Powell, A., Roberts, E.C., Shields, R.J., Wardle, R., Rowley, A.F., 2011. Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after "vaccination. PloS One 6 (6), 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020960.
Pradeu, T., 2010. What is an organism? An immunological answer. Hist. Philos. Life Sci. 32 (2–3), 247–267.
Pradeu, T., 2012. The Limits of the Self: Immunology and Biological Identity. Oxford University Press, Oxford; New York. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199775286.001.0001.
Prigot-Maurice, C., Cerqueira de Araujo, A., Durand, S., Laverré, T., Pigeault, R., Verdon, J., Bulet, P., Beltran-Bech, S., Braquart-Varnier, C., 2019. Survival capacity of the common woodlouse *Armadillidium vulgare* is improved with a second infection of *Salmonella enterica*. J. Invertebr. Pathol. 168 https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278, 107278.
Prigot-Maurice, C., de Cerqueira De Araujo, A., Beltran-Bech, S., Braquart-Varnier, C., 2020. Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between Armadillidium vulgare and Salmonella. J. Evol. Biol. 34 (2), 256–269. https://doi.org/10.1111/jeb.13721.
Quigley, K.M., Alvarez Roa, C., Beltran, V.H., Leggat, B., Willis, B.L., 2021. Experimental evolution of the coral algal endosymbiont, *Cladocopium goreaui*: lessons learnt across a decade of stress experiments to enhance coral heat tolerance. Restor. Ecol. 29 (3), 1–11. https://doi.org/10.1111/rec.13342.
Rancès, E., Ye, Y.H., Woolfit, M., McGraw, E.A., O'Neill, S.L., 2012. The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated Dengue interference. PLoS Pathog. 8 (2), e1002548 https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548.
Rast, J.P., Smith, L.C., LozaColl, M., Hibino, T., Litman, G.W., 2006. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. Science 314, 952–956. https://doi.org/10.1126/science.1134301.
Ratzka, C., Gross, R., Feldhaar, H., 2012. Endosymbiont tolerance and control within insect hosts. Insects 3 (2), 553–572. https://doi.org/10.3390/insects3020553.
Read, A.F., Graham, A.L., Råberg, L., 2008. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control? PLoS Biol. 6 (12), 2638–2641. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000004.
Reynolds, S., Rolff, J., 2008. Immune function keeps endosymbionts under control. J. Biol. 7 (8), 28. https://doi.org/10.1186/jbiol88.
Rimer, J., Cohen, I.R., Friedman, N., 2014. Do all creatures possess an acquired immune system of some sort? Bioessays 36 (3), 273–281. https://doi.org/10.1002/bies.201300124.
Rio, R.V.M., Attardo, G.M., Weiss, B.L., 2016. Grandeur Alliances: symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy. Trends Parasitol. 32 (9), 739–749. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.05.002.
Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves, L.C., Dixit, R., Barillas-Mury, C., 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. Science 329 (5997), 1353–1355. https://doi.org/10.1126/science.1190689.
Rolff, J., Reynolds, S., 2009. Insect Infection and Immunity. Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199551354.001.0001.
Ronai, I., Greslehner, G.P., Boem, F., Carlisle, J., Stencel, A., Suárez, J., Zacks, O., 2020. "Microbiota, symbiosis and individuality summer school" meeting report. Microbiome 8 (1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00898-7.
Rongvaux, A., 2018. Innate immunity and tolerance toward mitochondria. Mitochondrion 41 (October 2017), 14–20. https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.10.007.
Roth, O., Kurtz, J., 2009. Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: isopoda). Dev. Comp. Immunol. 33 (11), 1151–1155. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.04.005.
Roth, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Kurtz, J., 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Proc. Biol. Sci. 276 (1654), 145–151. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1157.
Rosengaus, R.B., Malak, T., Mackintosh, C., 2013. Immune-priming in ant larvae: social immunity does not undermine individual immunity. Biol. Lett. 9 (6) https://doi.org/10.1098/rsbl.2013.0563.
Roth, O., Beemelmanns, A., Barribeau, S.M., Sadd, B.M., 2018. Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution. Heredity 121 (3), 225–238. https://doi.org/10.1038/s41437-018-0101-2.
Sachs, J.L., Skophammer, R.G., Regus, J.U., 2011. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (Suppl. 2), 10800–10807. https://doi.org/10.1073/pnas.1100304108.
Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. Curr. Biol. 16 (12), 1206–1210. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047.
Sanders, D., Kehoe, R., van Veen, F.F., McLean, A., Godfray, H.C., Dicke, M., Gols, R., Frago, E., 2016. Defensive insect symbiont leads to cascading extinctions and community collapse. Ecol. Lett. 19 (7), 789–799. https://doi.org/10.1111/ele.12616.
Scarborough, C.L., 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. Science 310 (5755). https://doi.org/10.1126/science.1120180, 1781–1781.
Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50 (1), 529–551. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420.
Serrato-Salas, J., Izquierdo-Sánchez, J., Argüello, M., Conde, R., Alvarado-Delgado, A., Lanz-Mendoza, H., 2018. *Aedes aegypti* antiviral adaptive response against DENV-2. Dev. Comp. Immunol. 84, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.01.022.
Sicard, M., Ferdy, J.B., Pagès, S., Le Brun, N., Godelle, B., Boemare, N., Moulia, C., 2004. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). J Evol Biol. Sep 17 (5), 985–993. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00748.x. PMID: 15312071.
Simon, J.C., Boutin, S., Tsuchida, T., Koga, R., Gallic, J.F., Frantz, A., Fukatsu, T., 2011. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. PloS One 6 (7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021831.
Sodergren, E., Weinstock, G.M., Davidson, E.H., et al., 2006. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Science 941–952. https://doi.org/10.1126/science.1133609.
Sullivan, J., Cheng, T., Howland, K., 1985. Studies on parasitic castration: castration of Ilyanassa obsoleta (Mollusca: gastropoda) by several marine trematodes. Trans. Am. Microsc. Soc. 104 (2), 154–171. https://doi.org/10.2307/3226423.
Tassetto, M., Kunitomi, M., Andino, R., 2017. Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-Based adaptive antiviral response in *Drosophila*. Cell 169 (2), 314–325. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.033 e13.
Taszłow, P., Vertyporokh, L., Wojda, I., 2017. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 149, 87–96. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.008.
Tate, A.T., Rudolf, V.H.W., 2012. Impact of life stage specific immune priming on invertebrate disease dynamics. Oikos 121 (7), 1083–1092. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19725.x.
Teixeira, L., Ferreira, Á., Ashburner, M., 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. PLoS Biol. 6 (12), e1000002 https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002.
Tetreau, G., Pinaud, S., Portet, A., Galinier, R., Gourbal, B., Duval, D., 2017. Specific pathogen recognition by multiple innate immune sensors in an invertebrate. Front. Immunol. 8 (OCT), 1249. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01249.
Tidbury, H.J., Best, A., Boots, M., 2012. The epidemiological consequences of immune priming. Proc. Biol. Sci. 279 (1746), 4505–4512. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1841.
Toh, H., Weiss, B.L., Perkin, S.A.H., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M., Aksoy, S., 2006. Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. Genome Res. 16 (2), 149–156. https://doi.org/10.1101/gr.4106106.
Trappeniers, K., Matetovici, I., Van Den Abbeele, J., De Vooght, L., 2019. The tsetse fly displays an attenuated immune response to its secondary symbiont, *Sodalis glossinidius*. Front. Microbiol. 10 (July), 1–20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01650.
Travis, J., 2009. On the origin of the immune system. Science 324 (5927), 580–582. https://doi.org/10.1126/science.324_580.
Van Arnam, E.B., Currie, C.R., Clardy, J., 2018. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. Chem. Soc. Rev. 47 (5), 1638–1651. https://doi.org/10.1039/c7cs00340d.
Vorburger, C., Gouskov, A., 2011. Only helpful when required: a longevity cost of harbouring defensive symbionts. J. Evol. Biol. 24 (7), 1611–1617. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02292.x.

Vorburger, C., Perlman, S.J., 2018. The role of defensive symbionts in host–parasite coevolution. Biol. Rev. 93 (4), 1747–1764. https://doi.org/10.1111/brv.12417.
Wagner, R.R., 1961. Acquired resistance to bacterial infection in insects. Bacteriol. Rev. 25 (38), 100–110. https://doi.org/10.1128/mmbr.25.2.100-110.1961.
Wang, J., Aksoy, S., 2012. PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse's offspring. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (26), 10552–10557. https://doi.org/10.1073/pnas.1116431109.
Wang, J., Wu, Y., Yang, G., Aksoy, S., 2009. Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106 (29), 12133–12138. https://doi.org/10.1073/pnas.0901226106.
Watson, F.L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., Schmucker, D., 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309, 1874–1878.
Watthanasurorot, A., Jiravanichpaisal, P., Liu, H., Söderhäll, I., Söderhäll, K., 2011. Bacteria-induced Dscam isoforms of the Crustacean, Pacifastacus leniusculus. PLoS Pathog. 7, e1002062.
Weiss, B.L., Wu, Y., Schwank, J.J., Tolwinski, N.S., Aksoy, S., 2008. An insect symbiosis is influenced by bacterium-specific polymorphisms in outer membrane protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 15088–15093.
Weiss, B.L., Wang, J., Aksoy, S., 2011. Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. PLoS Biol. 9 (5) https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000619.
Weiss, B.L., Maltz, M., Aksoy, S., 2012. Obligate symbionts activate immune system development in the tsetse fly. J. Immunol. 188 (7), 3395–3403. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103691.
Wernegreen, J.J., 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. Nat. Rev. Genet. 3, 850–861.
Werren, J., Baldo, L., Clark, M., 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. Nat. Rev. Microbiol. 6, 741–751. https://doi.org/10.1038/nrmicro1969.
Wojda, I., Jakubowicz, T., 2007. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 53 (11), 1134–1144. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.003.
Wu, G., Zhao, Z., Liu, C., Qiu, L., 2014. Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. J. Econ. Entomol. 107 (2), 559–569. https://doi.org/10.1603/EC13455.
Wu, G., Li, M., Liu, Y., Ding, Y., Yi, Y., 2015a. The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. J. Insect Physiol. 81, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.004.
Wu, G., Yi, Y., Lv, Y., Li, M., Wang, J., Qiu, L., 2015b. The lipopolysaccharide (LPS) of *Photorhabdus luminescens* TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in *Galleria mellonella* larvae. J. Invertebr. Pathol. 127, 63–72. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.007.
Ye, Y., Woolfit, M., Rancès, E., O'Neill, S., McGraw, E., 2013. *Wolbachia*-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Trop. Dis. 7 (8) https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002362.
Yi, Y., Xu, H., Li, M., Wu, G., 2019. RNA-seq profiles of putative genes involved in specific immune priming in *Bombyx mori* haemocytes. Infect. Genet. Evol. 74 (March) https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103921.
Yu, H.H., Yang, J.S., Wang, J., Huang, Y., Lee, T., 2009. Endodomain diversity in the *Drosophila* Dscam and its roles in neuronal morphogenesis. J. Neurosci. 29, 1904–1914.
Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D., Lemaitre, B., 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity 24 (4), 463–473. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.012.
Zernoff, V., 1934. Influence des différentes concentrations des vaccins dans l'immunisation de *Galleria mellonella*. Compt. rend. soc. biol. 116, 304.
Zhang, S.M., Loker, E.S., 2003. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Dev. Comp. Immunol. 27, 175–187 [PubMed: 12590969].
Zhang, Y.K., Ding, X.L., Rong, X., Hong, X.Y., 2015. How do hosts react to endosymbionts? A new insight into the molecular mechanisms underlying the Wolbachia-host association. Insect Mol. Biol. 24 (1), 1–12. https://doi.org/10.1111/imb.12128.
Zhang, F., Li, Q., Chen, X., Huo, Y., Guo, H., Song, Z., Fang, R., 2016. Roles of the *Laodelphax striatellus* Down syndrome cell adhesion molecule in Rice stripe virus infection of its insect vector. Insect Mol. Biol. 25 (4), 413–421. https://doi.org/10.1111/imb.12226.
Zhang, Z.W., Cheng, J., Xu, F., Chen, Y.E., Du, J.B., Yuan, M., Zhu, F., Xu, X.C., Yuan, S., 2016. Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. IUBMB Life 63 (7), 560–565. https://doi.org/10.1002/iub.490, 2011 Jul.
Zhang, D., Wang, Y., He, K., Yang, Q., Gong, M., Ji, M., Chen, L., 2020. *Wolbachia* limits pathogen infections through induction of host innate immune responses. PloS One 15 (2), 1–19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226736.
Zhang, X., Zeng, X., Sun, Y., Wang, Y., Zhang, Z., 2020. Enhanced immune protection of Mud Crab *Scylla paramamosain* in response to the secondary challenge by *Vibrio parahaemolyticus*. Front. Immunol. 11 (October), 1–10. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.565958.
Zientz, E., Dandekar, T., Gross, R., 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68 (4), 745–770. https://doi.org/10.1128/mmbr.68.4.745-770.2004.
Zug R, Hammerstein P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts (2015). Biol. Rev. Camb. Phil. Soc. doi: 10.1111/brv.12098.
Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., Charles, H., 2013. Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. Ecol. Lett. 16 (2), 214–218. https://doi.org/10.1111/ele.12031.

II.3 – Discussion

II.3.a - Les mécanismes du priming immunitaire symbiotique sont-ils différents de ceux du priming immunitaire pathogénique ?

Grâce à cette analyse bibliographique, nous mettons en évidence que le priming immunitaire pathogénique (*i.e.* induit par des pathogènes) et le priming immunitaire symbiotique (*i.e.* induit par des symbiotes protecteurs) sont tous deux majoritairement portés par une réponse immunitaire soutenue de l'hôte, lorsque le temps de coévolution entre les deux partenaires est faible (*i.e.* lorsque les symbiotes protecteurs sont non-natifs pour l'hôte, ou que les pathogènes n'infectent pas souvent les hôtes en conditions naturelles). Une fois cette réponse immunitaire soutenue établie, nous supposons que le priming immunitaire évolue ensuite vers deux stratégies différentes selon le type de microbes rencontré.

(1) Lorsque les hôtes "se souviennent" des pathogènes qu'ils rencontrent fréquemment, ils améliorent généralement leurs capacités immunitaires afin d'éliminer plus efficacement les pathogènes durant une infection ultérieure.

(2) En revanche, lorsque les hôtes "se souviennent" de symbiotes bénéfiques et/ou protecteurs qu'ils hébergent chroniquement, ils réduisent leur réponse immunitaire à leur égard *via* une tolérante accrue. Ces deux réponses immunitaires différentes provenant d'un mécanisme commun sont probablement influencées par les caractéristiques intrinsèques des microbes et les bénéfices/coûts qu'ils apportent à l'hôte (*e.g.* perte de virulence, compartimentalisation dans certains tissus de l'hôte, apports nutritionnels ou protection contre des pathogènes, *cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 2 et 3). La résistance accrue contre les pathogènes et la tolérance accrue contre les symbiotes protecteurs, requiert en revanche un degré de coévolution plus élevé.

La réponse immunitaire soutenue au début des interactions hôtes/microbes porte différents rôles. L'arrivée d'un symbiote protecteur ou d'un pathogène protège l'hôte contre des infections ultérieures par un/des pathogène(s) (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 3 et 4). Néanmoins, le priming immunitaire symbiotique est aussi exploité par les symbiotes protecteurs dans leurs interactions avec d'autres microbes. Lorsque les symbiotes protecteurs non-natifs stimulent un priming immunitaire soutenu, cela augmente l'élimination de pathogènes, qui sont pour eux de potentiels compétiteurs, sans que cela n'impacte la quantité de symbiotes protecteurs au sein de l'hôte (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 3 et 4).

De ces observations, nous mettons en évidence que le priming immunitaire est un mécanisme commun, portant des rôles distincts, à la fois impliqués dans les interactions hôtes/pathogènes, hôtes/symbiotes protecteurs mais aussi symbiotes protecteurs/pathogènes à l'intérieur du même hôte (Fig. 49).

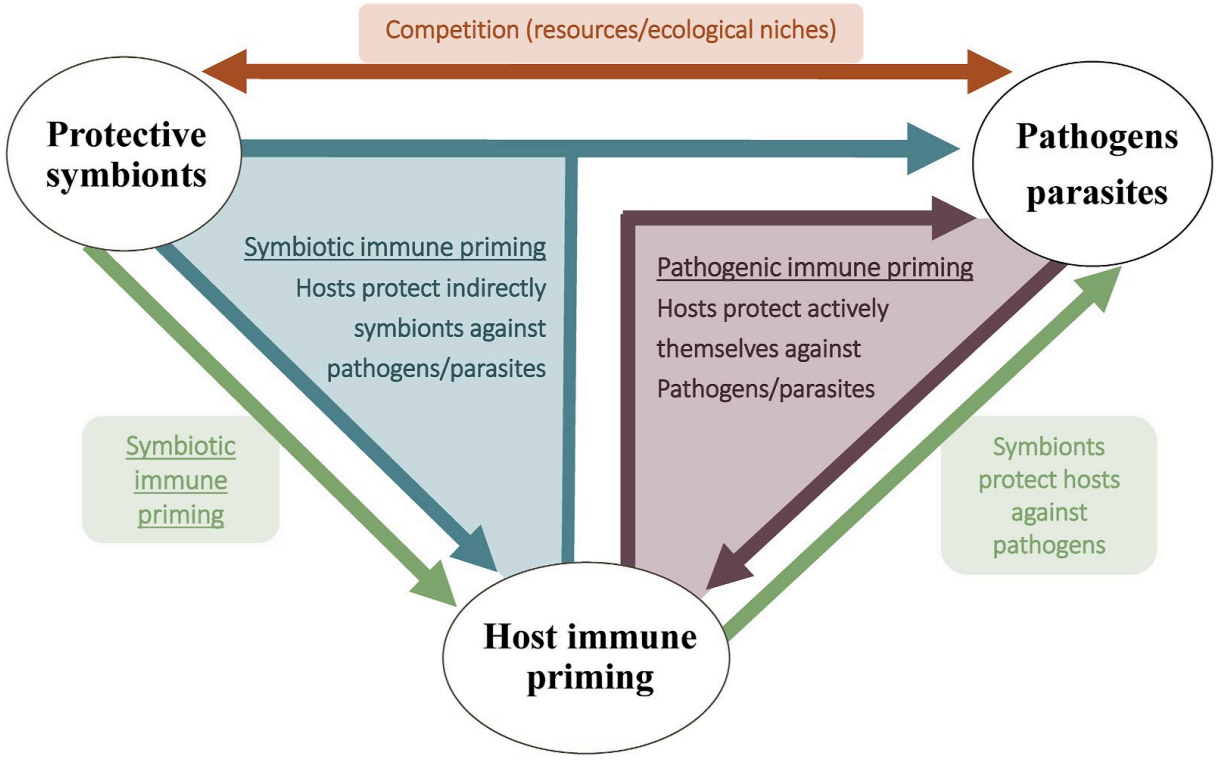


Figure 46. Schéma bilan des rôles fonctionnels du priming immunitaire chez les invertébrés. Flèches et encadré bleus : les symbiotes protecteurs déclenchent un priming immunitaire chez l'hôte (réponse immunitaire soutenue) qui protège indirectement les symbiotes contre les compétiteurs microbiens (pathogènes/parasites de l'hôte). Flèches vertes : les symbiotes protecteurs déclenchent un priming immunitaire qui protège l'hôte contre les pathogènes/parasites. Flèches et encadré violets : les pathogènes/parasites déclenchent un priming immunitaire qui protège l'hôte contre les mêmes – ou différents – pathogènes/parasites. Flèche et encadré oranges : les symbiotes et les pathogènes/parasites sont directement en compétition pour la niche écologique au sein du même hôte. Schéma tiré de l'article Prigot-Maurice et al., 2021b.

II.3.b – Existe-t-il des interactions/interférences entre les primings immunitaires symbiotique et pathogénique au sein d'un même hôte ?

En s'appuyant sur les études testant le priming immunitaire pathogénique en présence ou l'absence de symbiotes protecteurs ou de microbiotes (*cf.* Table 3 de Prigot-Maurice et al., 2022), nous observons que les primings immunitaires pathogénique et symbiotique peuvent s'exprimer simultanément et interférer entre eux au sein du même hôte. Cependant, il semble que deux conditions doivent être respectées pour qu'ils interfèrent entre eux :

(1) il faut que les symbiotes protecteurs et les pathogènes soient localisés dans les mêmes tissus/organes au sein du même l'hôte et déclenchent des primings immunitaires au même moment. Si ce n'est pas le cas, les primings immunitaires symbiotique et pathogénique semblent alors indépendants (Rodrigues et al., 2010 ; Contreras-Garduño et al., 2014).

(2) il faut que les symbiotes protecteurs et les pathogènes activent les mêmes voies de signalisation immunitaire au sein de l'hôte, notamment lorsque ces microbes partagent des caractéristiques biologiques similaires (*e.g.* mode de vie intracellulaire, même type de MAMPs ; Prigot-Maurice et al., 2021). Si les mêmes voies de signalisation et les mêmes effecteurs immunitaires sont activés/produits en réponse aux symbiotes protecteurs et aux pathogènes, alors la protection résultante n'est pas surexprimée, mais atteint un seuil maximal de protection, comme nous l'avons probablement observé dans la partie précédente avec *A. vulgare*, *Wolbachia* et *S. enterica* (*i.e.* les jeunes femelles symbiotiques primo-injectées avec *S. enterica* n'ont pas une survie plus importante que les jeunes femelles symbiotiques contrôles ; Prigot-Maurice et al., 2021). Si les pathogènes et les symbiotes protecteurs activent des voies de signalisation différente, les primings immunitaires semblent complémentaires dans la protection qu'ils apportent à l'hôte (Rodrigues et al., 2010 ; Contreras-Garduño et al., 2014).

Compte tenu de ces interférences possibles, le priming immunitaire symbiotique pourrait influencer les pressions de sélection exercées sur le priming immunitaire pathogénique, comme nous le stipulons dans la première partie de ce chapitre (Prigot-Maurice et al., 2021).

II.3.c – Quelles sont les conséquences évolutives sur le priming immunitaire pathogénique lorsqu'un priming immunitaire symbiotique est déjà mis en place à l'intérieur du même hôte ?

Les conséquences évolutives résultantes de l'interférence entre le priming immunitaire symbiotique et pathogénique dépendent du degré de coévolution entre les partenaires et de la balance coûts/bénéfices associée à l'expression de chaque priming immunitaire. Dans la plupart des cas, le priming immunitaire symbiotique se déclenche lorsqu'un symbiote protecteur non-natif arrive soudainement dans un hôte non-natif (*e.g.* une souche de *Wolbachia* injectée dans un hôte qui ne l'a jamais rencontré ; *cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 3). Certes, ce priming immunitaire symbiotique protège l'hôte contre les

pathogènes, mais il demeure chroniquement coûteux en termes d'énergie, et peux donc entraîner des conséquences néfastes sur les traits d'histoire de vie de l'hôte (*e.g.* croissance, reproduction, la survie etc). Par exemple, *Wolbachia* et *H. defensa* protège respectivement *D. melanogaster* et *A. fabae* contre des virus et des guêpes parasitoïdes mais leurs présences permanentes réduisent la durée de vie de leur hôte (Chrostek et al., 2013 ; Martinez et al., 2015). Ainsi, si la présence permanente de symbiotes protecteurs engendre des coûts trop importants pour l'hôte, alors le priming immunitaire pathogénique devrait être favorisé au dépend du priming immunitaire symbiotique.

En revanche, les coûts du priming immunitaire symbiotique peuvent être contrebalancés lorsque les hôtes sont régulièrement infectés par des pathogènes (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 4). Si les hôtes hébergent des symbiotes protecteurs qui les protègent à chaque infection par des pathogènes, la sélection ne favorisait donc pas un priming immunitaire pathogénique, puisque les symbiotes apportent déjà une protection (Prigot-Maurice et al., 2022). La présence de symbiotes protecteurs peut aller jusqu'à influencer la sélection des mécanismes de résistance ou de tolérance des hôtes vis-à-vis des pathogènes. Pour citer un exemple extrême, la plupart des espèces de pucerons ont un système immunitaire très limité, que ce soit en termes de gènes ou d'effecteurs immunitaires (Gerardo et al., 2010). Plusieurs biologistes supposent que la réduction de leurs capacités immunitaires est la conséquence de symbioses défensives médiées par *Regiella insecticola* et *Hamiltonella defensa*, deux symbiotes protecteurs obligatoires et facultatifs, qu'ils hébergent naturellement (Oliver et al., 2003 ; Scarborough, 2005 ; Lukasik et al., 2013). De manière intéressante, Braak et al. (2013) n'ont pas observé de priming immunitaire pathogénique lorsque *A. pisum* héberge naturellement, ou non, ces symbiotes protecteurs. Cette étude met en évidence que les symbiotes protecteurs peuvent influencer les capacités immunitaires de leur hôte mais aussi la sélection du priming immunitaire pathogénique.

Aussi, l'altération des populations de symbiotes commensaux ou protecteurs par les pathogènes peut être un élément déclencheur de priming immunitaire (Rodrigues et al., 2010 ; Koch & Schmid-Hempel, 2012) et les symbiotes protecteurs peuvent parfois même exprimer un priming immunitaire par eux même, indépendamment de celui de l'hôte. Chez *C. elegans* par exemple, une symbiose défensive émerge en seulement 5 générations lorsque les individus sont exposés simultanément à deux bactéries pathogènes : *Enterococcus faecalis* et son compétiteur, plus virulent, *Staphylococcus aureus* (King et al., 2016). La protection médiée par cette symbiose défensive provient d'une production plus importante de composés antimicrobiens de la part d'*E. faecalis* contre *S. aureus,* lorsque ces bactéries

ont été régulièrement mises en contact au sein des mêmes hôtes durant plusieurs générations (King et al., 2016). Cette étude suggère que la coévolution entre les microbes peut protéger l'hôte contre les pathogènes de manière adaptative, sans forcément impliquer l'immunité de l'hôte (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, partie 4).

II.4 – Conclusion

Dans l'ensemble, notre article de synthèse met en lumière que les symbiotes protecteurs peuvent influencer l'expression et la sélection du priming immunitaire pathogénique chez les invertébrés, et vice-versa. Que ce soit d'un point de vue mécanistique ou évolutif, la présence de symbiotes protecteurs pourrait en partie expliquer pourquoi le priming immunitaire pathogénique est si hétérogène au sein des individus, des populations et des espèces d'invertébrés. D'après Baumann et Moran (1997), les infections répétées par des symbiotes non pathogènes conduisent à des associations symbiotiques bénéfiques et protectrices. Or nous avons précédemment vu (*cf.* Introduction, partie II) que des infections répétées par des pathogènes conduisent aussi à la sélection de priming immunitaire pathogénique (Moret et al., 2019). Si les infections répétées sont une force de sélection pour le priming immunitaire symbiotique et pour le priming immunitaire pathogénique, alors l'étude du priming immunitaire symbiotique pourrait permettre de mieux comprendre comment et pourquoi le priming immunitaire pathogénique émerge et évolue (*cf.* Prigot-Maurice et al., 2022, conclusion).

Nous sommes cependant conscients que l'étude du priming immunitaire symbiotique et pathogénique fait face à certaines impasses analytiques. Les symbiotes protecteurs protègent les hôtes des pathogènes en induisant parfois une réponse immunitaire soutenue de l'hôte, mais ils sont aussi capables de réduire la quantité de pathogènes *via* une compétition microbienne directe. Or, dans les faits, la distinction de ces deux processus n'est pas simple. De plus, même si le priming immunitaire symbiotique et la compétition microbienne étaient clairement distingués, il demeurerait impossible de généraliser l'effet des symbiotes protecteurs sur le priming immunitaire pathogénique sur l'ensemble des espèces invertébrées, puisque chaque relation hôte/symbiotes protecteurs/pathogènes est unique, et chaque mécanisme qui en résulte dépend du degré de coévolution entre les partenaires

SYNTHÈSE GÉNÉRALE



Photo : *A. vulgare,* la Ciotat, France. Crédit photo : Cybèle Prigot-Maurice

Prologue

Au cours de cette thèse, nous avons exploré le phénomène de priming immunitaire chez *A. vulgare,* d'un point de vue phénoménologique (amélioration de la survie des individus), mécanistique (concentration, viabilité et types d'hémocytes impliqués) et évolutif (coûts sur la reproduction). Nous avons également analysé l'effet de l'âge, du sexe et de la présence de *Wolbachia* sur l'expression de ce priming immunitaire et plus généralement, au travers de la littérature, l'influence que peuvent exercer les symbiotes protecteurs sur l'expression du priming immunitaire contre des pathogènes chez les invertébrés.

Cette synthèse générale dresse un bilan des résultats principaux que nous avons obtenus. Ce bilan est suivi de diverses perspectives nécessaires pour l'approfondissement de ce projet de recherche, ainsi que l'apport général de cette thèse dans la recherche scientifique.



Photos : Gauche : *A. vulgare*, Droite : *S. enterica*. Crédits Photos : Cybèle Prigot-Maurice.

I. BILAN DES RÉSULTATS PRINCIPAUX

Durant ces trois années de recherches, nous avons obtenu divers résultats sur le priming immunitaire d'*A. vulgare*. Les principaux résultats sont résumés en Figure 50.

Lorsque nous réalisons deux infections successives de *S. enterica* vivantes espacées de 7 jours, nous observons un priming immunitaire chez *A. vulgare*, que ce soit chez des femelles ou des mâles asymbiotiques, de 1 an ou de 2 ans (Fig. 50 ; Prigot-Maurice et al., 2019 ; Prigot-Maurice et al., 2021). Ce priming immunitaire améliore la survie des individus face à la seconde infection létale de *S. enterica* (Fig. 50). Ainsi, ces observations suggèrent que le priming immunitaire est une capacité ubiquiste chez *A. vulgare*, qui s'exprime quel que soit le sexe et l'âge d'individus exposés à des pathogènes. Même si les femelles âgées asymbiotiques présentent un déclin général de leur capacité de survie face à la seconde infection comparées aux jeunes femelles asymbiotiques (Prigot-Maurice et al., 2021), le maintien du priming immunitaire tend à montrer que ce processus apporte un avantage de survie sur toute la durée de vie des individus.

Cette amélioration de la survie n'est pas observée chez les femelles symbiotiques de 1 an hébergeant la bactérie endosymbiotique, parasite du sexe, *Wolbachia*. Puisque *Wolbachia* protège naturellement les femelles symbiotiques n'ayant pas reçu de première injection de *S. enterica* (Braquart-Varnier et al. 2015b ; Prigot-Maurice et al. 2021), nous pensons que la protection conférée par *Wolbachia* masque celle du priming immunitaire dressée contre *S. enterica* (Fig. 50). Quelque que soit le mécanisme sous-jacent de cette interférence (*i.e.* un priming immunitaire symbiotique et/ou une compétition microbienne entre *Wolbachia* et *S. enterica*), nos résultats illustrent que certaines caractéristiques intrinsèques aux individus, comme la présence de symbiotes protecteurs, pourraient expliquer pourquoi le priming immunitaire est si hétérogène entre les individus, les populations et les espèces d'invertébrés (*cf.* Chapitre II, partie II ; Prigot-Maurice et al., 2021, 2022).

Afin de mieux connaître les mécanismes permettant cette amélioration de survie, nous avons analysé les paramètres des hémocytes de jeunes femelles asymbiotiques durant le priming immunitaire. Lorsque ces dernières sont primo-injectées avec des *S. enterica* vivantes, nous observons 7 jours plus tard une concentration en hémocytes plus faible, mais ces hémocytes ont une viabilité plus élevée, juste avant la seconde injection (Prigot-Maurice et al., 2021). Notre hypothèse principale est que les hémocytes luttent et meurent contre *S.*

enterica (*i.e.* concentration plus faible) ce qui stimule une plus grande production de ces derniers (*i.e.* viabilité plus élevée ; Prigot-Maurice et al., 2021). Cependant, les *S. enterica* vivantes issues de la première injection étaient toujours présentes dans l'hémolymphe de ces femelles au moment de la seconde injection, nous empêchant de déterminer si ces changements de concentration et de viabilité des hémocytes sont le résultat d'un priming immunitaire, ou plutôt causés par l'infection persistante de *S. enterica*.

Pour s'affranchir de ce biais, nous avons utilisé des *S. enterica* inactivées lors de la première injection. Après avoir déterminé la dose ainsi que la méthode d'inactivation la plus appropriée (*cf.* Chapitre II, partie I), nous observons de nouveau de meilleures capacités de survie chez les jeunes femelles *A. vulgare*, lorsqu'elles sont exposées 7 jours plus tôt à des *S. enterica* inactivées. Même si nous n'avons pas quantifié la persistance des MAMPs des *S. enterica* inactivées dans l'hémolymphe des femelles, ce résultat met en évidence qu'un priming immunitaire peut se déclencher sans infection latente de bactéries vivantes. À la suite de cette expérience, nous avons analysé les proportions des différents types d'hémocytes (*i.e.* hémocytes granulaires, hyalins et semi-granulaires) ainsi que leurs paramètres (*i.e.* viabilité, taille et granulométrie des hémocytes), 48h et 6 jours après la première injection de *S. enterica* inactivées, puis 48h après l'injection létale de *S. enterica* vivantes. Nous observons que les hémocytes hyalins et semi-granulaires augmentent en proportion, avec une viabilité plus élevée, tandis que les hémocytes granulaires diminuent en proportion, avec une viabilité plus faible, et ce, de manière soutenue dans le temps (*cf.* Chapitre II, partie II ; Fig. 50).

Ainsi, le priming immunitaire des jeunes femelles *A. vulgare* est probablement médié par les hémocytes hyalins et semi-granulaires, qui portent probablement des capacités immunitaires mieux adaptées pour protéger les individus contre la seconde infection de *S. enterica* (*cf.* Chapitre II, partie II). Cependant, ce n'est pas parce que nous observons ces corrélations que le priming immunitaire d'*A. vulgare* repose exclusivement sur une réponse immunitaire soutenue durant 7 jours. Rien ne prouve que des productions humorales, ou les capacités de phagocytose des hémocytes par exemple, ne s'expriment pas de manière bimodale suivant la première puis la deuxième rencontre avec *S. enterica*. Chez *Anopheles* par exemple, les individus primo-injectés avec *P. berghei* présentent une augmentation de la proportion d'hémocytes granulaires de manière soutenue, mais la production de peptides antimicrobiens, quant à elle, est bimodale (Rodrigues et al., 2010 ; Contreras-Garduño et al., 2015).

Quel que soit les réponses immunitaires permettant le priming immunitaire, nous observons que dans le cas d'une double infection de *S. enterica* vivantes, les jeunes femelles *A. vulgare* de 1 an sont soumises à une infection persistante de cette bactérie, ce qui impacte les paramètres de leurs hémocytes pendant au moins 15 jours (Prigot-Maurice et al., 2019). Cette infection, sûrement coûteuse en énergie, devrait impacter la reproduction et l'état de sénescence des jeunes femelles *A. vulgare* (Prigot-Maurice, Depeux et al. 2021). Alors que l'utilisation des ressources énergétiques des femelles dans les réponses immunitaires devraient diminuer leur reproduction, nous n'observons pas d'impact significatif direct du priming immunitaire sur les capacités reproductives des femelles (*i.e.* nombre de portées, nombre de petits produits et temps nécessaire pour produire ces portées ; *cf.* Chapitre I, partie II). Cependant, le priming immunitaire a un effet sur le poids des femelles, ce qui impacte indirectement leur reproduction (Fig. 50). Lorsque nous soumettons les femelles à une double infection par *S. enterica*, les femelles les plus légères se reproduisent plus vite, avec moins de petits dans la première portée, mais ont plus de chances de produire une seconde portée, tandis que les femelles les plus lourdes se reproduisent moins vite, ont plus de petits, mais moins de chances de produire une seconde portée (comparées aux femelles les plus légères). De plus, la production d'une deuxième portée est corrélée à une augmentation de la taille des hémocytes, ce qui, d'après une étude récente (Depeux, et al., 2020b) semble révéler une plus grande sénescence cellulaire des femelles ayant eu deux portées, indépendamment du nombre d'infections par *S. enterica*. Les femelles les plus légères qui ont reçu une double infection par *S. enterica* seraient donc plus sénescentes que les grosses femelles qui ont reçu une double infection par *S. enterica*, au même titre que les femelles qui n'ont reçu qu'une seule infection par *S. enterica* ou qui n'ont jamais été infectées (*cf.* Chapitre I, partie II)

Nos résultats soulignent que le priming immunitaire induit différentes stratégies de reproduction des femelles selon leur poids et donc le « choix » qu'elles font d'investir ou non dans la croissance après une infection (*cf.* Chapitre I, partie II)). Même si les changements observés au niveau des hémocytes semblent coûteux en énergie, l'impact sur les traits reproductifs n'est pas si important, au moins sur les traits que nous avons observés (*cf.* Chapitre I, partie II). *A. vulgare* est un organisme détritivore et grégaire vivant plusieurs années dans un environnement humide, particulièrement riche en densité et diversité microbienne (*cf.* Introduction, partie III). Ainsi, les faibles coûts du priming immunitaire sur la reproduction de la génération concernée tendent à prouver l'importance du priming immunitaire dans les interactions avec les pathogènes chez cette espèce, même si des

expériences complémentaires sont nécessaires pour affirmer cette hypothèse (*cf.* Synthèse générale, partie II.3).

Jusqu'alors, qui dit « pathogène » dit « *S. enterica* ». Néanmoins, nous ne pouvons inférer les observations obtenues à partir de la relation spécifique *A. vulgare* / *S. enterica* à l'ensemble des réponses de type priming immunitaire chez *A. vulgare*. Afin de généraliser le priming immunitaire contre d'autres pathogènes chez cette espèce, nous avons réalisé des doubles infections homologues avec *L. ivanovii*, une bactérie pathogène à gram (+), ainsi qu'avec l'IIV-31, un virus pathogène naturel des isopodes terrestres (*cf.* Chapitre III, partie II et III). Bien que plusieurs modalités de primo-injections aient été testées (*L. ivanovii* ou IIV-31 vivants et inactivés, ou Poly(I :C)), nous n'observons pas de meilleure protection face à une seconde infection létale avec ces pathogènes (Fig. 50). Néanmoins, nous avons obtenu un autre résultat intéressant : les femelles *A. vulgare* ont de meilleures capacités de survie que les mâles face à l'IIV-31. Cette observation suggère que la physiologie des femelles confère une meilleure résistance et/ou une meilleure tolérance face à ce virus, ouvrant alors de nouvelles perspectives de recherche quant à la manière dont les individus luttent contre ce virus (*cf.* Perspective, partie III.a). Alors que nous n'avons pas observé de protection médiée par la présence de *Wolbachia* contre l'IIV-31, nous avons une deuxième fois montré que les femelles, qu'elles soient génétiques (*i.e.* asymbiotiques, sans *Wolbachia*) ou seulement phénotypiques (*i.e.* avec potentiellement un génome mâle, puisqu'elles hébergent *Wolbachia* qui féminisent les mâles en femelles), ont de meilleures capacités de survie que les mâles.

Comme tout projet de recherche, les investigations ne peuvent s'arrêter aux résultats que nous avons obtenus. Bien que nous ayons répondu à un certain nombre de questions au sujet du priming immunitaire d'*A. vulgare* (*cf.* Introduction, partie IV), de nombreux aspects du priming immunitaire d'*A. vulgare* sont à approfondir.

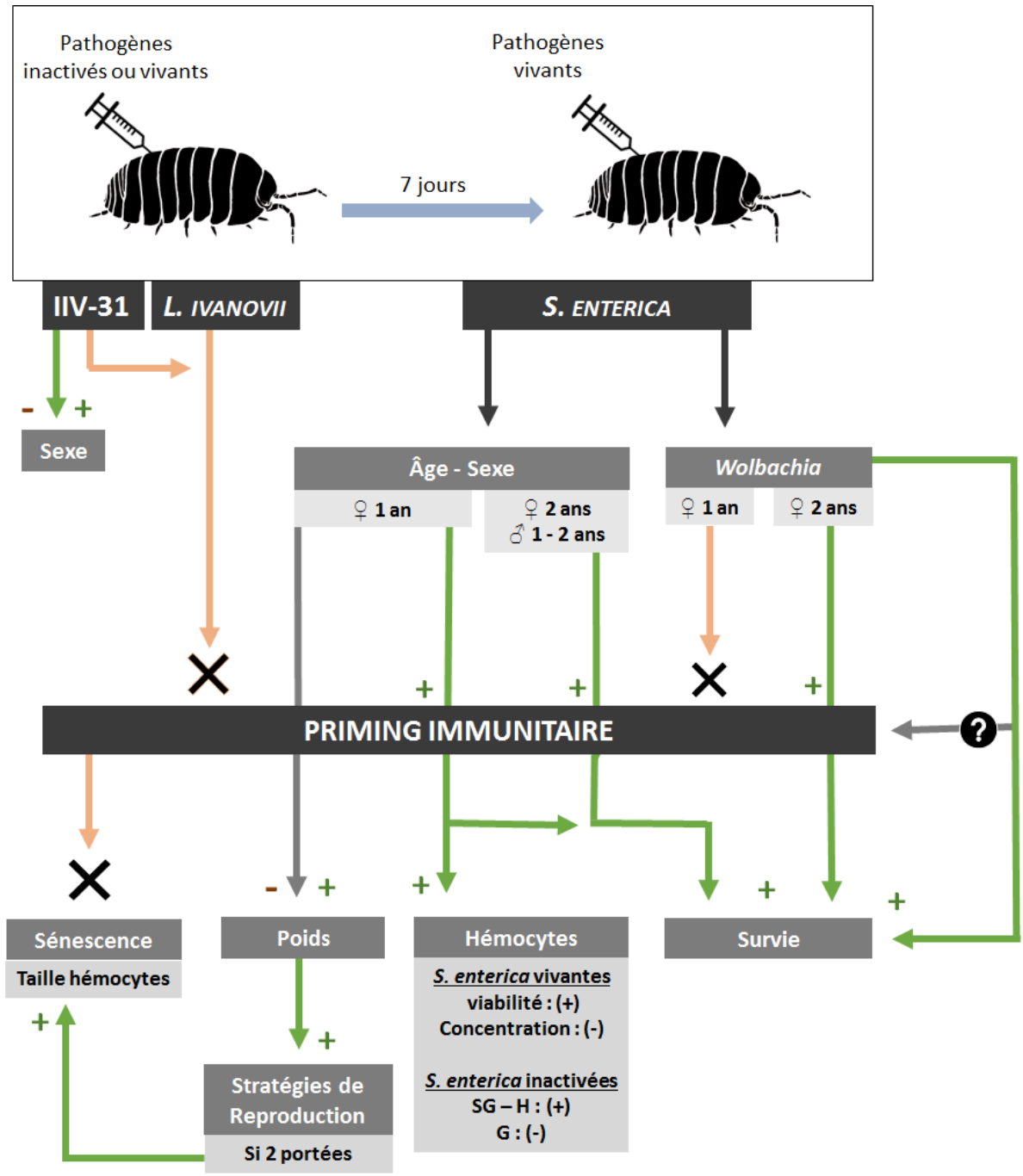


Figure 47. Schéma bilan des principaux résultats obtenus. Les flèches vertes indiquent un effet observé. Les flèches oranges suivies d'une croix indiquent que nous n'avons pas observé d'effet dans nos conditions expérimentales. La flèche grise et les symboles +/- indiquent un effet variable sur le facteur indiqué. Le point d'interrogation indique un effet que nous avons observé, mais que nous n'avons pas caractérisé.

II. PERSPECTIVES

II.1 - Compléter l'approche phénoménologique

Durant cette thèse, nous avons mis en évidence le phénomène de priming immunitaire chez *A. vulgare* contre *S. enterica.* Les individus primo-injectés avec des *S. enterica* vivantes ou inactivées ont de meilleures capacités de survie face à une seconde infection létale par cette même bactérie. Ce priming immunitaire est observé lorsque 7 jours séparent les deux infections. Dans les populations naturelles, 13% des individus *A. vulgare* atteignent 1 an, 14% d'entre eux vivent jusqu'à 2 ans, puis 10% de ces derniers jusqu'à 3 ans (Paris & Pitelka, 1962). *A. vulgare* est donc relativement exposé à des infections répétées sur l'ensemble de sa durée de vie (*cf.* Introduction, partie II et III). Ainsi, plusieurs expériences mériteraient d'être menées :

(1) Il nous faudrait tester la durabilité du priming immunitaire. Pour cela, il est envisageable d'utiliser des intervalles de temps plus longs (*e.g.* plusieurs mois) entre les infections de *S. enterica*, afin de déterminer si une première injection protège les individus de manière durable contre une seconde infection. La durabilité du priming immunitaire pourrait nous indiquer certaines modalités de sélection du priming immunitaire vis-à-vis des expositions aux pathogènes (Moret, 2003 ; Moret et al., 2019). En effet, si le priming immunitaire est maintenu durant plusieurs mois, cela nous indiquerait que les risques d'infections sont probablement éloignés, mais fréquents durant la vie de l'animal, ce qui justifierait son expression durable. Dans ce cas, il serait alors attendu qu'*A. vulgare* exprime un priming immunitaire avec une réponse immunitaire bimodale, puisque ce type de réponse immunitaire semble moins coûteux en énergie qu'une réponse immunitaire soutenue (Moret et al., 2019). En revanche, si le priming immunitaire ne s'exprime que sur de courtes périodes, cela indiquerait que les individus sont peu sujets aux infections et de ce fait, une réponse immunitaire soutenue sur un court laps de temps protégerait ponctuellement les individus lorsque cela est nécessaire (Moret, 2003). Cependant, il est important de garder à l'esprit que le priming immunitaire que nous avons mis en évidence concerne la relation spécifique entre *A. vulgare* et *S. enterica*. Nous ignorons quel est le degré de coévolution entre ces deux organismes (si tant est qu'il existe une coévolution), alors que ce paramètre est un facteur influençant la sélection du priming immunitaire (*cf.* Chapitre IV, partie II). Comme nous l'avons dit précédemment (*cf.* Chapitre III), il est primordial de tester le priming immunitaire

d'*A. vulgare*, ainsi que sa durabilité, face à d'autres pathogènes bactériens, viraux voire même fongiques.

(2) Afin de généraliser le priming immunitaire d'*A. vulgare* contre d'autres pathogènes, il serait pertinent de se rapprocher des conditions naturelles d'infections, *via* des infections par voies orales par exemple, plutôt que par injection. Chez les invertébrés, les réponses immunitaires peuvent être localisées dans des tissus et des organes spécifiques où sont présents les pathogènes (Rodrigues et al., 2010). Il faudrait alors analyser les réponses immunitaires au niveau du site d'infection (*e.g.* système digestif). Chez la drosophile par exemple, une résistance sélectionnée par des infections orales de *Pseudomonas entomophila* durant plusieurs générations ne protège pas les individus contre des infections systémiques (*i.e. via* l'hémolymphe) contre cette même bactérie (Martins et al., 2013).

Dans ce contexte de pathogènes naturels, même si nous n'avons pas mis en évidence de priming immunitaire chez *A. vulgare* contre l'IIV-31 (*cf.* Chapitre III, partie III), l'étude de cette interaction hôte/pathogène doit être approfondie. Alors que *A. vulgare* est capable de résister/tolérer de grandes quantités de bactéries que nous avons injectées dans la circulation générale, l'infection par quelques virions de l'IIV-31 est létale dans 100% des cas. Cependant, les animaux dont nous disposons au laboratoire n'ont jamais été en contact avec ce virus. Dans les populations naturelles de *P. scaber* où l'IIV-31 est présent, il est fréquent d'observer des individus sains et des individus contaminés au sein des mêmes groupes (Grosholz, 1993). La prévalence du nombre d'individus infectés au sein de ces groupes excède rarement les 20% (Grosholz, 1993). Cette prévalence s'explique par la saison, la densité et les capacités de dispersion des individus, mais aussi par la présence d'individus infectés ne montrant aucun symptôme d'iridescence (*cf.* Figure 41, page 73 ; Grosholz 1993). Si l'iridescence n'est pas observée, alors le virus ne s'est pas répliqué abondamment au sein de ces individus asymptomatiques. Cela suggère que les individus asymptomatiques exprimeraient une résistance face à l'IIV-31. De ce fait, nous pourrions nous attendre à détecter un priming immunitaire chez les individus *A. vulgare* naturellement résistants à ce virus. Méthodologiquement, il faudrait se focaliser en premier lieu sur des populations hébergeant naturellement ce virus. Afin de déterminer les réponses immunitaires permettant une résistance à ce virus, nous pourrions alors comparer les effecteurs immunitaires (*e.g.* concentration et types d'hémocytes, activité phénoloxydase, etc) des individus asymptomatiques, avec ceux d'individus iridescents (*i.e.* non résistants) et d'individus non-infectés. La présence de l'IIV-31 au sein des individus de ces populations

pourrait être détectée *a posteriori via* une amplification de l'ADN de ce virus, comme nous l'avons fait pour les bactéries commensales d'*A. vulgare* (*cf.* Chapitre III, partie I).

(3) Un autre point qu'il faudrait développer est la spécificité du priming immunitaire, c'est-à-dire dans quelle mesure le système immunitaire d'*A. vulgare* est capable de reconnaître un pathogène, conserver l'information, puis répondre de manière adaptée et spécifique face à une seconde exposition par ce même pathogène (*cf.* Introduction, partie II.2). Pour cela, nous avons tenté une expérience de priming immunitaire avec des injections hétérologues de *S. enterica* et *L. ivanovii*. Cependant, les doses de bactéries inactivées que nous avons utilisées n'étaient pas assez élevées pour en déduire un quelconque effet. Néanmoins, nous avons identifié des bactéries pathogènes opportunistes durant cette thèse (*cf.* Chapitre III, partie II). Nous pourrions alors tester le priming immunitaire avec des injections contenant d'abord une bactérie identifiée comme pathogène, puis des *S. enterica*. Puisque les bactéries identifiées pour le moment ne sont que des gram (-), comme *S. enterica*, cette expérience nous permettrait de déterminer si le priming immunitaire est spécifique, ou non, à *S. enterica*. Pour aller un peu plus loin, nous pourrions tester le priming immunitaire avec des injections hétérologues contenant des bactéries à gram (-) puis des bactéries à gram (+). Connaître la spécificité du priming immunitaire chez *A. vulgare* nous permettrait de déterminer si les mécanismes sous-jacents impliquent le stockage de l'information d'un certain type de bactéries pathogènes (gram (+) ou gram (-)), ou bien si cette protection est généralisée à n'importe quel type de bactéries pathogènes rencontrées.

II.2 – Quid des mécanismes du priming immunitaire chez *A. vulgare* ?

D'un point de vue mécanistique, nous avons observé que le priming immunitaire chez *A. vulgare* contre *S. enterica* est (1) corrélé à une plus forte viabilité des hémocytes lorsque les individus rencontrent une première fois des *S. enterica* vivantes, et (2) corrélé à des changements de proportion des types d'hémocytes lorsque les individus rencontrent des *S. enterica* inactivées 7 jours plus tôt. Même si ces résultats nous apportent des informations importantes et concordent avec les résultats de la littérature, nous ignorons quelle sont les réponses immunitaires associées au priming immunitaire contre *S. enterica*, en termes d'activités cellulaires et/ou humorales. Pour comprendre comment les individus *A. vulgare*

se protègent d'une seconde infection par *S. enterica* lorsqu'ils ont préalablement été exposés à cette même bactérie, des expériences complémentaires sont nécessaires.

Dans la mesure où les hémocytes sont le support cellulaire de la plupart des réactions immunitaires chez les invertébrés, il serait pertinent de quantifier l'activité phagocytaire des hémocytes. Cela pourrait être réalisé en injectant *in vivo* des *S. enterica* génétiquement modifiées pour être fluorescentes *(e.g.* par un marquage Green Fluorescent Protein ; Ma et al., 2011*),* et en quantifiant le nombre de *S. enterica* à l'intérieur des hémocytes (*i.e.* phagocytées). Nous pourrions également quantifier la production de composés humoraux (*e.g.* activité phénoloxydase, production de peptides antimicrobiens, etc). À court terme, ces quantifications sont envisagées *in vivo*, mais à plus long terme, elles sont envisagées de manière *in vitro*. Au laboratoire, des mises au point techniques sont menées afin de cultiver les hémocytes d'*A. vulgare in vitro* après un tri cellulaire permettant de séparer les différents types d'hémocytes dans des cultures cellulaires différentes. Ces cultures cellulaires ouvriraient un large champ de possibilités pour analyser directement l'impact de plusieurs infections par *S. enterica* (vivantes ou inactivées) sur les réponses immunitaires de chaque type d'hémocytes. Nous pourrions ainsi analyser les aspects fonctionnels du priming immunitaire contre *S. enterica*, en se focalisant par exemple sur la cinétique de production de composés antimicrobiens (phénoloxydase, peptides antimicrobien, ROS, RNI), ou même l'expression des gènes des hémocytes suivant la première et la seconde infection.

Ces approches fonctionnelles apporteraient des précisions sur le(s) mécanisme(s) du priming immunitaire contre *S. enterica*. Elles permettraient par exemple de déterminer si ce sont les mêmes hémocytes qui sont reprogrammés après la première infection, et/ou si le priming immunitaire est médié par des hémocytes plus résistants, nouvellement produits par les organes hématopoïétiques. Ces analyses permettraient également de déterminer le(s) type(s) de mécanisme(s) utilisé(s) durant le priming immunitaire, à savoir : une/des réponse(s) immunitaire(s) bimodale(s), soutenue(s) ou des changements de réponses immunitaires entre la première et la seconde infection (*e.g.* une phagocytose plus élevée à la première infection, puis une production de composés humoraux à la seconde infection ; Pinaud et al., 2016).

La détermination des réponses immunitaires permettant le priming immunitaire relève d'une certaine importance, car en plus d'améliorer nos connaissances sur le fonctionnement du priming immunitaire des invertébrés, elle permettrait de mieux connaître les conditions d'émergence et l'évolution du priming immunitaire de l'espèce étudiée.

II.3 – Approfondir la valeur sélective du priming immunitaire

Durant cette thèse, nous n'avons pas observé d'impact significatif du priming immunitaire d'*A. vulgare* contre *S. enterica* sur les capacités reproductives des femelles et leur état de sénescence, au moins sur les traits que nous avons observés (Prigot-Maurice, Depeux et al. 2021). L'une des questions résultante de ce constat est : comment *A. vulgare* peut-il autant amortir les coûts d'une double infection de *S. enterica* persistante durant au moins 7 jours dans son hémolymphe ? Parmi les hypothèses émises (*cf.* Chapitre I, partie II), il se pourrait que le système immunitaire d'*A. vulgare* présente une tolérance accrue contre ces infections, afin de limiter les dommages et les coûts énergétiques qui pourraient en résulter (*cf.* Chapitre I, partie II). Pour clarifier cette hypothèse, et même plus généralement l'expression du priming immunitaire contre *S. enterica*, nous pourrions quantifier la présence de cette bactérie dans l'hémolymphe des individus durant le priming immunitaire. Si la quantité de *S. enterica* diminue drastiquement après chaque infection, alors la meilleure survie que nous observons chez *A. vulgare* reposerait sur une résistance accrue. En revanche, si la quantité de *S. enterica* reste à un niveau relativement stable, le maintien d'une survie élevée reposerait davantage sur une tolérance accrue du système immunitaire d'*A. vulgare* (Schneider & Ayres, 2008).

Que la réponse immunitaire repose sur une résistance ou une tolérance accrue, il n'est pas exclu que des coûts sur d'autres traits d'histoire de vie des individus soient présents. Il se pourrait par exemple que la durée de vie totale des individus ayant subi cette double infection de *S. enterica* soit diminuée par rapport aux individus non-injectés ou ayant reçu uniquement une DL_{50} de *S. enterica*. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait relever la survie des individus jusqu'à leur mort naturelle, qu'ils se soient reproduits, ou non. Si la durée de vie totale des individus est réduite lorsque le priming immunitaire est déclenché, alors le nombre d'évènements de reproduction produits chaque année par rapport aux individus n'ayant reçu qu'une seule infection devrait diminuer. Par conséquent, le nombre de petits dans les générations suivantes serait lui aussi diminué.

Il serait alors nécessaire d'étudier les coûts du priming immunitaire des parents, sur les traits d'histoire de vie des descendants. Pour qu'un trait biologique soit sélectionné au cours de l'évolution, ce dernier doit être variable, encodé génétiquement et héritable. Cependant, les bénéfices à exprimer ce processus doivent être supérieurs aux coûts (*cf.* Introduction, partie II.5). Si les descendants issus de parents primo-injectés présentent une

moins bonne qualité (*i.e.* une moins bonne résistance au pathogène, une croissance ralentie ou de moins bonnes capacités reproductives par exemple), alors le priming immunitaire peut difficilement être sélectionné au cours de l'évolution, puisque ces individus seront moins compétitifs à l'égard de ceux issus de parents n'ayant pas été primo-injectés. Ainsi, pour déterminer si le priming immunitaire d'*A. vulgare* face à *S. enterica* est adaptatif au sens évolutif du terme, nous devons mener des expériences sur les traits d'histoire de vie des descendants issus de parents ayant mis en place un priming immunitaire, ou non.

Pour aller encore plus loin, nous pourrions envisager de tester le priming immunitaire transgénérationnel chez *A. vulgare*. Les femelles *A. vulgare* incubent leurs œufs dans un marsupium contenant un liquide fonctionnellement similaire au placenta des Vertébrés (*cf.* Introduction, partie III.1). Ce soin maternel pourrait permettre le transfert de molécules et/ou de composés bactériens de la mère vers les descendants, ce qui leur conférerait une protection contre les mêmes ou différents pathogènes de ceux auxquels la mère a été exposée. Une expérience préliminaire de priming immunitaire transgénérationnel a déjà été menée au laboratoire, durant le stage de M2 d'Alexandra Cerqueira de Araujo. En utilisant la lignée WXA, les résultats montrent que les descendants âgés de 5 semaines et issus de mère injectées par *S. enterica* sont plus résistants contre cette même bactérie que les descendants issus de mère non-injectées. Cependant, en utilisant une autre lignée d'*A. vulgare* (lignée BF), cette résistance n'est pas observée lorsque les descendants sont âgés de 8 mois (données non-publiées). Ainsi, il serait pertinent de réitérer cette expérience exclusivement sur la lignée WXA, afin de conclure sur la persistance et la durabilité du priming immunitaire contre. *S enterica* au travers des générations.

Aussi, nous avons montré que le priming immunitaire s'exprime chez les mâles asymbiotiques, les femelles asymbiotiques de 2 ans, ainsi que chez les femelles symbiotiques de 2 ans hébergeant *Wolbachia* (Prigot-Maurice et al., 2021). Pour avoir une vision plus globale des coûts du priming immunitaire à l'échelle des populations, il serait pertinent de tester les capacités reproductives des mâles et des femelles hébergeant *Wolbachia* lorsqu'ils expriment un priming immunitaire.

II. 4 – Et pour l'influence de *Wolbachia* sur le priming immunitaire d'*A. vulgare* ?

Nous avons mis en évidence que la présence de *Wolbachia* interfère avec la protection contre *S. enterica* selon l'âge des individus lors du priming immunitaire chez *A. vulgare* (Prigot-Maurice et al., 2021). Pour rappel, les femelles symbiotiques de 1 an primo-injectées avec *S. enterica* n'expriment pas de protection accrue contre une seconde infection de *S. enterica*, alors que les femelles symbiotiques de 2 ans primo-injectées expriment un priming immunitaire au même titre que les individus asymbiotiques de 2 ans. Cette « absence » de priming immunitaire chez les jeunes femelles symbiotiques s'expliquerait par la protection conférée par *Wolbachia* contre *S. enterica* (Braquart-Varnier et al., 2015b), puisque les femelles symbiotiques contrôles de 1 an (ayant reçu une primo-injection de LB ou seulement une DL_{50} de *S. enterica*) ont de meilleures capacités de survie que les mâles et femelles contrôles asymbiotiques de 1 an (Prigot-Maurice et al. 2021). Face à ces résultats, nous ne pouvons pas déterminer si la protection conférée par *Wolbachia* chez les individus contrôles est le résultat d'un priming immunitaire dit « symbiotique » (*i.e. Wolbachia* stimule le système immunitaire d'*A. vulgare*, ce qui le protège contre *S. enterica*) et/ou d'une compétition directe entre *Wolbachia* et *S. enterica,* puisque ces deux bactéries partagent la même niche écologique (*i.e.* mode de vie intracellulaire). Afin de déterminer si nous avons observé un priming immunitaire symbiotique de la part de *Wolbachia* ou une compétition microbienne, deux approches expérimentales complémentaires sont envisageables :

(1) Nous pourrions d'abord analyser l'expression des gènes de l'immunité d'individus symbiotiques et asymbiotiques lors du priming immunitaire contre *S. enterica*. Si la protection conférée par *Wolbachia* est due à un priming immunitaire symbiotique, alors nous devrions observer une augmentation de l'expression des gènes immunitaires chez les individus symbiotiques (Moreira et al., 2009 ; Kambris et al., 2009 ; Pinto et al., 2012 ; Rancès et al., 2012). Cette méthode nous permettrait de cibler plus précisément quels effecteurs immunitaires sont surexprimés. Puis, nous pourrions étudier directement les effecteurs immunitaires impliqués, comme la production de ROS par exemple (Pan et al., 2012). Cependant, même si les gènes et les effecteurs immunitaires sont surexprimés, cela n'exclut pas une compétition microbienne entre *Wolbachia* et *S. enterica*. (2) Nous pourrions alors vérifier les présences simultanées de *Wolbachia* et de *S. enterica* dans les cellules d'*A. vulgare in vivo*, grâce à des marquages fluorescents (Chevalier et al., 2011 ; Ma et al., 2011). Si ces bactéries coexistent dans les mêmes cellules, alors nous pourrions utiliser des cultures

cellulaires (cellules adipeuses ou musculaires par exemple ; Sriram & Ling, 2020) d'*A. vulgare* infectés par *Wolbachia* et *S. enterica*, afin de mesurer leurs quantités au cours du temps à l'intérieur des cellules (Declerck et al., 2005). Si la quantité de *S. enterica* diminue en présence de *Wolbachia*, alors nous pourrons en déduire la mise en place d'une compétition bactérienne entre ces deux bactéries.

III. APPORT DE LA THÈSE

Grâce aux approches multidisciplinaires que nous avons utilisées durant cette thèse, nos travaux de recherches participent à la compréhension du priming immunitaire chez les invertébrés. D'un point de vue fondamental, nous avons caractérisé le priming immunitaire chez une nouvelle espèce d'invertébrés, *A. vulgare*, alors qu'une seule publication portant sur le priming immunitaire d'un isopode terrestre avait été publiée, il y a 13 ans (Roth et al., 2009). Nous avons démontré que chez cette espèce, des changements au niveau des différents types d'hémocytes s'opèrent durant ce priming immunitaire, comme il est observé dans la littérature (Rodrigues et al., 2010 ; Pope et al., 2011 ; Yang et al., 2020). Nous avons également identifié des bactéries commensales potentiellement pathogènes opportunistes d'*A. vulgare*, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant aux capacités immunitaires contre des pathogènes naturels chez cette espèce. *A. vulgare* est un organisme particulièrement résistant/tolérant à des infections par des pathogènes. Alors que les individus ne mesurent pas plus de 2 cm à l'état adulte, 50% d'entre eux sont capables de survivre à plus de 1 000 000 bactéries de diverses souches injectées directement dans la circulation générale (*cf.* Chapitre III, partie I). Ces observations démontrent que des organismes encore aujourd'hui considérés comme « moins complexes » que les Vertébrés « supérieur », ont un système immunitaire bien plus performant que ce que nous pouvions penser.

Bien que la plupart de nos travaux soient orientés sur l'interaction spécifique entre *A. vulgare* et *S. enterica*, ces derniers peuvent être d'un certain intérêt en recherche appliquée. Les bactéries du genre *Salmonella* sont communément retrouvées dans les denrées alimentaires et posent ainsi de sérieux problèmes médicaux et vétérinaires. La fièvre typhoïde causée par la salmonellose, une maladie résultant d'une infection par *S. enterica Typhi*, tue entre 130 000 et 220 000 personnes par an dans divers pays en développement (Stanaway et al., 2019). D'après Viegas et al. (2013), l'utilisation de modèles invertébrés demeure une alternative pertinente pour l'étude de la salmonellose chez l'Homme, puisque les Hommes et

les invertébrés partagent des similarités immunitaires (*cf.* Introduction, partie I.4 ; Kavanagh & Reeves, 2004). Le lépidoptère *G. mellonella* par exemple est fréquemment utilisé pour inférer les réponses immunitaires dressées contre *S. enterica Typhimurium* chez les mammifères (Scalfaro et al., 2017 ; Seribelli et al., 2020 ; Bismuth et al., 2021 ; Nale et al., 2021). Si *G. mellonella* est utilisé pour étudier la salmonellose, alors cette alternative est également envisageable avec *A. vulgare*. Au-delà des capacités de tolérance et/ou de résistance d'*A. vulgare* face à *S. enterica*, cette espèce exprime un priming immunitaire contre cette bactérie. D'après Eom et al. (2013), le développement de vaccin contre la salmonellose est un défi important. Pennington et al. (2019) ont montré qu'un vaccin avec une souche atténuée de *S. enterica Typhi* chez l'Homme augmente la réactivité des monocytes (*i.e.* cellules de l'immunité innée chez les Vertébrés) face à une seconde exposition de *S. enterica*. Cependant, la réponse immunitaire adaptative des sujets est simultanément déclenchée, ce qui ne permet pas de distinguer quels processus immunitaires sont les plus performants (*i.e.* l'immunité entrainée et/ou l'immunité adaptative) pour apporter une protection immunitaire ultérieure contre la salmonellose (Pennington et al., 2019). Comme pour *G. mellonella*, le système immunitaire d'*A. vulgare* repose sur une immunité innée. Ainsi, l'identification des réponses immunitaires des hémocytes durant le priming immunitaire pourrait apporter des informations clefs pour développer de nouvelles stratégies de vaccination chez les Vertébrés, grâce à l'immunité entrainée (*cf.* Introduction, partie I.5, II.4)

Pour la première fois, nous avons montré une interférence entre la protection médiée par *Wolbachia* et la protection médiée par un priming immunitaire chez une espèce d'invertébrés (Prigot-Maurice et al., 2021). L'information essentielle de cette étude est que la présence d'un symbiote protecteur peut masquer l'observation du priming immunitaire (Prigot-Maurice et al., 2021). Alors que le priming immunitaire a très peu été étudié en présence, ou l'absence, de symbiotes protecteurs au sein des individus (*cf.* Table 3 de Prigot-Maurice et al., 2022), nos résultats mettent en évidence que la présence de certains symbiotes pourrait expliquer l'hétérogénéité du priming immunitaire (*cf.* Introduction, partie II.3). En analysant plus généralement l'influence que peuvent avoir les symbiotes protecteurs sur l'expression du priming immunitaire contre les pathogènes (Prigot-Maurice et al., 2022), notre article de synthèse pointe du doigt les limites conceptuelles et mécanistiques qui entravent la compréhension du priming immunitaire chez les invertébrés. Ainsi, grâce à nos travaux, nous espérons promouvoir la considération des symbiotes protecteurs dans les prochaines études qui porteront sur le priming immunitaire des invertébrés.

RÉFÉRENCES

Aaby, P., Kollmann, T. R., & Benn, C. S. (2014). Nonspecific effects of neonatal and infant vaccination : Public-health, immunological and conceptual challenges. *Nature Immunology*, *15*(10), 895-899. https://doi.org/10.1038/ni.2961

Aballay, A., Yorgey, P., & Ausubel, F. M. (2000). Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of Caenorhabditis elegans. *Current Biology*, *10*(23), 1539-1542. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00830-7

Adamo, S. A. (1999). Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. *Animal Behaviour*, *57*(1), 117-124. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0999

Adamo, S. A. (2017). Stress responses sculpt the insect immune system, optimizing defense in an ever-changing world. *Developmental & Comparative Immunology*, *66*, 24-32. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.005

Adamo, S. A., Jensen, M., & Younger, M. (2001). Changes in lifetime immunocompetence in male and female Gryllus texensis (formerly G. integer) : Trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour*, *62*(3), 417-425. https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1786

Adema, C. M. (2015). Fibrinogen-Related Proteins (FREPs) in Mollusks. In E. Hsu & L. Du Pasquier (Éds.), *Pathogen-Host Interactions : Antigenic Variation v. Somatic Adaptations* (Vol. 57, p. 111-129). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_5

Adema, C. M., Hertel, L. A., Miller, R. D., & Loker, E. S. (1997). A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(16), 8691-8696. https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8691

Agamennone, V., Le, N. G., van Straalen, N. M., Brouwer, A., & Roelofs, D. (2019). Antimicrobial activity and carbohydrate metabolism in the bacterial metagenome of the soil-living invertebrate Folsomia candida. *Scientific Reports*, *9*(1), 7308. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43828-w

Akbari, S., Oshaghi, M. A., Hashemi-Aghdam, S. S., Hajikhani, S., Oshaghi, G., & Shirazi, M. H. (2015). Aerobic Bacterial Community of American Cockroach Periplaneta americana,a Step toward Finding Suitable Paratransgenesis Candidates. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, *9*(1), 35-48.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015

Akoda, K., Van Den Abbeele, J., Marcotty, T., De Deken, R., Sidibe, I., & Van den Bossche, P. (2009). Nutritional stress of adult female tsetse flies (Diptera : Glossinidae) affects the susceptibility of their offspring to trypanosomal infections. *Acta Tropica*, *111*(3), 263-267. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.005

Ali, S. M., Siddiqui, R., Sagathevan, K. A., & Khan, N. A. (2021). Antibacterial activity of selected invertebrate species. *Folia Microbiologica*, *66*(2), 285-291. https://doi.org/10.1007/s12223-021-00860-6

Alikhan, M. A., American Society of Zoologists., & Crustacean Society. (1995). Terrestrial isopod biology. Rotterdam: A.A. Balkema.

Al-Jumaa, M., Hallett, M. B., & Dewitt, S. (2020). Cell surface topography controls phagocytosis and cell spreading: The membrane reservoir in neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1867*(12), 118832. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118832

Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., & Isaacson, R. E. (2003). Type 1 Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bind to Enterocytes and Contribute to Colonization of Swine In Vivo. *Infection and Immunity*, *71*(11), 6446-6452. https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6446-6452.2003

Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica* : Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, *2015*, 1-16. https://doi.org/10.1155/2015/520179

Antoł, A., & Czarnoleski, M. (2018). Size dependence of offspring production in isopods : A synthesis. *ZooKeys*, *801*, 337-357. https://doi.org/10.3897/zookeys.801.23677

Appel, C., Quadros, A. F., & Araujo, P. B. (2011). Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Nauplius*, *19*(2), 123-128. https://doi.org/10.1590/S0104-64972011000200003

Ardia, D. R., Gantz, J. E., Brent C., Schneider, & Strebel, S. (2012). Costs of immunity in insects: An induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity: Energetic costs of immunity. *Functional Ecology*, *26*(3), 732-739. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.01989.x

Arizza, V., Vazzana, M., Schillaci, D., Russo, D., Giaramita, F. T., & Parrinello, N. (2013). Gender differences in the immune system activities of sea urchin Paracentrotus lividus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *164*(3), 447-455. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.021

Arjunan, M., Prakash, L., & Alsalamah, A. (2010). HPTLC Separation Of Antibacterial Compounds From Perna Viridis And Portunus Sanguinolentus And Its ActivityTested Against Common Bacterial Pathogens. *Advanced Biotech*, *9*.

Armitage, S. A. O., Peuß, R., & Kurtz, J. (2015). Dscam and pancrustacean immune memory – A review of the evidence. *Developmental & Comparative Immunology*, *48*(2), 315-323. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.03.004

Armstrong, J. L., Porteous, L. A., & Wood, N. D. (1989). The cutworm Peridroma saucia (Lepidoptera: Noctuidae) supports growth and transport of pBR322-bearing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(9), 2200-2205. https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2200-2205.1989

Arul Prakash, A., Balasubramanian, S., Gunasekaran, G., Prakash, M., & Senthil Raja, P. (2011). Control of Clinical Pathogens by the Haemolymph of *Paratelphusa hydrodromous*, a Freshwater Crab. *ISRN Pharmacology*, *2011*, 1-4. https://doi.org/10.5402/2011/642768

Austen, K. F., & Fearon, D. T. (1979). A molecular basis of activation of the alternative pathway of human complement. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *120B*, 3-17.

Ayres, J. S., & Schneider, D. S. (2009). The Role of Anorexia in Resistance and Tolerance to Infections in Drosophila. *PLoS Biology*, *7*(7), e1000150. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000150

Ayres, J. S., & Schneider, D. S. (2012). Tolerance of Infections. *Annual Review of Immunology*, *30*(1), 271-294. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075030

Bailey, L., & Ball, B. V. (1978). Apis iridescent virus and "clustering disease" of Apis cerana. *Journal of Invertebrate Pathology*, *31*(3), 368-371. https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90231-8

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, *315*(5819), 1709-1712. https://doi.org/10.1126/science.1138140

Bascuñán-García, A. P., Lara, C., & Córdoba-Aguilar, A. (2010). Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, Acheta domesticus. *Journal of Insect Physiology*, *56*(2), 204-211. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.005

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in Drosophila. *Heredity*, *2*(3), 349-368. https://doi.org/10.1038/hdy.1948.21

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.

Battistella, S., Bonivento, P., & Amirante, G. A. (1996). Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology*, *63*(4), 337-343. https://doi.org/10.1080/11250009609356156

Baumann, P., & Moran, N. A. (1997). Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *72*(1), 39-48. https://doi.org/10.1023/a:1000239108771

Beck, G., & Habicht, G. S. (1996). Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*, *275*(5), 60-66. https://doi.org/10.1038/scientificamerican1196-60

Beckage, N. E. (2008). *Insect immunology* (1st ed). Academic Press.

Becking, T., Delaunay, C., Cordaux, R., Berjeaud, J.-M., Braquart-Varnier, C., & Verdon, J. (2020). Shedding Light on the Antimicrobial Peptide Arsenal of Terrestrial Isopods : Focus on Armadillidins, a New Crustacean AMP Family. *Genes*, *11*(1), 93. https://doi.org/10.3390/genes11010093

Ben-Ami, F., Orlic, C., & Regoes, R. R. (2018). *Disentangling unspecific and specific transgenerational immune priming components in host-parasite interactions* [Preprint]. Ecology. https://doi.org/10.1101/429498

Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., & Kavanagh, K. (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of Galleria mellonella from a subsequent lethal infection by Candida albicans and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes and Infection*, *8*(8), 2105-2112. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.005

Bernier, C., Boidin-Wichlacz, C., Tasiemski, A., Hautekèete, N., Massol, F., & Cuvillier-Hot, V. (2019). Transgenerational Immune Priming in the Field : Maternal Environmental Experience Leads to Differential Immune Transfer to Oocytes in the Marine Annelid Hediste diversicolor. *Genes*, *10*(12), 989. https://doi.org/10.3390/genes10120989

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., … El-Sayed, N. M. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, *309*(5733), 416-422. https://doi.org/10.1126/science.1112642

Bérto, L. D., Beirão, B. C. B., Filho, T. F., Ingberman, M., Fávaro Jr., C., Tavella, R., Silva, R. B. de M., & Caron, L. F. (2015). Live and Inactivated <i>Salmonella</i> Enteritidis Vaccines : Immune Mechanisms in Broiler Breeders. *World Journal of Vaccines*, *05*(04), 155-164. https://doi.org/10.4236/wjv.2015.54018

Best, A., Tidbury, H., White, A., & Boots, M. (2013). The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in invertebrate hosts. *Journal of The Royal Society Interface*, *10*(80), 20120887. https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0887

Binnington, K. C., & Hoffmann, A. A. (1989). Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in Drosophila simulans. *Journal of Invertebrate Pathology*, *54*(3), 344-352. https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90118-3

Bismuth, H. D., Brasseur, G., Ezraty, B., & Aussel, L. (2021). Bacterial Genetic Approach to the Study of Reactive Oxygen Species Production in Galleria mellonella During Salmonella Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 640112. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.640112

Blok, B. A., Arts, R. J. W., van Crevel, R., Benn, C. S., & Netea, M. G. (2015). Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(3), 347-356. https://doi.org/10.1189/jlb.5RI0315-096R

Bloom, D. E. (2011). The Value of Vaccination. In N. Curtis, A. Finn, & A. J. Pollard (Éds.), *Hot Topics in Infection and Immunity in Children VII* (Vol. 697, p. 1-8). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7185-2_1

Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, *2*(10), 907-916. https://doi.org/10.1038/ni1001-907

Boissonnade, P., & Billard, A. E. (1932). *Histoire de l'Université de Poitiers, passé et présent (1432-1932)*. Imprimerie moderne, Nicolas, Renault & cie. https://books.google.fr/books?id=WWjPAAAAMAAJ

Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F., & Brooks, R. (2008a). Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology*, *22*(3), 443-453. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01417.x

Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F., & Brooks, R. (2008b). Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology*, *22*(3), 443-453. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01417.x

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S33-S40. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017

Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, *25*(6), 280-288. https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008

Bonneaud, C., Mazuc, J., Chastel, O., Westerdahl, H., & Sorci, G. (2004). Terminal Investment Induced By Immune Challeng And Fitness Traits Associated With Major Histocompatibility Complex In The House Sparrow. *Evolution*, *58*(12), 2823-2830. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2004.tb01633.x

Boraschi, D., & Italiani, P. (2018). Innate Immune Memory : Time for Adopting a Correct Terminology. *Frontiers in Immunology*, *9*, 799. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00799

Borghesi, L., & Milcarek, C. (2007). Innate versus Adaptive Immunity : A Paradigm Past Its Prime? *Cancer Research*, *67*(9), 3989-3993. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0182

Bosch, T. C. G., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Fraune, S., Hemmrich, G., Zill, H., Rosenstiel, P., Jacobs, G., Schreiber, S., Leippe, M., Stanisak, M., Grötzinger, J., Jung, S., Podschun, R., Bartels, J., Harder, J., & Schröder, J.-M. (2009). Uncovering the evolutionary history of innate immunity : The simple metazoan Hydra uses epithelial cells for host defence. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(4), 559-569. https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.10.004

Bouchon, D., Rigaud, T., & Juchault, P. (1998). Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans : Molecular identi ® cation and host feminization. *The royal Society*, *265*(March), 1081-1090.

Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Bossin, H. C., Moretti, R., Baton, L. A., Hughes, G. L., Mavingui, P., & Gilles, J. R. L. (2014). Harnessing mosquito–Wolbachia symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, *132*, S150-S163. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.004

Bourtzis, K., & Miller, T. A. (2003). *Insect Symbiosis*. CRC Press.

Bourtzis, K., & Miller, T. A. (2008). *Insect Symbiosis, Volume 3*. CRC Press.

Bourtzis, K., & Miller, T. A. (2009). *Insect symbiosis. Vol. 3 Vol. 3*. CRC Press. http://www.crcnetbase.com/isbn/9781420064100

Bozler, J., Kacsoh, B. Z., & Bosco, G. (2020). Maternal Priming of Offspring Immune System in *Drosophila*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *10*(1), 165-175. https://doi.org/10.1534/g3.119.400852

Braak, B., Laughton, A. M., Altincicek, B., Parker, B. J., & Gerardo, N. M. (2013). Exposure to Bacterial Signals Does Not Alter Pea Aphids' Survival upon a Second Challenge or Investment in Production of Winged Offspring. *PLoS ONE*, *8*(8), e73600. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073600

Brandt, S. M., Dionne, M. S., Khush, R. S., Pham, L. N., Vigdal, T. J., & Schneider, D. S. (2004). Secreted Bacterial Effectors and Host-Produced Eiger/TNF Drive Death in aSalmonella-Infected Fruit Fly. *PLoS Biology*, *2*(12), e418. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020418

Braquart-Varnier, C., Altinli, M., Pigeault, R., Chevalier, F. D., Grève, P., Bouchon, D., & Sicard, M. (2015b). The Mutualistic Side of Wolbachia–Isopod Interactions : Wolbachia Mediated Protection Against Pathogenic Intracellular Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01388

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003286

Braquart-Varnier, C., Raimond, M., Mappa, G., Chevalier, F. D., Le Clec'h, W., & Sicard, M. (2015a). The Hematopoietic Organ : A Cornerstone for Wolbachia Propagation Between and Within Hosts. *Frontiers in Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01424

Bredon, M., Depuydt, E., Brisson, L., Moulin, L., Charles, C., Haenn, S., Moumen, B., & Bouchon, D. (2021). Effects of Dysbiosis and Dietary Manipulation on the Digestive Microbiota of a Detritivorous Arthropod. *Microorganisms*, *9*(1), 148. https://doi.org/10.3390/microorganisms9010148

Bredon, M., Dittmer, J., Noël, C., Moumen, B., & Bouchon, D. (2018). Lignocellulose degradation at the holobiont level : Teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome*, *6*(1), 162. https://doi.org/10.1186/s40168-018-0536-y

Breeuwer, J. A. J., & Werren, J. H. (1993). Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in Nasonia vitripennis. *Genetics*, *135*(2), 565-574.

Brehélin, M., & Roch, P. (2008). Specificity, learning and memory in the innate immune response. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, *5*, 103-109.

Brites, D., McTaggart, S., Morris, K., Anderson, J., Thomas, K., Colson, I., Fabbro, T., Little, T. J., Ebert, D., & Du Pasquier, L. (2008). The Dscam Homologue of the Crustacean Daphnia Is Diversified by Alternative Splicing Like in Insects. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(7), 1429-1439. https://doi.org/10.1093/molbev/msn087

Brody, M. S., Edgar, M. H., & Lawlor, L. R. (1983). A cost of reproduction in a terrestrial isopod. *Evolution*, *37*(3), 653-655. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1983.tb05586.x

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides : Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(3), 238-250. https://doi.org/10.1038/nrmicro1098

Broly, P., Deneubourg, J.-L., & Devigne, C. (2013). Benefits of aggregation in woodlice : A factor in the terrestrialization process? *Insectes Sociaux*, *60*(4), 419-435. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0313-7

Bromenshenk, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. H., Stanford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Deshpande, S. V., McCubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., Williams, T., Firth, D. R., Skowronski, E., Lehmann, M. M., Bilimoria, S. L., Gress, J., Wanner, K. W., & Cramer, R. A. (2010). Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE*, *5*(10), e13181. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013181

Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Venselaar, H., & van Rij, R. P. (2014). A dsRNA-binding protein of a complex invertebrate DNA virus suppresses the Drosophila RNAi response. *Nucleic Acids Research*, *42*(19), 12237-12248. https://doi.org/10.1093/nar/gku910

Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Vodovar, N., Ince, I. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M.-C., & van Rij, R. P. (2012). The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the Drosophila RNAi machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(51), E3604-E3613. https://doi.org/10.1073/pnas.1207213109

Brown, B. L., Creed, R. P., Skelton, J., Rollins, M. A., & Farrell, K. J. (2012). The fine line between mutualism and parasitism : Complex effects in a cleaning symbiosis demonstrated by multiple field experiments. *Oecologia*, *170*(1), 199-207. https://doi.org/10.1007/s00442-012-2280-5

Brown, G. D., Willment, J. A., & Whitehead, L. (2018). C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nature Reviews Immunology*, *18*(6), 374-389. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0004-8

Brown, L. D., Shapiro, L. L. M., Thompson, G. A., Estévez-Lao, T. Y., & Hillyer, J. F. (2019). Transstadial immune activation in a mosquito : Adults that emerge from infected larvae have stronger antibacterial activity in their hemocoel yet increased susceptibility to malaria infection. *Ecology and Evolution*, *9*(10), 6082-6095. https://doi.org/10.1002/ece3.5192

Browne, N., Surlis, C., & Kavanagh, K. (2014). Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in Galleria mellonella larvae. *Journal of Insect Physiology*, *63*, 21-26. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006

Brumell, J. (2004). Salmonella redirects phagosomal maturation. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(1), 78-84. https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.12.005

Bruno, R., Maresca, M., Canaan, S., Cavalier, J. F., Mabrouk, K., Boidin-Wichlacz, C., Olleik, H., Zeppilli, D., Brodin, P., Massol, F., Jollivet, D., Jung, S., & Tasiemski, A. (2019). Worms' Antimicrobial Peptides. Marine drugs, 17(9), 512. https://doi.org/10.3390/md17090512

Buchmann, K. (2014). Evolution of Innate Immunity : Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459

Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster—From microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, *14*(12), 796-810. https://doi.org/10.1038/nri3763

Philippe Bulet; Reto Stöcklin; Laure Menin (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. 198(1), 169–184. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x

Burnet, F. M. (1969). Self and not-self : Cellular immunology. Melbourne University Press Cambridge University Press.

Byzov, B. A., Nechitaylo, T. Yu., Bumazhkin, B. K., Kurakov, A. V., Golyshin, P. N., & Zvyagintsev, D. G. (2009). Culturable microorganisms from the earthworm digestive tract. *Microbiology*, *78*(3), 360-368. https://doi.org/10.1134/S0026261709030151

Camazine, null, & Liu, null. (1998). A putative iridovirus from the honey bee mite, varroa jacobsoni oudemans. *Journal of Invertebrate Pathology*, *71*(2), 177-178. https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4713

Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by Wolbachia. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003459. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459

Casadevall, A., & Pirofski, L. A. (2000). Host-pathogen interactions : Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and Immunity*, *68*(12), 6511-6518. https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000

Caubet, Y., O'Farrell, G., & Lefebvre, F. (2008). Geographical variability of aggregation in terrestrial isopods : What is the actual significance of such behaviour? *Proceedings of the International Symposium of Terrestrial Isopod Biology*, 137-148.

Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system : Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, *29*(6), 263-271. https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009

Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, *198*(1), 116-126. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x

Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2011). Coagulation in Invertebrates. *Journal of Innate Immunity*, *3*(1), 3-8. https://doi.org/10.1159/000322066

Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2013). Variable immune molecules in invertebrates. *Journal of Experimental Biology*, *216*(23), 4313-4319. https://doi.org/10.1242/jeb.085191

Chakrabarti, S., & Visweswariah, S. S. (2020). Intramacrophage ROS Primes the Innate Immune System via JAK/STAT and Toll Activation. *Cell Reports*, *33*(6), 108368. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108368

Chang, Y.-H., Kumar, R., Ng, T. H., & Wang, H.-C. (2018). What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. *Developmental & Comparative Immunology*, *80*, 53-66. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003

Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S3-S23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980

Chavshin, A. R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Pourmand, M. R., Raeisi, A., Enayati, A. A., Mardani, N., & Ghoorchian, S. (2012). Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught Anopheles stephensi : A step toward finding suitable paratransgenesis candidates. *Acta Tropica*, *121*(2), 129-134. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.015

Chegeni, T. N., & Fakhar, M. (2019). Promising Role of Wolbachia as Anti-parasitic Drug Target and Eco-Friendly Biocontrol Agent. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, *14*(1), 69-79. https://doi.org/10.2174/1574891X14666190211162403

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*(4), e18531. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018531

Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Grève, P., Braquart-Varnier, C., & Bouchon, D. (2012). Feminizing Wolbachia : A transcriptomics approach with insights on the immune response genes in Armadillidium vulgare. *BMC Microbiology*, *12*(S1), S1. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S1

Chiang, Y.-A., Hung, H.-Y., Lee, C.-W., Huang, Y.-T., & Wang, H.-C. (2013). Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine (SR)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, *34*(1), 209-219. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.10.021

Chinchar, V. G., Yu, K. H., & Jancovich, J. K. (2011). The Molecular Biology of Frog Virus 3 and other Iridoviruses Infecting Cold-Blooded Vertebrates. *Viruses*, *3*(10), 1959-1985. https://doi.org/10.3390/v3101959

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaeverbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective Microbiota : From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*(December), 1-19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678

Chou, P.-H., Chang, H.-S., Chen, I.-T., Lin, H.-Y., Chen, Y.-M., Yang, H.-L., & Wang, K. C. H.-C. (2009). The putative invertebrate adaptive immune protein Litopenaeus vannamei Dscam (LvDscam) is the first reported Dscam to lack a transmembrane domain and cytoplasmic tail. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(12), 1258-1267. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.006

Chorine V. (1929) Immunite antitoxique chez les chenilles de Galleria mellonella. Ann. inst. Pasteur, 43, 955-958.

Christensen, S. C. (2011). Asellus aquaticus and other invertebrates in drinking water distribution systems: Occurrence and influence on microbial water quality. Technical University of Denmark.

Chrostek, E., Marialva, M. S. P., Esteves, S. S., Weinert, L. A., Martinez, J., Jiggins, F. M., & Teixeira, L. (2013). Wolbachia Variants Induce Differential Protection to Viruses in Drosophila melanogaster : A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genetics*, *9*(12). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896

Ciancio, A. (2016). *Invertebrate Bacteriology : Function, Evolution and Biological Ties*. Springer.

Clay, K. (2014). Defensive symbiosis : A microbial perspective. *Functional Ecology*, *28*(2), 293-298. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258

Clem, A. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, *3*(1), 73. https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299

Clutton-Brock, T. H. (1984). Reproductive Effort and Terminal Investment in Iteroparous Animals. *The American Naturalist*, *123*(2), 212-229. https://doi.org/10.1086/284198

Cole, A., & Morris, J. (1980). A New Iridovirus of Two Species of Terrestrial Isopods, *Armadillidium vulgare* and *Porcellioscaber*. *Intervirology*, *14*(1), 21-30. https://doi.org/10.1159/000149158

Collins, F. M. (1973). Immunogenicity of Living and Heat-Killed *Salmonella pullorum* Vaccines. *Infection and Immunity*, *7*(5), 735-742. https://doi.org/10.1128/iai.7.5.735-742.1973

Combes, C., Gavotte, L., Moulia, C., & Sicard, M. (2018). *Parasitisme, Écologie et évolution des interactions durables.* (Dunod). https://www.dunod.com/sciences-techniques/parasitisme-ecologie-et-evolution-interactions-durables

Comfort, A. (1964). *Ageing : The biology of senescence* (Routledge Kegan Paul).

Constantino, M., Christian, P., Marina, C. F., & Williams, T. (2001). A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6. *Journal of Virological Methods*, *98*(2), 109-118. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00356-1

Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., & Canales-Lazcano, J. (2016). Insect immune priming : Ecology and experimental evidences: Immune priming in invertebrates. *Ecological Entomology*, *41*(4), 351-366. https://doi.org/10.1111/een.12300

Contreras-Garduño, J., Méndez-López, T. T., Patiño-Morales, A., González-Hernández, G. A., Torres-Guzmán, J. C., Krams, I., Mendoza-Cuenca, L., & Ruiz-Guzmán, G. (2019). The costs of the immune memory within generations. *The Science of Nature*, *106*(11-12), 59. https://doi.org/10.1007/s00114-019-1657-2

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Moreno-García, M., Velazquez-Meza, M. E., Valverde, V., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2015). Plasmodium berghei induced priming in Anopheles albimanus independently of bacterial co-infection. *Developmental & Comparative Immunology*, *52*(2), 172-181. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.004

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Rodríguez, M. H., Alvarado-Delgado, A., & Lanz-Mendoza, H. (2014). Cost of immune priming within generations : Trade-off between infection and reproduction. *Microbes and Infection*, *16*(3), 261-267. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.010

Cooke, E. M. (1985). Escherichia coli : An Overview. *The Journal of Hygiene*, *95*(3), 523-530.

Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and Specificity in the Insect Immune System : Current Perspectives and Future Challenges. *Frontiers in Immunology*, *8*, 539. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539

Cooper, E. (2012). Adaptive Immunity from Prokaryotes to Eukaryotes : Broader Inclusions Due to Less Exclusivity? In *Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections*. InTech. https://doi.org/10.5772/38054

Cooper, E. L. (1969). Specific Tissue Graft Rejection in Earthworms. *Science*, *166*(3911), 1414-1415. https://doi.org/10.1126/science.166.3911.1414

Cooper, E. L. (1994). Invertebrates can tell us something about senescence. *Aging Clinical and Experimental Research*, *6*(1), 5-23. https://doi.org/10.1007/BF03324208

Cooper, E. L., & Roch, P. (1986). Second-set allograft responses in the earthworm Lumbricus terrestris. Kinetics and characteristics. *Transplantation*, *41*(4), 514-520.

Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, *124*(4), 815-822. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001

Corby-Harris, V., & Promislow, D. E. L. (2008). Host ecology shapes geographical variation for resistance to bacterial infection in Drosophila melanogaster. *The Journal of Animal Ecology*, *77*(4), 768-776. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01399.x

Cordaux, R., Bouchon, D., & Grève, P. (2011). The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*, *27*(8), 332-341. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.002

Cordaux, R., & Gilbert, C. (2017). Evolutionary Significance of Wolbachia-to-Animal Horizontal Gene Transfer : Female Sex Determination and the f Element in the Isopod Armadillidium vulgare. *Genes*, *8*(7), 186. https://doi.org/10.3390/genes8070186

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. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800482

Cordaux, R., Paces-Fessy, M., Raimond, M., Michel-Salzat, A., Zimmer, M., & Bouchon, D. (2007). Molecular Characterization and Evolution of Arthropod-Pathogenic *Rickettsiella* Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(15), 5045-5047. https://doi.org/10.1128/AEM.00378-07

Cordaux, R., Pichon, S., Ben Afia Hatira, H., 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*, 123-131. https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2284

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Akdis, M., Andrä, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W. M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P. E., Brinkman, R. R., Büscher, M., … Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies *. *European Journal of Immunology*, *47*(10), 1584-1797. https://doi.org/10.1002/eji.201646632

Cotton, R. T. (1927). Notes on the Biology of the Meal Worms, Tenebrio Molitor Linne and T. Obscurus Fab. Annals of the Entomological Society of America, 20(1), 81–86. doi:10.1093/aesa/20.1.81

Coustau, C., Kurtz, J., & Moret, Y. (2016). A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate–Parasite Interface. *Trends in Parasitology*, *32*(5), 353-355. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.005

Coutant, M. F. (1977). Contribution a l'étude cytologique et fonctionnelle des hémocytes et des organes hématopoïétiques chez l'oniscoïde Porcellio dilatatus, Brandt. Thèse, Université de Poitiers.

Couvreur, E. (1923) Celeb. 75ieme Anniv. Fond. Soc. Biol., p. 120.

Crayton, M. E., Powell, B. C., Vision, T. J., & Giddings, M. C. (2006). Tracking the evolution of alternatively spliced exons within the Dscam family. *BMC Evolutionary Biology*, *6*(1), 16. https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-16

Creighton, J. C., Heflin, N. D., & Belk, M. C. (2009). Cost of reproduction, resource quality, and terminal investment in a burying beetle. *The American Naturalist*, *174*(5), 673-684.

Crișan, T. O., Netea, M. G., & Joosten, L. A. B. (2016). Innate immune memory : Implications for host responses to damage-associated molecular patterns. *European Journal of Immunology*, *46*(4), 817-828. https://doi.org/10.1002/eji.201545497

Cui, J., Chen, Y., Wang, H. Y., & Wang, R.-F. (2014). Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *10*(11), 3270-3285. https://doi.org/10.4161/21645515.2014.979640

Dangerfield, J. M., & Hassall, M. (1992). Phenotypic variation in the breeding phenology of the woodlouse Armadillidium vulgare. *Oecologia*, *89*(1), 140-146. https://doi.org/10.1007/BF00319026

Dangerfield, J. M., & Telford, S. R. (1995). Tactics of reproduction and reproductive allocation in four species of woodlice from southern Africa. *Journal of Tropical Ecology*, *11*(4), 641-649. https://doi.org/10.1017/S0266467400009196

Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *306B*(6), 496-520. https://doi.org/10.1002/jez.b.21102

Daukšte, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M. J., & Krams, I. (2012). Senescence in immune priming and attractiveness in a beetle : Immunosenescence in a beetle. *Journal of Evolutionary Biology*, *25*(7), 1298-1304. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02516.x

De Gregorio, E. (2002). The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila. *The EMBO Journal*, *21*(11), 2568-2579. https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2568

Declerck, P., Behets, J., Delaedt, Y., Margineanu, A., Lammertyn, E., & Ollevier, F. (2005). Impact of Non-Legionella Bacteria on the Uptake and Intracellular Replication of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *Microbial Ecology*, *50*(4), 536-549. https://doi.org/10.1007/s00248-005-0258-0

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(11), 6247-6252. https://doi.org/10.1073/pnas.101304298

Degnan, P. H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R. A., & Moran, N. A. (2009). Hamiltonella defensa, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(22), 9063-9068. https://doi.org/10.1073/pnas.0900194106

Dehlink, E., Domig, K. J., Loibichler, C., Kampl, E., Eiwegger, T., Georgopoulos, A., Kneifel, W., Urbanek, R., & Szépfalusi, Z. (2007). Heat- and Formalin-Inactivated Probiotic Bacteria Induce Comparable Cytokine Patterns in Intestinal Epithelial Cell–Leucocyte Cocultures. *Journal of Food Protection*, *70*(10), 2417-2421. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.10.2417

Den Boer, P. J. (1962). The Ecological Significance of Activity Patterns in the Woodlouse Porcellio Scaber Latr. (Isopoda). *Archives Néerlandaises de Zoologie (in 1967 continued as Netherlands Journal of Zoology)*, *14*(3), 283-409. https://doi.org/10.1163/036551661X00070

Depeux, C., Lemaître, J., Moreau, J., Dechaume-Moncharmont, F., Laverre, T., Paulhac, H., Gaillard, J., & Beltran-Bech, S. (2020b). Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *Journal of Evolutionary Biology*. https://doi.org/10.1111/jeb.13667

Depeux, C., Samba-Louaka, A., Becking, T., Braquart-Varnier, C., Moreau, J., Lemaître, J.-F., Laverre, T., Paulhac, H., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Gaillard, J.-M., & Beltran-Bech, S. (2020a). The crustacean Armadillidium vulgare (Latreille, 1804) (Isopoda : Oniscoidea), a new promising model for the study of cellular senescence. *Journal of Crustacean Biology*, *40*(2), 194-199. https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruaa004

Descamps, S., Boutin, S., Berteaux, D., & Gaillard, J.-M. (2006). Best squirrels trade a long life for an early reproduction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1599), 2369-2374. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3588

Devigne, C., Broly, P., & Deneubourg, J.-L. (2011). Individual Preferences and Social Interactions Determine the Aggregation of Woodlice. *PLoS ONE*, *6*(2), e17389. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017389

Dhinaut, J., Chogne, M., & Moret, Y. (2018). Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. *Journal of Animal Ecology*, *87*(2), 448-463. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661

DiAngelo, J. R., Bland, M. L., Bambina, S., Cherry, S., & Birnbaum, M. J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in Drosophila by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(49), 20853-20858. https://doi.org/10.1073/pnas.0906749106

Dillon, R. J., & Charnley, A. K. (1995). Chemical Barriers to Gut Infection in the Desert Locust : In Vivo Production of Antimicrobial Phenols Associated with the Bacterium Pantoea agglomerans. *Journal of Invertebrate Pathology*, *66*(1), 72-75. https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1063

Dishaw, L. J., Giacomelli, S., Melillo, D., Zucchetti, I., Haire, R. N., Natale, L., Russo, N. A., De Santis, R., Litman, G. W., & Pinto, M. R. (2011). A role for variable region-containing chitin-binding proteins (VCBPs) in host gut-bacteria interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(40), 16747-16752. https://doi.org/10.1073/pnas.1109687108

Dittmer, J., Beltran-Bech, S., Lesobre, J., Raimond, M., Johnson, M., & Bouchon, D. (2014). Host tissues as microhabitats for *Wolbachia* and quantitative insights into the bacterial community in terrestrial isopods. *Molecular Ecology*, *23*(10), 2619-2635. https://doi.org/10.1111/mec.12760

Dolar, A., Kostanjšek, R., Mayall, C., Drobne, D., & Kokalj, A. J. (2020). Modulations of immune parameters caused by bacterial and viral infections in the terrestrial crustacean Porcellio scaber : Implications for potential markers in environmental research. *Developmental & Comparative Immunology*, *113*, 103789. https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103789

Dong, Y., Taylor, H. E., & Dimopoulos, G. (2006). AgDscam, a Hypervariable Immunoglobulin Domain-Containing Receptor of the Anopheles gambiae Innate Immune System. *PLoS Biology*, *4*(7), e229. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229

Doums, C., Moret, Y., Benelli, E., & Schmid-Hempel, P. (2002). Senescence of immune defence in Bombus workers. *The Royal Entomological Society*, *27*, 138-144.

Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebrate Survival Journal*, 229-246 Pages. https://doi.org/10.25431/1824-307X/ISJ.V13I1.229-246

Dubuffet, A., Zanchi, C., Boutet, G., Moreau, J., Teixeira, M., & Moret, Y. (2015). Trans-generational Immune Priming Protects the Eggs Only against Gram-Positive Bacteria in the Mealworm Beetle. *PLOS Pathogens*, *11*(10), e1005178. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005178

Duffield, K. R., Bowers, E. K., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2017). A dynamic threshold model for terminal investment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(12), 185. https://doi.org/10.1007/s00265-017-2416-z

Duffield, K. R., Hampton, K. J., Houslay, T. M., Hunt, J., Rapkin, J., Sakaluk, S. K., & Sadd, B. M. (2018). Age-dependent variation in the terminal investment threshold in male crickets. *Evolution*, *72*(3), 578-589. https://doi.org/10.1111/evo.13443

Duneau, D., Ebert, D., & Du Pasquier, L. (2016). Infections by Pasteuria do not protect its natural host Daphnia magna from subsequent infections. *Developmental & Comparative Immunology*, *57*, 120-125. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.004

Dunlap, N. E., Benjamin, W. H., McCall, R. D., Tilden, A. B., & Briles, D. E. (1991). A 'safe-site' for Salmonella typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. *Microbial Pathogenesis*, *10*(4), 297-310. https://doi.org/10.1016/0882-4010(91)90013-Z

Durand, S., Grandjean, F., Giraud, I., Cordaux, R., Beltran-Bech, S., & Bech, N. (2019). Fine-scale population structure analysis in Armadillidium vulgare (Isopoda : Oniscidea) reveals strong female philopatry. *Acta Oecologica*, *101*, 103478. https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.103478

Durand, S., Loiseau, V., Prigot, C., Braquart-Varnier, C., & Beltran-Bech, S. (2018). Producing offspring in Armadillidium vulgare : Effects of genetic diversity and inbreeding. *Evolution & Development*, *20*(2), 65-77. https://doi.org/10.1111/ede.12248

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Kinga Lemieszek, M., Golec, M., & Milanowski, J. (2016). Pantoea agglomerans : A mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, *23*(2), 197-205. https://doi.org/10.5604/12321966.1203878

Dzik, J. M. (2010). The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochimica Polonica*, *57*(4), 443-466.

Eggert, H., Kurtz, J., & Diddens-de Buhr, M. F. (2014). Different effects of paternal trans-generational immune priming on survival and immunity in step and genetic offspring. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1797), 20142089. https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2089

Eguileor, M. de, & Ottaviani, E. (2011). The central role of immunity in the symbiotic event referred as parasitism. *Invertebrate Survival Journal*, *8*(2), 227-230.

Eleftherianos, I., Marokhazi, J., Millichap, P. J., Hodgkinson, A. J., Sriboonlert, A., ffrench-Constant, R. H., & Reynolds, S. E. (2006). Prior infection of Manduca sexta with non-pathogenic Escherichia coli elicits immunity to pathogenic Photorhabdus luminescens : Roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(6), 517-525. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.001

Eleftherianos, L., Atri, J., Accetta, J., & Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects : Guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology*, *4 MAR*(March), 1-10. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00046

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., & Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila. *Current Biology*, *10*(13), 781-784. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00569-8

Eom, J. S., Seok Kim, J., Im Jang, J., Kim, B.-H., Young Yoo, S., Hyeon Choi, J., Bang, I.-S., Lee, I. S., & Keun Park, Y. (2013). Enhancement of Host Immune Responses by Oral Vaccination to Salmonella enterica serovar Typhimurium Harboring Both FliC and FljB Flagella. *PLoS ONE*, *8*(9), e74850. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074850

Eppler, M. E., Grimes, E. A., Hedden, E. S., Hodoameda, P., & Jamie, M. (2020). *Host microbiota influences interactions between hosts and pathogens*. 1-25.

Faria, V. G., Martins, N. E., Paulo, T., Teixeira, L., Sucena, É., & Magalhães, S. (2015). Evolution of Drosophila resistance against different pathogens and infection routes entails no detectable maintenance costs : EVOLUTION OF RESISTANCE HAS NO MAINTENANCE COSTS. *Evolution*, *69*(11), 2799-2809. https://doi.org/10.1111/evo.12782

Faria, V. G., Martins, N. E., Schlötterer, C., & Sucena, É. (2018). Readapting to DCV infection without Wolbachia : Frequency changes of Drosophila antiviral alleles can replace endosymbiont protection. *Genome Biology and Evolution*, *10*(7), 1783-1791. https://doi.org/10.1093/gbe/evy137

Faulhaber, L. M., & Karp, R. D. (1992). A diphasic immune response against bacteria in the American cockroach. *Immunology*, *75*(2), 378-381.

Federici, B. A. (1980). Isolation of an iridovirus from two terrestrial isopods, the pill bug, Armadillidium vulgare, and the sow bug, Porcellio dilatatus. *Journal of Invertebrate Pathology*, *36*(3), 373-381. https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90041-5

Federici, B.A. 1984. Diseases of terrestrial isopods. Symp. Zool. Soc. Lond. 53: 233-245.

Feldhaar, H., & Gross, R. (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, *10*(9), 1082-1088. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010

Ferragut, C., Izard, D., Gavini, F., Lefebvre, B., & Leclerc, H. (1981). Buttiauxella, a new genus of the family Enterobacteraceae. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte Und Ökologische Mikrobiologie*, *2*(1), 33-44. https://doi.org/10.1016/S0721-9571(81)80016-6

Ferro, K., Peuß, R., Yang, W., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., & Kurtz, J. (2019). Experimental evolution of immunological specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(41), 20598-20604. https://doi.org/10.1073/pnas.1904828116

Flajnik, M. F. (2014). Re-evaluation of the Immunological Big Bang. *Current Biology*, *24*(21), R1060-R1065. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.070

Fox, C. W., & Czesak, M. E. (2000). Evolutionary Ecology of Progeny Size in Arthropods. *Annual Review of Entomology*, *45*(1), 341-369. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.341

Fox, J., & Weisberg, S. (2011). Cox Proportional-hazards regression for survival data in R. In : An R Companion to Appl Regression. In *An R Companion to Appl Regression* (Second Ed., p. 1-18).

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.-D., Özören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., & Núñez, G. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1β in salmonella-infected macrophages. *Nature Immunology*, *7*(6), 576-582. https://doi.org/10.1038/ni1346

Freitak, D., Ots, I., Vanatoa, A., & Hõrak, P. (2003). Immune response is energetically costly in white cabbage butterfly pupae. *Proceedings. Biological Sciences*, *270 Suppl 2*, S220-222. https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0069

Freitak, D., Schmidtberg, H., Dickel, F., Lochnit, G., Vogel, H., & Vilcinskas, A. (2014). The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence*, *5*(4), 547-554. https://doi.org/10.4161/viru.28367

Fu, L.-L., Li, T.-P., & Wang, Y. (2016). Potential role of LvDscam in specific immune response of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus by oral delivery of VP28 using *Bacillus subtilis*. *Aquaculture Research*, *47*(7), 2068-2079. https://doi.org/10.1111/are.12661

Fu, Z. Q., & Dong, X. (2013). Systemic Acquired Resistance : Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 839-863. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606

Fugmann, S. D. (2018). Invertebrate Adaptive Immunology. In *Reference Module in Life Sciences* (p. B9780128096338207000). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20729-2

Futo, M., Armitage, S. A. O., & Kurtz, J. (2016). Microbiota plays a role in oral immune priming in Tribolium castaneum. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN), 1-10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01383

Garbutt, J. S., O'Donghue, A. J. P., McTaggart, S. J., Wilson, P. J., & Little, T. J. (2014). The development of pathogen resistance in *Daphnia magna* : Implications for disease spread in age-structured populations. *Journal of Experimental Biology*, jeb.111260. https://doi.org/10.1242/jeb.111260

Gardiner, C. M., & Mills, K. H. G. (2016). The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. *Seminars in Immunology*, *28*(4), 343-350. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.001

Geddes, K., Cruz, F., & Heffron, F. (2007). Analysis of Cells Targeted by Salmonella Type III Secretion In Vivo. *PLoS Pathogens*, *3*(12), e196. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030196

Gegner, J., Baudach, A., Mukherjee, K., Halitschke, R., Vogel, H., & Vilcinskas, A. (2019). Epigenetic Mechanisms Are Involved in Sex-Specific Trans-Generational Immune Priming in the Lepidopteran Model Host Manduca sexta. *Frontiers in Physiology*, *10*, 137. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00137

Genty, L.-M., Bouchon, D., Raimond, M., & Bertaux, J. (2014). Wolbachia Infect Ovaries in the Course of Their Maturation : Last Minute Passengers and Priority Travellers? *PLoS ONE*, *9*(4), e94577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094577

Gerardo, N. M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, M., Vos, M. D., Duncan, E., Evans, J. D., & Ghanim, M. (2010). Immunity and other defenses in pea aphids. *Genome Biology*, *11*(R21), 1-17.

Gerardo, N. M., & Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies : An ecological and evolutionary framework. *Current Opinion in Insect Science*, *4*(1), 8-14. https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.002

Gest, H. (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes and Records of the Royal Society of London*, *58*(2), 187-201. https://doi.org/10.1098/rsnr.2004.0055

Ghosh, J., Lun, C. M., Majeske, A. J., Sacchi, S., Schrankel, C. S., & Smith, L. C. (2011). Invertebrate immune diversity. *Developmental & Comparative Immunology*, *35*(9), 959-974. https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.12.009

Ghosh, W., Bagchi, A., Mandal, S., Dam, B., & Roy, P. (2005). Tetrathiobacter kashmirensis gen. Nov., sp. Nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(5), 1779-1787. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63595-0

Gilbert, J. D. J., & Manica, A. (2010). Parental Care Trade-Offs and Life-History Relationships in Insects. *The American Naturalist*, *176*(2), 212-226. https://doi.org/10.1086/653661

Glaser, R. W. (1925) Acquired immunity in silkworms. J. Immunol., 10, 651-662.

Glenner, H., Thomsen, P. F., Hebsgaard, M. B., Sørensen, M. V., & Willerslev, E. (2006). The Origin of Insects. *Science*, *314*(5807), 1883-1884. https://doi.org/10.1126/science.1129844

González-Tokman, D. M., González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2013). Mating success and energetic condition effects driven by terminal investment in territorial males of a short-lived invertebrate. *Functional Ecology*, *27*(3), 739-747. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12072

González-Tokman, D. M., González-Santoyo, I., Lanz-Mendoza, H., & Córdoba Aguilar, A. (2010). Territorial damselflies do not show immunological priming in the wild. *Physiological Entomology*, *35*(4), 364-372. https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2010.00752.x

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G. J. M., Van Der Meer, J. W. M., Conrath, U., & Netea, M. G. (2018). Innate immune memory : An evolutionary perspective. *Immunological Reviews*, *283*(1), 21-40. https://doi.org/10.1111/imr.12647

Graham, R. I., Grzywacz, D., Mushobozi, W. L., & Wilson, K. (2012). *Wolbachia* in a major African crop pest increases susceptibility to viral disease rather than protects. *Ecology Letters*, *15*(9), 993-1000. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01820.x

Green, T. J., & Montagnani, C. (2013). Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1 µvar). *Fish & Shellfish Immunology*, *35*(2), 382-388. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.051

Greenwood, J. M., Milutinović, B., Peuß, R., Behrens, S., Esser, D., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., & Kurtz, J. (2017). Oral immune priming with Bacillus thuringiensis induces a shift in the gene expression of Tribolium castaneum larvae. *BMC Genomics*, *18*(1), 329. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3705-7

Grissa, I., Vergnaud, G., & Pourcel, C. (2007). The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, *8*(1), 172. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-172

Grosholz, E. D. (1993). The influence of habitat heterogeneity on host-pathogen population dynamics. *Oecologia*, *96*(3), 347-353. https://doi.org/10.1007/BF00317504

Gross, R., Vavre, F., Heddi, A., Hurst, G. D. D., Zchori-Fein, E., & Bourtzis, K. (2009). Immunity and symbiosis. *Molecular Microbiology*, *73*(5), 751-759. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06820.x

Gross, T., Faull, J., Ketteridge, S., & Springham, D. (1995). Introduction to the microbial world. In T. Gross, J. Faull, S. Ketteridge, & D. Springham, *Introductory Microbiology* (p. 1-11). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7194-4_1

Gupta, V., Venkatesan, S., Chatterjee, M., Syed, Z. A., Nivsarkar, V., & Prasad, N. G. (2016). No apparent cost of evolved immune response in Drosophila melanogaster : BRIEF COMMUNICATION. *Evolution*, *70*(4), 934-943. https://doi.org/10.1111/evo.12896

Hamel, S., Gaillard, J.-M., Yoccoz, N. G., Loison, A., Bonenfant, C., & Descamps, S. (2010). Fitness costs of reproduction depend on life speed : Empirical evidence from mammalian populations: Fitness costs of reproduction in mammals. *Ecology Letters*, *13*(7), 915-935. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01478.x

Hamel, S., Yoccoz, N. G., & Gaillard, J.-M. (2014). A standardized approach to estimate life history tradeoffs in evolutionary ecology. *Oikos*, *123*(2), 151-160. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2013.00819.x

Hamilton, P. T., & Perlman, S. J. (2013). Host Defense via Symbiosis in Drosophila. *PLoS Pathogens*, *9*(12), 1-4. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003808

Hanington, P. C., & Zhang, S.-M. (2011). The Primary Role of Fibrinogen-Related Proteins in Invertebrates Is Defense, Not Coagulation. *Journal of Innate Immunity*, *3*(1), 17-27. https://doi.org/10.1159/000321882

Hanson, M. A., Dostálová, A., Ceroni, C., Poidevin, M., Kondo, S., & Lemaitre, B. (2019). Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach. *ELife*, *8*, e44341. https://doi.org/10.7554/eLife.44341

Harrell, F. E. (2015). Binary Logistic Regression. In Harrell Frank E., *Regression Modeling Strategies* (p. 219-274). Springer International Publishing. http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-19425-7_10

Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E. D., Robinson, B. S., Hodgson, D. J., & Inger, R. (2018). A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ*, *6*, e4794. https://doi.org/10.7717/peerj.4794

Hartman, R. S., & Karp, R. D. (1989). SHORT-TERM IMMUNOLOGIC MEMORY IN THE ALLOGRAFT RESPONSE OF THE AMERICAN COCKROACH, PERIPLANETA AMERICANA: *Transplantation*, *47*(5), 920-921. https://doi.org/10.1097/00007890-198905000-00042

Hassall, M., Helden, A., Goldson, A., & Grant, A. (2005). Ecotypic differentiation and phenotypic plasticity in reproductive traits of Armadillidium vulgare (Isopoda : Oniscidea). *Oecologia*, *143*(1), 51-60. https://doi.org/10.1007/s00442-004-1772-3

Hauton, C. (2017). Recent progress toward the identification of anti-viral immune mechanisms in decapod crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*, *147*, 111-117. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.002

Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., & Johnson, K. N. (2008). Wolbachia and Virus Protection in Insects. *Science*, *322*(5902), 702-702. https://doi.org/10.1126/science.1162418

Helfand, Stephen L.; Rogina, Blanka (2003). Genetics of Aging in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. Annual Review of Genetics, 37(1), 329–348. doi:10.1146/annurev.genet.37.040103.095211

Herbinière, J. (2005). *Contribution à la mise en évidence des effecteurs impliqués dans l'immunité innée d'Armadillidium vulgare, crustacé isopode terrestre infecté par une bactérie du genre Wolbachia* [Université de Poitiers]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00011699

Herbinière, J., Braquart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.-M., Frère, J., Van Dorsselaer, A., & Martin, G. (2005). Armadillidin : A novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse Armadillidium vulgare (Terrestrial Isopod, Crustacean). *Developmental & Comparative Immunology*, *29*(6), 489-499. https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.11.001

Herbinière, J., Grève, P., Strub, J.-M., Thiersé, D., Raimond, M., van Dorsselaer, A., Martin, G., & Braquart-Varnier, C. (2008). Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean Armadillidium vulgare,. *Developmental & Comparative Immunology*, *32*(8), 875-882. https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.007

Hernandez, R. J., Hesse, E., Dowling, A. J., Coyle, N. M., Feil, E. J., Gaze, W. H., & Vos, M. (2019). Using the wax moth larva *Galleria mellonella* infection model to detect emerging bacterial pathogens. *PeerJ*, *6*, e6150. https://doi.org/10.7717/peerj.6150

Herran, B., Geniez, S., Delaunay, C., Raimond, M., Lesobre, J., Bertaux, J., Slatko, B., & Grève, P. (2020). The shutting down of the insulin pathway : A developmental window for Wolbachia load and feminization. *Scientific Reports*, *10*(1), 10551. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67428-1

Hertel, L. A., Adema, C. M., & Loker, E. S. (2005). Differential expression of FREP genes in two strains of Biomphalaria glabrata following exposure to the digenetic trematodes Schistosoma mansoni and Echinostoma paraensei. *Developmental & Comparative Immunology*, *29*(4), 295-303. https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.08.003

Hess, R. T., & Poinar, G. O. (1985). Iridoviruses Infecting Terrestrial Isopods and Nematodes. In D. B. Willis (Éd.), *Iridoviridae* (Vol. 116, p. 49-76). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70280-8_4

Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Buckley, K. M., Brockton, V., Nair, S. V., Berney, K., Fugmann, S. D., Anderson, M. K., Pancer, Z., Cameron, R. A., Smith, L. C., & Rast, J. P. (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*, *300*(1), 349-365. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.065

Hildemann, W. H., Johnston, I. S., & Jokiel, P. L. (1979). Immunocompetence in the Lowest Metazoan Phylum : Transplantation Immunity in Sponges. *Science*, *204*(4391), 420-422. https://doi.org/10.1126/science.441730

Hildemann, W. H., Raison, R. L., Cheung, G., Hull, C. J., Akaka, L., & Okamoto, J. (1977). Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. *Nature*, *270*(5634), 219-223. https://doi.org/10.1038/270219a0

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: Wolbachia infection rates. *FEMS Microbiology Letters*, *281*(2), 215-220. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x

Hillesland, H., Read, A., Subhadra, B., Hurwitz, I., McKelvey, R., Ghosh, K., Das, P., & Durvasula, R. (2008). Identification of aerobic gut bacteria from the kala azar vector, Phlebotomus argentipes : A platform for potential paratransgenic manipulation of sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *79*(6), 881-886.

Holden, D. W. (2002). Trafficking of the *Salmonella* Vacuole in Macrophages : **Trafficking of the *Salmonella* Vacuole in Macrophages** . *Traffic*, *3*(3), 161-169. https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030301.x

Hornung, E. (2011). Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life : Structure, physiology and behavior. *Terrestrial Arthropod Reviews*, *4*(2), 95-130. https://doi.org/10.1163/187498311X576262

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., & Fukatsu, T. (2010). Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(2), 769-774. https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107

Howard, H. W. (1980). The Distribution at Breeding Time of the Sexes of the Woodlouse, Armadillidium vulgare (Latreille, 1802) (Isopoda). *Crustaceana*, *39*(1), 52-58. JSTOR.

Huang, Y., & Ren, Q. (2020). Research progress in innate immunity of freshwater crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, *104*, 103569. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103569

Hube, B. (2004). From commensal to pathogen : Stage- and tissue-specific gene expression of Candida albicans. *Current Opinion in Microbiology*, *7*(4), 336-341. https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.003

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 Pathogens*, *7*(5), e1002043. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002043

Humphries, A. D., Townsend, S. M., Kingsley, R. A., Nicholson, T. L., Tsolis, R. M., & BÃ¤umler, A. J. (2001). Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of Salmonella serovars. *FEMS Microbiology Letters*, *201*(2), 121-125. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10744.x

Ikeda, J. S., Schmitt, C. K., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S., Adams, P., O'Connor, C. D., & O'Brien, A. D. (2001). Flagellar Phase Variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

Contributes to Virulence in the Murine Typhoid Infection Model but Does Not Influence *Salmonella* -Induced Enteropathogenesis. *Infection and Immunity*, *69*(5), 3021-3030. https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3021-3030.2001

Ikeda, T., Ishikawa, H., & Sasaki, T. (2003). Infection density of Wolbachia and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, Ephestia kuehniella. *Journal of Invertebrate Pathology*, *84*(1), 1-5. https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00106-X

Institute of Medicine (US) Forum on Emerging Infections; Knobler SL, Lemon SM, Najafi M, et al., editors. The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors: Implications for Human Health and Strategies for Containment: Workshop Summary. Washington (DC): National Academies Press (US); 2003. 3, Vector Resistance. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97131/

Ishimaru, C. A. (1988). Multiple Antibiotic Production by *Erwinia herbicola*. *Phytopathology*, *78*(6), 746. https://doi.org/10.1094/Phyto-78-746

Ishimori, N. (1924) Sur l'immunisation des chenilles. Compt. rend. soc. biol., 90, 843- 845.

Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J., & Brinkhof, M. W. G. (2005). Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1558), 63-69. https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2919

Jaenicke, E., Fraune, S., May, S., Irmak, P., Augustin, R., Meesters, C., Decker, H., & Zimmer, M. (2009). Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice? *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(10), 1055-1063. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.05.005

Jancovich, J. K., Chinchar, V., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T., & Zhang, Q. Y. (2012). Family Iridoviridae. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 193-210.

Janeway, C. A. (1989). Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *54*(0), 1-13. https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003

Janeway, C. A. (2001). How the immune system works to protect the host from infection : A personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(13), 7461-7468. https://doi.org/10.1073/pnas.131202998

Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*(1), 197-216. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Janssens, S., & Beyaert, R. (2003). Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clinical Microbiology Reviews*, *16*(4), 637-646. https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.637-646.2003

Jehan, C., Chogne, M., Rigaud, T., & Moret, Y. (2020). Sex-specific patterns of senescence in artificial insect populations varying in sex-ratio to manipulate reproductive effort. *BMC Evolutionary Biology*, *20*(1), 18. https://doi.org/10.1186/s12862-020-1586-x

Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, *191*(1-3), 45-52. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X

Johnson, P. T. J., Rohr, J. R., Hoverman, J. T., Kellermanns, E., Bowerman, J., & Lunde, K. B. (2012). Living fast and dying of infection : Host life history drives interspecific variation in infection and disease risk: Living fast and dying of infection. *Ecology Letters*, *15*(3), 235-242. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01730.x

Jouvin Marche, E. (2011). Jules Hoffmann, un « grand monsieur » : Prix Nobel de Médecine 2011 : Bruce A. Beutler, Jules A. Hoffmann et Ralph M. Steinman. *médecine/sciences*, *27*(11), 1025-1027. https://doi.org/10.1051/medsci/20112711021

Kamaladevi, A., & Balamurugan, K. (2015). Role of PMK-1/p38 MAPK defense in Caenorhabditis elegans against Klebsiella pneumoniae infection during host–pathogen interaction. *Pathogens and Disease*, *73*(5). https://doi.org/10.1093/femspd/ftv021

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. https://doi.org/10.1126/science.1177531

Kankamol, C., & Salaenoi, J. (2018). Enzymes involved in immunity and characteristics of hemolymph in red sternum syndrome mud crabs (Scylla serrata). *Agriculture and Natural Resources*, *52*(5), 489-496. https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.012

Karunasagar, I., Krohne, G., & Goebel, W. (1993). Listeria ivanovii is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. *Infection and Immunity*, *61*(1), 162-169. https://doi.org/10.1128/iai.61.1.162-169.1993

Kaufmann, E., Sanz, J., Dunn, J. L., Khan, N., Mendonça, L. E., Pacis, A., Tzelepis, F., Pernet, E., Dumaine, A., Grenier, J.-C., Mailhot-Léonard, F., Ahmed, E., Belle, J., Besla, R., Mazer, B., King, I. L., Nijnik, A., Robbins, C. S., Barreiro, L. B., & Divangahi, M. (2018). BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell*, *172*(1-2), 176-190.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.031

Kaufmann, S. H. E. (2008). Immunology's foundation : The 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology*, *9*(7), 705-712. https://doi.org/10.1038/ni0708-705

Kavanagh, K., & Reeves, E. P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, *28*(1), 101-112. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461

Kelly, C. D. (2011). Reproductive and physiological costs of repeated immune challenges in female Wellington tree weta (Orthoptera : Anostostomatidae): IMMUNE CHALLENGES IN FEMALE TREE WETA. *Biological Journal of the Linnean Society*, *104*(1), 38-46. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01714.x

Kelly, J., & Kavanagh, K. (2011). Caspofungin primes the immune response of the larvae of Galleria mellonella and induces a non-specific antimicrobial response. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(2), 189-196. https://doi.org/10.1099/jmm.0.025494-0

Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., Pfeffer, S., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2013). Broad RNA Interference–Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, *190*(2), 650-658. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102486

Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2016). Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. *Ecology and Evolution*, *6*(21), 7847-7855. https://doi.org/10.1002/ece3.2532

Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2017). Experimental evolution of insect immune memory versus pathogen resistance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *284*(1869), 20171583. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1583

Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2019). Pathogen susceptibility and fitness costs explain variation in immune priming across natural populations of flour beetles. *Journal of Animal Ecology*, *88*(9), 1332-1342. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13030

Kim, C. S., Kosuke, Z., Nam, Y. K., Kim, S. K., & Kim, K. H. (2007). Protection of shrimp (Penaeus chinensis) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology*, *23*(1), 242-246. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.012

Kim, J. K., Lee, J. B., Huh, Y. R., Jang, H. A., Kim, C., Yoo, J. W., & Lee, B. L. (2015). Burkholderia gut symbionts enhance the innate immunity of host Riptortus pedestris. *Developmental & Comparative Immunology*, *53*(1), 265-269. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.006

Kim, S.-H., Roh, K. H., Yoon, Y. K., Kang, D. O., Lee, D. W., Kim, M. J., & Sohn, J. W. (2012). Necrotizing fasciitis involving the chest and abdominal wall caused by Raoultella planticola. *BMC Infectious Diseases*, *12*(1), 59. https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-59

King, K. C., Brockhurst, M. A., Vasieva, O., Paterson, S., Betts, A., Ford, S. A., Frost, C. L., Horsburgh, M. J., Haldenby, S., & Hurst, G. D. D. (2016). Rapid evolution of microbe-mediated protection against pathogens in a worm host. *ISME Journal*, *10*(8), 1915-1924. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.259

Klein, J. (1989). Are Invertebrates Capable of Anticipatory Immune Responses? *Scandinavian Journal of Immunology*, *29*(5), 499-505. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1989.tb01152.x

Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626-638. https://doi.org/10.1038/nri.2016.90

Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Joosten, L. A. B., Ifrim, D. C., Saeed, S., Jacobs, C., van Loenhout, J., de Jong, D., Stunnenberg, H. G., Xavier, R. J., van der Meer, J. W. M., van Crevel, R., & Netea, M. G. (2012). Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(43), 17537-17542. https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109

Knobler, S. L., Lemon, S. M., Najafi, M., & Burroughs, T. (2003). Vector Resistance. In *The Resistance Phenomenon in Microbes and Infectious Disease Vectors : Implications for Human Health and Strategies for Containment : Workshop Summary*. National Academies Press (US). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97131/

Kobayashi, M., Johansson, M. W., & Söderhäll, K. (1990). The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell and Tissue Research*, *260*(1), 13-18. https://doi.org/10.1007/BF00297485

Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2012). Gut microbiota instead of host genotype drive the specificity in the interaction of a natural host-parasite system. *Ecology Letters*, *15*(10), 1095-1103. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01831.x

Koch, L. K., & Meunier, J. (2014). Mother and offspring fitness in an insect with maternal care : Phenotypic trade-offs between egg number, egg mass and egg care. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 125. https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-125

Kölliker, M. (2007). Benefits and costs of earwig (Forficula auricularia) family life. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *61*(9), 1489-1497. https://doi.org/10.1007/s00265-007-0381-7

Kostanjšek, R., & Pirc Marolt, T. (2015). Pathogenesis, tissue distribution and host response to Rhabdochlamydia porcellionis infection in rough woodlouse Porcellio scaber. *Journal of Invertebrate Pathology*, *125*, 56-67. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.01.001

Kostanjšek, R., Štrus, J., Drobne, D., & Avguštin, G. (2004). 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod Porcellio scaber (Crustacea : Isopoda). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(2), 543-549. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02802-0

Kowalevsky, A. (1895) Etude des glandes lymphatiques des quelques myriapodes. Arch. zool. exptl. et gen., 23, 591-616.

Kudo, S. (2006). Within-clutch egg-size variation in a subsocial bug : The positional effect hypothesis. *Canadian Journal of Zoology*, *84*(11), 1540-1544. https://doi.org/10.1139/z06-163

Kulkarni, A., Pandey, A., Trainor, P., Carlisle, S., Chhilar, J. S., Yu, W., Moon, A., & Xu, J. (2021). Trained Immunity in Anopheles gambiae : Antibacterial Immunity Is Enhanced by Priming via Sugar Meal Supplemented With a Single Gut Symbiotic Bacterial Strain. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 649213. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649213

Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, *26*(4), 186-192. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001

Kurtz, J., & Armitage, S. (2006). Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends in Immunology*, *27*(11), 493-496. https://doi.org/10.1016/j.it.2006.09.001

Kurtz, J., Schneider, W., & Reinhold, K. (2002). *Immune defence, dispersal and local adaptation*.

Kurtz, J., Wiesner, A., Götz, P., & Sauer, K. P. (2000). Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly Panorpa vulgaris (Insecta : Mecoptera). *Developmental and Comparative Immunology*, *24*(1), 1-12. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00057-9

Kutzer, M. A. M., Kurtz, J., & Armitage, S. A. O. (2019). A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. *Journal of Animal Ecology*, *88*(4), 566-578. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953

Lachat, M. (2009). Impact de deux souches de Wolbachia sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes Armadillidium vulgare. PhD thesis Université de Poitiers, Ecole doctorale ICBG.

Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pauletto, M., Segarra, A., Gourbal, B., & Montagnani, C. (2017). Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Scientific reports*, *7*(1), 13143. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13564-0

Lafont, M., Vergnes, A., Vidal-Dupiol, J., de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Haffner, P., Petton, B., Chaparro, C., Barrachina, C., Destoumieux-Garzon, D., Mitta, G., Gourbal, B., & Montagnani, C. (2020). A Sustained Immune Response Supports Long-Term Antiviral Immune Priming in the Pacific Oyster, Crassostrea gigas. *MBio*, *11*(2). https://doi.org/10.1128/mBio.02777-19

Landmann, F., Bain, O., Martin, C., Uni, S., Taylor, M. J., & Sullivan, W. (2012). Both asymmetric mitotic segregation and cell-to-cell invasion are required for stable germline transmission of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Biology Open*, *1*(6), 536-547. https://doi.org/10.1242/bio.2012737

Lanz-Mendoza, H., & Garduño, J. C. (2018). Insect Innate Immune Memory. In E. L. Cooper (Éd.), *Advances in Comparative Immunology* (p. 193-211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_9

Lawlor, L. R. (1976). Molting, Growth and Reproductive Strategies in the Terrestrial Isopod, Armadillidium vulgare. *Ecology*, *57*(6), 1179-1194. https://doi.org/10.2307/1935043

Lawniczak, M., Barnes, A., Linklater, J., Boone, J., Wigby, S., & Chapman, T. (2007). Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*(1), 48-55. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.012

Leclercq, S., Thézé, J., Chebbi, M. A., Giraud, I., Moumen, B., Ernenwein, L., Grève, P., Gilbert, C., & Cordaux, R. (2016). Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(52), 15036-15041. https://doi.org/10.1073/pnas.1608979113

Lee, S. Y., & Söderhäll, K. (2002). Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, *12*(5), 421-437. https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0420

Lefebvre, F. (2002). *Stratégies de reproduction chez les crustacés isopodes terrestres* [Theses, Université de Poitiers]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00340823

Leitner, W. W., Ying, H., & Restifo, N. P. (1999). DNA and RNA-based vaccines : Principles, progress and prospects. *Vaccine*, *18*(9-10), 765-777. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00271-6

Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, *25*(1), 697-743. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615

Lemaître, J.-F., Berger, V., Bonenfant, C., Douhard, M., Gamelon, M., Plard, F., & Gaillard, J.-M. (2015). Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1806). https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0209

Lenth, R. V. (2016). Least-Squares Means : The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, *69*(1). https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01

Léonard, P. M., Adema, C. M., Zhang, S.-M., & Loker, E. S. (2001). Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail Biomphalaria glabrata. *Gene*, *269*(1-2), 155-165. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00444-9

Lewis, J. T. (1941). The Principles and Practice of Diphtheria Immunization. *The Principles and Practice of Diphtheria Immunization.*

Li, G., Xiang, Y., Sabapathy, K., & Silverman, R. H. (2004). An Apoptotic Signaling Pathway in the Interferon Antiviral Response Mediated by RNase L and c-Jun NH2-terminal Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(2), 1123-1131. https://doi.org/10.1074/jbc.M305893200

Lillard, H. S. (1986). Role of Fimbriae and Flagella in the Attachment of Salmonella typhimurium to Poultry Skin. *Journal of Food Science*, *51*(1), 54-56. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb10834.x

Lin, Y.-C., Chen, J.-C., Morni, W. Z. W., Putra, D. F., Huang, C.-L., Li, C.-C., & Hsieh, J.-F. (2013). Vaccination Enhances Early Immune Responses in White Shrimp Litopenaeus vannamei after Secondary Exposure to Vibrio alginolyticus. *PLoS ONE*, *8*(7), e69722. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069722

Litman, G., Dishaw, L., Cannon, J., Haire, R., & Rast, J. (2007). Alternative mechanisms of immune receptor diversity. *Current Opinion in Immunology*, *19*(5), 526-534. https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.001

Little, T. J., & Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(2), 58-60. https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011

Liu, H., Söderhäll, K., & Jiravanichpaisal, P. (2009). Antiviral immunity in crustaceans. *Fish & Shellfish Immunology*, *27*(2), 79-88. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.02.009

Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology : Just what is the cost of immunity? *Oikos*, *88*(1), 87-98. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x

Loiseau, V., Giraud, I., Federici, B., Bigot, Y., Cordaux, R., & Gilbert, C. (2017). Iridovirus IIV31 : Un pathogène d'isopodes terrestres remarquable. *Virologie (Montrouge, France)*, *21*(3), 147-149. https://doi.org/10.1684/vir.2017.0694

Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S.-M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems—Not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*, *198*(1), 10-24. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x

Loncaric, I., Heigl, H., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H.-J., & Rosengarten, R. (2009). Typing of *Pantoea agglomerans* isolated from colonies of honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey. *Apidologie*, *40*(1), 40-54. https://doi.org/10.1051/apido/2008062

Longdon, B., Cao, C., Martinez, J., & Jiggins, F. M. (2013). Previous Exposure to an RNA Virus Does Not Protect against Subsequent Infection in Drosophila melanogaster. *PLoS ONE*, *8*(9), e73833. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073833

Lood, R., Waldetoft, K. W., & Nordenfelt, P. (2015). Localization-triggered bacterial pathogenesis. *Future Microbiology*, *10*(10), 1659-1668. https://doi.org/10.2217/fmb.15.89

Lopez, S. (1998). Acquired Resistance Affects Male Sexual Display and Female Choice in Guppies. *Proceedings: Biological Sciences*, *265*(1397), 717-723.

López-Madrigal, S., & Duarte, E. H. (2019). Titer regulation in arthropod-Wolbachia symbioses. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(23), 1-30. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz232

Lu, P., Bian, G., Pan, X., & Xi, Z. (2012). Wolbachia Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(7), e1754. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754

Łukasik, P., van Asch, M., Guo, H., Ferrari, J., & Charles J. Godfray, H. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecology Letters*, *16*(2), 214-218. https://doi.org/10.1111/ele.12031

Lukhtanov, V. A., & Kuznetsova, V. G. (2010). What genes and chromosomes say about the origin and evolution of insects and other arthropods. *Russian Journal of Genetics*, *46*(9), 1115-1121. https://doi.org/10.1134/S1022795410090279

Luo, Y., Cook, E., Fries, B. C., & Casadevall, A. (2006). Phagocytic efficacy of macrophage-like cells as a function of cell cycle and Fcγ receptors (FcγR) and complement receptor (CR)3 expression. *Clinical and Experimental Immunology*, *145*(2), 380-387. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03132.x

Lupetti, P., Montesanto, G., Ciolfi, S., Marri, L., Gentile, M., Paccagnini, E., & Lombardo, B. M. (2013). Iridovirus infection in terrestrial isopods from Sicily (Italy). *Tissue and Cell*, *45*(5), 321-327. https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.05.001

Luu, H., & Tate, A. T. (2017). Recovery and immune priming modulate the evolutionary trajectory of infection-induced reproductive strategies. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(9), 1748-1762. https://doi.org/10.1111/jeb.13138

Ma, L., Zhang, G., & Doyle, M. P. (2011). Green Fluorescent Protein Labeling of Listeria, Salmonella, and Escherichia coli O157:H7 for Safety-Related Studies. *PLoS ONE*, *6*(4), e18083. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018083

Mackenzie, D. K., Bussière, L. F., & Tinsley, M. C. (2011). Senescence of the cellular immune response in Drosophila melanogaster. *Experimental Gerontology*, *46*(11), 853-859. https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.07.004

Mackey, D., & McFall, A. J. (2006). MAMPs and MIMPs : Proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, *61*(6), 1365-1371. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05311.x

Maftuch, null, Prasetio, E., Sudianto, A., Rozik, M., Nurdiyani, R., Sanusi, E., Nursyam, H., Fariedah, F., Marsoedi, null, & Murachman, null. (2013). Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (Penaeus monodon Fab.) by intramuscular administration of the outer membrane protein Vibrio alginolyticus. *SpringerPlus*, *2*, 432. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-432

Marina, C. F., Arredondo-Jiménez, J. I., Castillo, A., & Williams, T. (1999). Sublethal effects of iridovirus disease in a mosquito. *Oecologia*, *119*(3), 383-388. https://doi.org/10.1007/s004420050799

Marina, C. F., Ibarra, J. E., Arredondo-Jiménez, J. I., Fernández-Salas, I., Liedo, P., & Williams, T. (2003). Adverse ffects of covert iridovirus infection on life history and demographic parameters of *Aedes aegypti* : *Iridovirus infection of* Aedes agypti. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *106*(1), 53-61. https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00010.x

Marrack, P., Scott-Browne, J., & MacLeod, M. K. L. (2010). Terminating the immune response : Terminating the immune response. *Immunological Reviews*, *236*(1), 5-10. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00928.x

Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2010). CRISPR interference : RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(3), 181-190. https://doi.org/10.1038/nrg2749

Martinez, J., Ok, S., Smith, S., Snoeck, K., Day, J. P., & Jiggins, F. M. (2015). Should Symbionts Be Nice or Selfish ? Antiviral Effects of Wolbachia Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not. *PLoS Pathogens*, *11*(7), 1-20. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005021

Martins, N. E., Faria, V. G., Teixeira, L., Magalhães, S., & Sucena, É. (2013). Host Adaptation Is Contingent upon the Infection Route Taken by Pathogens. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003601. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003601

Mason, K. L., Stepien, T. A., Blum, J. E., Holt, J. F., Labbe, N. H., Rush, J. S., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2011). From Commensal to Pathogen : Translocation of Enterococcus faecalis from the Midgut to the Hemocoel of *Manduca sexta*. *MBio*, *2*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00065-11

Matzinger, P. (2002). The Danger Model : A Renewed Sense of Self. *Science*, *296*(5566), 301-305. https://doi.org/10.1126/science.1071059

Matzinger, P. (2007). Friendly and dangerous signals : Is the tissue in control? *Nature Immunology*, *8*(1), 11-13. https://doi.org/10.1038/ni0107-11

May, R. C. (2007). Gender, immunity and the regulation of longevity. *BioEssays*, *29*(8), 795-802. https://doi.org/10.1002/bies.20614

Maya-Maldonado, K., Cime-Castillo, J., Maya-Lucas, O., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M. C., & Lanz-Mendoza, H. (2021). Transcriptome analysis uncover differential regulation in cell cycle, immunity, and metabolism in Anopheles albimanus during immune priming with Plasmodium berghei. *Developmental & Comparative Immunology*, *120*, 104046. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104046

Mayer, A., Mora, T., Rivoire, O., & Walczak, A. M. (2016). Diversity of immune strategies explained by adaptation to pathogen statistics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(31), 8630-8635. https://doi.org/10.1073/pnas.1600663113

McCarville, J., & Ayres, J. (2018). Disease tolerance : Concept and mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, *50*, 88-93. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.12.003

McGinley, M. A. (1989). The influence of a positive correlation between clutch size and offspring fitness on the optimal offspring size. *Evolutionary Ecology*, *3*(2), 150-156. https://doi.org/10.1007/BF02270917

McLaren, M. R., & Callahan, B. J. (2020). Pathogen resistance may be the principal evolutionary advantage provided by the microbiome : Pathogen resistance by the microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1808). https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0592rstb20190592

McNamara, K. B., van Lieshout, E., & Simmons, L. W. (2014). The effect of maternal and paternal immune challenge on offspring immunity and reproduction in a cricket. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(6), 1020-1028. https://doi.org/10.1111/jeb.12376

Medawar, P. B. (1944). The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits : A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *Journal of Anatomy*, *78*(Pt 5), 176-199.

Medawar, P. B. (1945). A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits : A Report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *Journal of Anatomy*, *79*(Pt 4), 157-176.4.

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity : Impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology*, *9*(1), 4-9. https://doi.org/10.1016/S0952-7915(97)80152-5

Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2002). Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*, *296*(5566), 298-300. https://doi.org/10.1126/science.1068883

Medzhitov, R., & Janeway, CharleS. J. (2000). Innate immune recognition : Mechanisms and pathways: Innate immune recognition. *Immunological Reviews*, *173*(1), 89-97. https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x

Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease Tolerance as a Defense Strategy. *Science*, *335*(6071), 936-941. https://doi.org/10.1126/science.1214935

Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, *431*(7006), 343-349. https://doi.org/10.1038/nature02873

Mejía-Ruíz, C. H., Vega-Peña, S., Alvarez-Ruiz, P., & Escobedo-Bonilla, C. M. (2011). Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of Litopenaeus vannamei to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of Invertebrate Pathology*, *107*(1), 65-68. https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.002

Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., & Boraschi, D. (2018). Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans : A Critical Appraisal. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1915. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915

Meriggi, N., Di Paola, M., Vitali, F., Rivero, D., Cappa, F., Turillazzi, F., Gori, A., Dapporto, L., Beani, L., Turillazzi, S., & Cavalieri, D. (2019). Saccharomyces cerevisiae Induces Immune Enhancing and Shapes Gut Microbiota in Social Wasps. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2320. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02320

Metalnikoff, S. (1920). Immunite naturelle et acquise des chenilles de Galleria mellonella. Compt. rend soc. biol., 83,817-820.

Metalnikoff, S. AND Gaschen, H. (1921) Sur la rapidite d'immunisation chez la chenille de Galleria mellonella. Compt. rend. soc. biol., 85, 224-226.

Metcalf, C. J. E., Roth, O., & Graham, A. L. (2020). Why leveraging sex differences in immune trade-offs may illuminate the evolution of senescence. *Functional Ecology*, *34*(1), 129-140. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13458

Metchnikoff, E. (1884). Classics in infectious diseases. Concerning the relationship between phagocytes and anthrax bacilli. *Reviews of Infectious Diseases*, *6*(5), 761-770.

Metchnikoff, E. (1905) Immunity in infective diseases. Translated by F. G. Binnie. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Meunier, J., Wong, J. W. Y., Gómez, Y., Kuttler, S., Röllin, L., Stucki, D., & Kölliker, M. (2012). One clutch or two clutches? Fitness correlates of coexisting alternative female life-histories in the European earwig. *Evolutionary Ecology*, *26*(3), 669-682. https://doi.org/10.1007/s10682-011-9510-x

Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., & Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1β via Ipaf. *Nature Immunology*, *7*(6), 569-575. https://doi.org/10.1038/ni1344

Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M., & Freitak, D. (2014). Insect immunity : Oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Frontiers in Zoology*, *11*(1), 23. https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23

Milutinović, B., & Kurtz, J. (2016). Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology*, *28*(4), 328-342. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004

Minchella, D. J., & Loverde, P. T. (1981). A Cost of Increased Early Reproductive Effort in the Snail Biomphalaria glabrata. *The American Naturalist*, *118*(6), 876-881. https://doi.org/10.1086/283879

Miskinyte, M., Sousa, A., Ramiro, R. S., de Sousa, J. A. M., Kotlinowski, J., Caramalho, I., Magalhães, S., Soares, M. P., & Gordo, I. (2013). The Genetic Basis of Escherichia coli Pathoadaptation to Macrophages. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003802. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003802

Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Blanc, H., Lambrechts, L., & Saleh, M.-C. (2018). Immune priming and clearance of orally acquired RNA viruses in Drosophila. *Nature Microbiology*, *3*(12), 1394-1403. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0265-9

Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Suzuki, Y., Vazeille, M., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A.-B., & Saleh, M.-C. (2020). Evidence For Long-Lasting Transgenerational Antiviral Immunity in Insects. *Cell Reports*, *33*(11), 108506. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108506

Moné, Y., Gourbal, B., Duval, D., Du Pasquier, L., Kieffer-Jaquinod, S., & Mitta, G. (2010). A Large Repertoire of Parasite Epitopes Matched by a Large Repertoire of Host Immune Receptors in an Invertebrate Host/Parasite Model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(9), e813. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000813

Moor, K., Wotzka, S. Y., Toska, A., Diard, M., Hapfelmeier, S., & Slack, E. (2016). Peracetic Acid Treatment Generates Potent Inactivated Oral Vaccines from a Broad Range of Culturable Bacterial Species. *Frontiers in Immunology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00034

Morandini, A. C., Santos, C. F., & Yilmaz, Ö. (2016). Role of epigenetics in modulation of immune response at the junction of host–pathogen interaction and danger molecule signaling. *Pathogens and Disease*, *74*(7), ftw082. https://doi.org/10.1093/femspd/ftw082

Moreau, J., Martinaud, G., Troussard, J.-P., Zanchi, C., & Moret, Y. (2012). Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. *Oikos*, *121*(11), 1828-1832. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19933.x

Moreau, J., & Rigaud, T. (2002). The Shape of Calcium Carbonate Deposits as an External Marker for Female Reproductive Status in Terrestrial Isopods. *Journal of Crustacean Biology*, *22*(2), 353-356. https://doi.org/10.1163/20021975-99990242

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 Wolbachia Symbiont in Aedes aegypti Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, *139*(7), 1268-1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042

Moreno-García, M., Condé, R., Bello-Bedoy, R., & Lanz-Mendoza, H. (2014). The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects. *Infection, Genetics and Evolution*, *24*, 25-33. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.02.010

Moreno-García, M., Vargas, V., Ramírez-Bello, I., Hernández-Martínez, G., & Lanz-Mendoza, H. (2015). Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult Aedes aegypti Mosquitoes. *PLOS ONE*, *10*(7), e0133240. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133240

Moret, Y. (2003). Explaining Variable Costs of the Immune Response : Selection for Specific versus Non-Specific Immunity and Facultative Life History Change. *Oikos*, *102*(1), 213-216.

Moret, Y. (2006). 'Trans-generational immune priming' : Specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1592), 1399-1405. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3465

Moret, Y., Coustau, C., Braquart-Varnier, C., & Gourbal, B. (2019). Immune Priming and Trans-Generational Protection From Parasites. In *Encyclopedia of Animal Behavior* (p. 764-774). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90726-X

Moret, Y., & Schmid-Hempel, P. (2000). Survival for Immunity : The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers. *Science*, *290*(5494), 1166-1168. https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1166

Moret, Y., & Schmid-Hempel, P. (2009). Immune responses of bumblebee workers as a function of individual and colony age : Senescence versus plastic adjustment of the immune function. *Oikos*, *118*(3), 371-378. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17187.x

Moret, Y., & Siva-Jothy, M. T. (2003). Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1532), 2475-2480. https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2511

Moulin, A. M. (1983). De l'analyse au système : Le développement de l'Immunologie. *Revue d'histoire des sciences*, *36*(1), 49-67. https://doi.org/10.3406/rhs.1983.1903

Mourits, V. P., Wijkmans, J. C., Joosten, L. A., & Netea, M. G. (2018). Trained immunity as a novel therapeutic strategy. *Current Opinion in Pharmacology*, *41*, 52-58. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.04.007

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

Mowlds, P., Barron, A., & Kavanagh, K. (2008). Physical stress primes the immune response of Galleria mellonella larvae to infection by Candida albicans. *Microbes and Infection*, *10*(6), 628-634. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.02.011

Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., & Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(1), 310-317. https://doi.org/10.1128/AEM.01301-09

Mukhopadhyay, J., Braig, H. R., Rowton, E. D., & Ghosh, K. (2012). Naturally Occurring Culturable Aerobic Gut Flora of Adult Phlebotomus papatasi, Vector of Leishmania major in the Old World. *PLoS ONE*, *7*(5), e35748. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035748

Müller, L., Fülöp, T., & Pawelec, G. (2013). Immunosenescence in vertebrates and invertebrates. *Immunity & Ageing*, *10*(1), 12. https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-12

Müller, U., Vogel, P., Alber, G., & Schaub, G. A. (2008). The Innate Immune System of Mammals and Insects. In A. Egesten, A. Schmidt, & H. Herwald (Éds.), *Contributions to Microbiology* (p. 21-44). KARGER. https://doi.org/10.1159/000135684

Murray, C. J. (1991). Salmonellae in the environment. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, *10*(3), 765-785.

Nale, J. Y., Vinner, G. K., Lopez, V. C., Thanki, A. M., Phothaworn, P., Thiennimitr, P., Garcia, A., AbuOun, M., Anjum, M. F., Korbsrisate, S., Galyov, E. E., Malik, D. J., & Clokie, M. R. J. (2021). An Optimized Bacteriophage Cocktail Can Effectively Control Salmonella in vitro and in Galleria mellonella. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 609955. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.609955

Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashita, T., Nishizawa, T., Nishioka, T., Arimoto, M., & Muroga, K. (2004). Vaccination trials with Penaeus japonicus to induce resistance to white spot syndrome virus. *Aquaculture*, *229*(1-4), 25-35. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00363-6

Nappi, A. J., & Christensen, B. M. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions : Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35*(5), 443-459. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014

Nauseef, W. M. (2008). Nox enzymes in immune cells. *Seminars in Immunopathology*, *30*(3), 195-208. https://doi.org/10.1007/s00281-008-0117-4

Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., Barreiro, L. B., Chavakis, T., Divangahi, M., Fuchs, E., Joosten, L. A. B., van der Meer, J. W. M., Mhlanga, M. M., Mulder, W. J. M., Riksen, N. P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Stabell Benn, C., Sun, J. C., Xavier, R. J., & Latz, E. (2020). Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, *20*(6), 375-388. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0285-6

Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., O'Neill, L. A. J., & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity : A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, *352*(6284), aaf1098. https://doi.org/10.1126/science.aaf1098

Netea, M. G., Quintin, J., & van der Meer, J. W. M. (2011). Trained Immunity : A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host & Microbe*, *9*(5), 355-361. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006

Netea, M. G., & van der Meer, J. W. M. (2017). Trained Immunity : An Ancient Way of Remembering. *Cell Host & Microbe*, *21*(3), 297-300. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.003

Ng, T. H., & Kurtz, J. (2020). Dscam in immunity : A question of diversity in insects and crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, *105*, 103539. https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103539

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, *60*(3), 275-301. https://doi.org/10.1042/EBC20160017

Norouzitallab, P., Biswas, P., Baruah, K., & Bossier, P. (2015). Multigenerational immune priming in an invertebrate parthenogenetic Artemia to a pathogenic Vibrio campbellii. *Fish & Shellfish Immunology*, *42*(2), 426-429. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.11.029

Nyholm, S. V., & Graf, J. (2012). Knowing your friends : Invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(12), 815-827. https://doi.org/10.1038/nrmicro2894

Odonkor, S. T., & Ampofo, J. K. (2013). Escherichia coli as an indicator of bacteriological quality of water : An overview. *Microbiology Research*, *4*(1), 2. https://doi.org/10.4081/mr.2013.e2

Oldenborg, P.-A., Zheleznyak, A., Fang, Y.-F., Lagenaur, C. F., Gresham, H. D., & Lindberg, F. P. (2000). Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells. *Science*, *288*(5473), 2051-2054. https://doi.org/10.1126/science.288.5473.2051

O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L., & von Andrian, U. H. (2006). T cell– and B cell–independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature Immunology*, *7*(5), 507-516. https://doi.org/10.1038/ni1332

Oliver, K. M., Campos, J., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2008). Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1632), 293-299. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1192

Oliver, K. M., & Moran, N. A. (2009). *Defensive Symbionts in Aphids and Other Insects* (J. F. White Jr. & M. S. Torres, Éds.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420069327

Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1803-1807. https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100

Oliver, K. M., Smith, A. H., & Russell, J. A. (2014). Defensive symbiosis in the real world—Advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecology*, *28*(2), 341-355. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12133

O'Neill, L. A. J., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors—Redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, *13*(6), 453-460. https://doi.org/10.1038/nri3446

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(7), 2699-2702. https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2699

Opal, S. M. (2010). A Brief History of Microbiology and Immunology. In A. W. Artenstein (Éd.), *Vaccines : A Biography* (p. 31-56). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1108-7_3

Osborne, S. E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., & Johnson, K. N. (2012). Antiviral Protection and the Importance of Wolbachia Density and Tissue Tropism in Drosophila simulans. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(19), 6922-6929. https://doi.org/10.1128/AEM.01727-12

Ozdal, M., Ozdal, O. G., & Alguri, O. F. (2016). Isolation and Characterization of α-Endosulfan Degrading Bacteria from the Microflora of Cockroaches. *Polish Journal of Microbiology*, *65*(1), 63-68. https://doi.org/10.5604/17331331.1197325

Pachiappan, P., Aruchamy, M., & Ramanna, S. K. (2009). Evaluation of Antibacterial Efficacy of Certain Botanicals Against Bacterial Pathogen Bacillus sp. Of Silkworm, Bombyx mori L. *International journal of industrial entomology*, *18*, 49-52.

Pagán, A. J., & Ramakrishnan, L. (2018). The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, *36*(1), 639-665. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022

Paillot, A. (1920). L'immunite' acquise chez les insectes. Compt. rend. soc. biol., 83, 278-280.

Palmer, W. H., Medd, N. C., Beard, P. M., & Obbard, D. J. (2018). Isolation of a natural DNA virus of Drosophila melanogaster, and characterisation of host resistance and immune responses. *PLOS Pathogens*, *14*(6), e1007050. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007050

Palmieri, B., Vadala', M., & Palmieri, L. (2021). Immune memory : An evolutionary perspective. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *17*(6), 1604-1606. https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1846396

Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M. J., Lu, P., Liang, X., Zhang, F., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2018). The bacterium Wolbachia exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito Aedes aegypti. *The ISME Journal*, *12*(1), 277-288. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.174

Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito Aedes aegypti. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(1), E23-E31. https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108

Paris, O. H. (1965). Vagility of P ^{32} -Labeled Isopods in Grassland. *Ecology*, *46*(5), 635-648. https://doi.org/10.2307/1935003

Paris, O. H., & Pitelka, F. A. (1962a). Population characteristics of the terrestrial isopod Armadillidium vulgare in California grassland. *Ecology*, *43*(2), 229-248.

Paris, O. H., & Pitelka, F. A. (1962b). Population Characteristics of the Terrestrial Isopod Armadillidium vulgare in California Grassland. *Ecology*, *43*(2), 229. https://doi.org/10.2307/1931979

Park, Y., Kim, Y., & Stanley, D. (2011). Cellular immunosenescence in adult male crickets, Gryllus assimilis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *76*(4), 185-194. https://doi.org/10.1002/arch.20394

Parry, R., Bishop, C., De Hayr, L., & Asgari, S. (2019). Density-dependent enhanced replication of a densovirus in Wolbachia-infected Aedes cells is associated with production of piRNAs and higher virus-derived siRNAs. *Virology*, *528*, 89-100. https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.12.006

Patrnogic, J., Castillo, J. C., Shokal, U., Yadav, S., Kenney, E., Heryanto, C., Ozakman, Y., & Eleftherianos, I. (2018). Pre-exposure to non-pathogenic bacteria does not protect Drosophila against the entomopathogenic bacterium Photorhabdus. *PLOS ONE*, *13*(10), e0205256. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205256

Paul, E. R., Chitnis, N. S., Henderson, C. W., Kaul, R. J., D'Costa, S. M., & Bilimoria, S. L. (2007). Induction of apoptosis by iridovirus virion protein extract. *Archives of Virology*, *152*(7), 1353-1364. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0945-x

Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A. (1988). Physical and Antigenic Heterogeneity in the Flagellins of Listeria monocytogenes and L. ivanovii. *Microbiology*, *134*(9), 2593-2598. https://doi.org/10.1099/00221287-134-9-2593

Pennington, S. H., Ferreira, D. M., Caamaño-Gutiérrez, E., Reiné, J., Hewitt, C., Hyder-Wright, A. D., Gordon, S. B., & Gordon, M. A. (2019). Nonspecific effects of oral vaccination with live-attenuated *Salmonella* Typhi strain Ty21a. *Science Advances*, *5*(2), eaau6849. https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6849

Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A Specific Primed Immune Response in Drosophila Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathogens*, *3*(3), e26. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026

Pigeault, R., Braquart-Varnier, C., Marcadé, I., Mappa, G., Mottin, E., & Sicard, M. (2014). Modulation of host immunity and reproduction by horizontally acquired Wolbachia. *Journal of Insect Physiology*, *70*, 125-133. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.07.005

Pigeault, R., Garnier, R., Rivero, A., & Gandon, S. (2016). Evolution of transgenerational immunity in invertebrates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1839), 20161136. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1136

Pimentel, A. C., Cesar, C. S., Martins, M., & Cogni, R. (2021). The Antiviral Effects of the Symbiont Bacteria Wolbachia in Insects. *Frontiers in Immunology*, *11*, 626329. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.626329

Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F. C., Olive, M.-A., Allienne, J.-F., Galinier, R., Dheilly, N. M., Kieffer-Jaquinod, S., Mitta, G., Théron, A., & Gourbal, B. (2016). A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail Biomphalaria glabrata. *PLOS Pathogens*, *12*(1), e1005361. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361

Pinto, S. B., Mariconti, M., Bazzocchi, C., Bandi, C., & Sinkins, S. P. (2012). Wolbachia surface protein induces innate immune responses in mosquito cells. *BMC Microbiology*, *12*(S1), S11. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S11

Poinar GO Jr (1981) Thaumamermis cosgrovei N. gen., n. sp. (Mermithidae: Nematoda) parasitizing terrestrial isopods (Isopoda:Oniscoidea). Systemat ParasitoI2:261-266

Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Patel, C. H., Sun, I. H., & Powell, J. D. (2015). Cellular Size as a Means of Tracking mTOR Activity and Cell Fate of CD4+ T Cells upon Antigen Recognition. *PLOS ONE*, *10*(4), e0121710. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121710

Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A. J., Cotter, S. C., Raubenheimer, D., & Simpson, S. J. (2013). Integrating nutrition and immunology : A new frontier. *Journal of Insect Physiology*, *59*(2), 130-137. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.011

Pope, E. C., Powell, A., Roberts, E. C., Shields, R. J., Wardle, R., & Rowley, A. F. (2011). Enhanced Cellular Immunity in Shrimp (Litopenaeus vannamei) after 'Vaccination'. *PLoS ONE*, *6*(6), e20960. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020960

Portela, J., Duval, D., Rognon, A., Galinier, R., Boissier, J., Coustau, C., Mitta, G., Théron, A., & Gourbal, B. (2013). Evidence for Specific Genotype-Dependent Immune Priming in the Lophotrochozoan ***Biomphalaria glabrata*** Snail. *Journal of Innate Immunity*, *5*(3), 261-276. https://doi.org/10.1159/000345909

Pradeu, T. (2007). *L' immunologie et la définition de l'identité biologique* [These de doctorat, Paris 1]. http://www.theses.fr/2007PA010660

Pradeu, T. (2010). What is an organism? An immunological answer. *History and Philosophy of the Life Sciences*, *32*(2-3), 247-267.

Prakash, A., Agashe, D., & Khan, I. (2022). The costs and benefits of basal infection resistance vs immune priming responses in an insect. *Developmental & Comparative Immunology*, *126*, 104261. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104261

Prakash, A., & Khan, I. (2022). Why do insects evolve immune priming? A search for crossroads. *Developmental & Comparative Immunology*, *126*, 104246. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104246

Prigot-Maurice, C., Beltran-Bech, S., & Braquart-Varnier, C. (2022). Why and how do protective symbionts impact immune priming with pathogens in invertebrates? *Developmental & Comparative Immunology*, *126*, 104245. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104245

Prigot-Maurice, C., Cerqueira De Araujo, A., Beltran-Bech, S., & Braquart-Varnier, C. (2021). Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between *Armadillidium vulgare* and *Salmonella*. *Journal of Evolutionary Biology*, *34*(2), 256-269. https://doi.org/10.1111/jeb.13721

Prigot-Maurice, C., Cerqueira de Araujo, A., Durand, S., Laverré, T., Pigeault, R., Verdon, J., Bulet, P., Beltran-Bech, S., & Braquart-Varnier, C. (2019). Survival capacity of the common woodlouse Armadillidium vulgare is improved with a second infection of Salmonella enterica. *Journal of Invertebrate Pathology*, *168*, 107278. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278

Proença, J. T., Barral, D. C., & Gordo, I. (2017). Commensal-to-pathogen transition : One-single transposon insertion results in two pathoadaptive traits in Escherichia coli -macrophage interaction. *Scientific Reports*, *7*(1), 4504. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04081-1

Pu, Y.-C., Wang, R., Liu, H.-H., Lu, S.-P., Tang, F.-X., & Hou, Y.-M. (2021). Immunosenescence along with direct physiological allocation trade-offs between life history and immunity in the red palm weevil Rhynchophorus ferrugineus. *Developmental & Comparative Immunology*, *123*, 104143. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104143

Qiu, L., Chen, M.-M., Wan, X.-Y., Li, C., Zhang, Q.-L., Wang, R.-Y., Cheng, D.-Y., Dong, X., Yang, B., Wang, X.-H., Xiang, J.-H., & Huang, J. (2017). Characterization of a new member of Iridoviridae, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (Litopenaeus vannamei). *Scientific Reports*, *7*(1), 11834. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10738-8

Quintin, J., Cheng, S.-C., van der Meer, J. W., & Netea, M. G. (2014). Innate immune memory : Towards a better understanding of host defense mechanisms. *Current Opinion in Immunology*, *29*, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.02.006

R Core Team. (2017). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. https://www.R-project.org/

Ramirez, J. L., de Almeida Oliveira, G., Calvo, E., Dalli, J., Colas, R. A., Serhan, C. N., Ribeiro, J. M., & Barillas-Mury, C. (2015). A mosquito lipoxin/lipocalin complex mediates innate immune priming in Anopheles gambiae. *Nature Communications*, *6*(1), 7403. https://doi.org/10.1038/ncomms8403

Rancès, E., Ye, Y. H., Woolfit, M., McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2012). The Relative Importance of Innate Immune Priming in Wolbachia-Mediated Dengue Interference. *PLoS Pathogens*, *8*(2), e1002548. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548

Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in microbiology*, *152*(8), 707-716.

Rast, J. P., Smith, L. C., Loza-Coll, M., Hibino, T., & Litman, G. W. (2006). Genomic Insights into the Immune System of the Sea Urchin. *Science*, *314*(5801), 952-956. https://doi.org/10.1126/science.1134301

Rauw, W. M. (2012). Immune response from a resource allocation perspective. *Frontiers in Genetics*, *3*. https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00267

Read, A. F., Graham, A. L., & Råberg, L. (2008). Animal Defenses against Infectious Agents : Is Damage Control More Important Than Pathogen Control. *PLoS Biology*, *6*(12), e1000004. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000004

Reber, A., & Chapuisat, M. (2012). No Evidence for Immune Priming in Ants Exposed to a Fungal Pathogen. *PLoS ONE*, *7*(4), e35372. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035372

Rheins, L. A., & Karp, R. D. (1985). EFFECT OF GENDER ON THE INDUCIBLE. *Developmental and Comparative Immunology*, *9*(c), 41-49.

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, *50*, 2597. https://doi.org/10.3791/2597

Rigaud, T., & Juchault, P. (1993). Conflict Between Feminizing Sex Ratio Distorters and an Autosomal Masculinizing Gene in the Terrestrial Isopod. *Genetics*, *252*(i), 247-252.

Rigaud, T., & Juchault, P. (1995). Success and failure of horizontal transfers of feminizing Wolbachia endosymbionts in woodlice. *Journal of Evolutionary Biology*, *8*(2), 249-255. https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1995.8020249.x

Rigaud, T., Juchault, P., & Mocquard, J. P. (1997). The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *BioEssays*, *19*(5), 409-416.

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. *Genetics Selection Evolution, BioMed Central*, *24*(1), 3-18. https://doi.org/hal-00893940

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), 469-475. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6885990

Robalino, J., Browdy, C. L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., & Warr, G. (2004). Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate. *Journal of Virology*, *78*(19), 10442-10448. https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10442-10448.2004

Robinson, A. N., & Green, T. J. (2020). Fitness costs associated with maternal immune priming in the oyster. *Fish & Shellfish Immunology*, *103*, 32-36. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.047

Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., & Barillas-Mury, C. (2010). Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science*, *329*(5997), 1353-1355. https://doi.org/10.1126/science.1190689

Rolff, J. (2001). Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Canadian Journal of Zoology*, *79*(12), 2176-2180. https://doi.org/10.1139/cjz-79-12-2176

Rolff, J. (2002). Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *269*(1493), 867-872. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1959

Rolff, J., & Siva-Jothy, M. T. (2003). Invertebrate Ecological Immunology. *Science*, *301*(5632), 472-475. https://doi.org/10.1126/science.1080623

Romanenko, L. A., Uchino, M., Tebo, B. M., Tanaka, N., Frolova, G. M., & Mikhailov, V. V. (2008). Pseudomonas marincola sp. Nov., isolated from marine environments. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND Evolutionnary Microbiology*, *58*(3), 706-710. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65406-0

Ronai, I., Greslehner, G. P., Boem, F., Carlisle, J., Stencel, A., Suárez, J., Bayir, S., Bretting, W., Formosinho, J., Guerrero, A. C., Morgan, W. H., Prigot-Maurice, C., Rodeck, S., Vasse, M., Wallis, J. M., & Zacks, O. (2020). "Microbiota, symbiosis and individuality summer school" meeting report. *Microbiome*, *8*(1), 117. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00898-7

Rosengaus, R. B., Hays, N., Biro, C., Kemos, J., Zaman, M., Murray, J., Gezahegn, B., & Smith, W. (2017). Pathogen-induced maternal effects result in enhanced immune responsiveness across generations. *Ecology and Evolution*, *7*(9), 2925-2935. https://doi.org/10.1002/ece3.2887

Roth, O., Beemelmanns, A., Barribeau, S. M., & Sadd, B. M. (2018). Recent advances in vertebrate and invertebrate transgenerational immunity in the light of ecology and evolution. *Heredity*, *121*(3), 225-238. https://doi.org/10.1038/s41437-018-0101-2

Roth, O., Joop, G., Eggert, H., Hilbert, J., Daniel, J., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2010). Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Animal Ecology*, *79*(2), 403-413. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01617.x

Roth, O., & Kurtz, J. (2009a). Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse Porcellio scaber (Crustacea : Isopoda). *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(11), 1151-1155. https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.04.005

Roth, O., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2009b). Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1654), 145-151. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1157

Rowley, A. F., & Pope, E. C. (2012). Vaccines and crustacean aquaculture—A mechanistic exploration. *Aquaculture*, *334-337*, 1-11. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.011

Rusaini, & Owens, L. (2010). Insight into the lymphoid organ of penaeid prawns : A review. *Fish & Shellfish Immunology*, *29*(3), 367-377. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.011

Sachs, J. L., Skophammer, R. G., & Regus, J. U. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(Supplement_2), 10800-10807. https://doi.org/10.1073/pnas.1100304108

Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, *16*(12), 1206-1210. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047

Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2007). Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. *Current Biology*, *17*(24), R1046-R1047. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.007

Sadd, B. M., & Siva-Jothy, M. T. (2006). Self-harm caused by an insect's innate immunity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *273*(1600), 2571-2574. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3574

Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H. D., Rao, N. A., Aghajanirefah, A., Matarese, F., Cheng, S.-C., Ratter, J., Berentsen, K., van der Ent, M. A., Sharifi, N., Janssen-Megens, E. M., Ter Huurne, M., Mandoli, A., van Schaik, T., Ng, A., Burden, F., Downes, K., Frontini, M., … Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, *345*(6204), 1251086. https://doi.org/10.1126/science.1251086

Sagi, A., Manor, R., & Ventura, T. (2013). Gene Silencing in Crustaceans : From Basic Research to Biotechnologies. *Genes*, *4*(4), 620-645. https://doi.org/10.3390/genes4040620

Salmela, H., Amdam, G. V., & Freitak, D. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*, *11*(7), e1005015. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015

Sánchez-Paz, A., & Muhlia-Almazán, A. (2020). Uncovering and defragmenting the role of the Toll pathway in the innate immune responses of cultured crustaceans against viral pathogens. *Reviews in Aquaculture*, raq.12411. https://doi.org/10.1111/raq.12411

Scalfaro, C., Iacobino, A., Nardis, C., & Franciosa, G. (2017). Galleria mellonella as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, *364*(7). https://doi.org/10.1093/femsle/fnx064

Schaffitzel, E., & Hertweck, M. (2006). Recent aging research in Caenorhabditis elegans. Experimental gerontology, 41(6), 557–563. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.02.008

Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science*, *310*(5755), 1781-1781. https://doi.org/10.1126/science.1120180

Schmid-Hempel, P. (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1513), 357-366. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2265

Schmid-Hempel, P. (2005). Evolutionnary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, *50*(1), 529-551. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420

Schmoldt, A., Benthe, H. F., & Haberland, G. (1975). Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, *24*(17), 1639-1641.

Schneider, D. S., & Ayres, J. S. (2008). Two ways to survive infection : What resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, *8*(11), 889-895. https://doi.org/10.1038/nri2432

Schulenburg, H., Boehnisch, C., & Michiels, N. K. (2007). How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Molecular Immunology*, *44*(13), 3338-3344. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.019

Schuster, S., Miesen, P., & van Rij, R. P. (2019). Antiviral RNAi in Insects and Mammals : Parallels and Differences. *Viruses*, *11*(5), 448. https://doi.org/10.3390/v11050448

Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P., & Wolfner, M. F. (2016). Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annual Review of Entomology*, *61*, 239-256. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023924

Seal, S., Dharmarajan, G., & Khan, I. (2021). Evolution of pathogen tolerance and emerging infections : A missing experimental paradigm. *ELife*, *10*, e68874. https://doi.org/10.7554/eLife.68874

Seribelli, A. A., Cruz, M. F., Vilela, F. P., Frazão, M. R., Paziani, M. H., Almeida, F., Medeiros, M. I. C., Rodrigues, D. dos P., Kress, M. R. von Z., Allard, M. W., & Falcão, J. P. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Typhimurium isolates from humans and foods in Brazil. *PLOS ONE*, *15*(8), e0237886. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237886

Sfendourakis, S., & Taiti, S. (2015). Patterns of taxonomic diversity among terrestrial isopods. *ZooKeys*, *515*, 13-25. https://doi.org/10.3897/zookeys.515.9332

Shahabi, V., Maciag, P. C., Rivera, S., & Wallecha, A. (2010). Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioengineered Bugs*, *1*(4), 237-245. https://doi.org/10.4161/bbug.1.4.11243

Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. (2020). Immune priming : The secret weapon of the insect world. *Virulence*, *11*(1), 238-246. https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137

Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ? *Virulence*, *9*(1), 1625-1639. https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531

Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(8), 317-321. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2

Shi, Z. H., Lin, Y. T., & Hou, Y. M. (2014). Mother-derived trans-generational immune priming in the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera, Dryophthoridae). *Bulletin of Entomological Research*, *104*(6), 742-750. https://doi.org/10.1017/S0007485314000583

Shikano, I., Hua, K. N., & Cory, J. S. (2016). Baculovirus-challenge and poor nutrition inflict within-generation fitness costs without triggering transgenerational immune priming. *Journal of Invertebrate Pathology*, *136*, 35-42. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.001

Shoemaker, K. L., Parsons, N. M., & Adamo, S. A. (2006). Egg-laying behaviour following infection in the cricket *Gryllus texensis*. *Canadian Journal of Zoology*, *84*(3), 412-418. https://doi.org/10.1139/z06-013

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. https://doi.org/10.1007/s00114-010-0699-2

Sicard, M., Dittmer, J., Grève, P., Bouchon, D., & Braquart-Varnier, C. (2014). A host as an ecosystem: *W olbachia* coping with environmental constraints: The *Wolbachia* in their 'host ecosystem'. *Environmental Microbiology*, *16*(12), 3583-3607. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12573

Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 32, p. 1-48). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7

Siva-Jothy, M. T., & Thompson, J. J. W. (2002). Short-term nutrient deprivation affects immune function. *Physiological Entomology*, *27*(3), 206-212. https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x

Smith, V. J. (2016). Immunology of Invertebrates: Cellular. In *ELS* (p. 1-13). American Cancer Society. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002344.pub3

Smith, ValerieJ., & Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, Astacus astacus by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and Tissue Research*, *233*(2). https://doi.org/10.1007/BF00238297

Söderhäll, I. (2016). Crustacean hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, *58*, 129-141. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009

Söderhäll, K., & Aspán, A. (1993). Prophenoloxidase Activating System and Its Role in Cellular Communication. In J. P. N. Pathak (Éd.), *Insect Immunity* (p. 113-129). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1618-3_9

Söderhäll, K., Aspán, A., & Duvic, B. (1990). The pro-PO-system and associated proteins; role in cellular communication in arthropods. *Research in Immunology*, *141*(9), 896-907. https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90190-A

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, *2*, 3-23. https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90053-Z

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *10*(1), 23-28. https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5

Söderhäll, K., Smith, ValerieJ., & Johansson, MatsW. (1986). Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: Evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell and Tissue Research*, *245*(1). https://doi.org/10.1007/BF00218085

Söderqvist, T., & Stillwell, C. (1999). Essay Review : The Historiography of Immunology is Still in Its Infancy. *Journal of the History of Biology*, *32*(1), 205-215. https://doi.org/10.1023/A:1004654415985

Sokoloff, A. (1972). The Biology of Tribolium : With Special Emphasis on Genetic Aspects. Clarendon Press. https://books.google.fr/books?id=sv0hAQAAMAAJ

Sompayrac, L. (2019). *How the immune system works* (Sixth edition). Wiley Blackwell.

Sook Chung, J., Bachvaroff, T. R., Trant, J., & Place, A. (2012). A second copper zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) in the blue crab Callinectes sapidus: Cloning and up-regulated expression in the hemocytes after immune challenge. *Fish & Shellfish Immunology*, *32*(1), 16-25. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.08.023

Soutourina, O. A., & Bertin, P. N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(4), 505-523. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00064-0

Spöring, I., Felgner, S., Preuße, M., Eckweiler, D., Rohde, M., Häussler, S., Weiss, S., & Erhardt, M. (2018). Regulation of Flagellum Biosynthesis in Response to Cell Envelope Stress in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *MBio*, *9*(3). https://doi.org/10.1128/mBio.00736-17

Sriram, S., & Ling, K. Y. (2020). *Isolement Et Culture De Cellules Musculaires Et Adipeuses De Crustacés*.https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2020149791&tab=PCTDOCUMENTS

Staley, J. T., Castenholz, R., Colwell, R., Holt, J., Kane, M., Pace, N., Salyers, A., & Tiedje, J. (1996). The microbial world : Foundation of the biosphere. *Undefined*. https://www.semanticscholar.org/paper/The-microbial-world%3A-Foundation-of-the-biosphere-Staley-Castenholz/253a0d5ba8d24407f189ee2087905e3473a50327

Stanaway, J. D., Reiner, R. C., Blacker, B. F., Goldberg, E. M., Khalil, I. A., Troeger, C. E., Andrews, J. R., Bhutta, Z. A., Crump, J. A., Im, J., Marks, F., Mintz, E., Park, S. E., Zaidi, A. K. M., Abebe, Z., Abejie, A. N., Adedeji, I. A., Ali, B. A., Amare, A. T., … Hay, S. I. (2019). The global burden of typhoid and paratyphoid fevers : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(4), 369-381. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30685-6

Stanley, D. (2012). Aging and immunosenescence in invertebrates. *Biological Control of Insects Research Laboratory*, 102-109.

Steiner, H. (2004). Peptidoglycan recognition proteins: On and off switches for innate immunity. *Immunological Reviews*, *198*(1), 83-96. https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0120.x

Stevens, E. J., Bates, K. A., & King, K. C. (2021). Host microbiota can facilitate pathogen infection. *PLOS Pathogens*, *17*(5), e1009514. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009514

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A. J., & Hurst, G. D. D. (1999). *Wolbachia Pipientis* : Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annual Review of Microbiology*, *53*(1), 71-102. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71

Sugumaran, M. (2001). Control Mechanisms of the Prophenoloxidase Cascade. In G. Beck, M. Sugumaran, & E. L. Cooper (Éds.), *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System* (Vol. 484, p. 289-298). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_27

Sukhithasri, V., Nisha, N., Biswas, L., Anil Kumar, V., & Biswas, R. (2013). Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiological Research*, *168*(7), 396-406. https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.005

Surbida, K., & Wright, J. C. (2001). Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in Armadillidium vulgare (Isopoda: Oniscidea). *Physiological and Biochemical Zoology*, *74*(6), 894-906. https://doi.org/10.1086/324474

Sutton, S. L., Hassall, M., Willows, R., Davis, R. C., Grundy, A., & Sunderland, K. D. (1983). *Life histories of terrestrial isopods: A study of intra- and interspecific variation*. The biology of terrestrial isopods. The symposium of terrestrial isopods., Cambridge.

Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Soma, G.-I., & Yokomizo, Y. (2000). Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, Penaeus japonicus, by oral administration ofPantoea agglomeranslipopolysaccharide (LPS). *Fish & Shellfish Immunology*, *10*(6), 555-558. https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0268

Tallamy, D. W., & Brown, W. P. (1999). Semelparity and the evolution of maternal care in insects. *Animal Behaviour*, *57*(3), 727-730. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.1008

Tas, M. Y., Oguz, M. M., & Ceri, M. (2017). *Acinetobacter lwoffii* Peritonitis in a Patient on Automated Peritoneal Dialysis : A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Nephrology*, *2017*, 1-2. https://doi.org/10.1155/2017/5760254

Tassetto, M., Kunitomi, M., & Andino, R. (2017). Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in Drosophila. *Cell*, *169*(2), 314-325.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.033

Taszłow, P., Vertyporokh, L., & Wojda, I. (2017). Humoral immune response of Galleria mellonella after repeated infection with Bacillus thuringiensis. *Journal of Invertebrate Pathology*, *149*, 87-96. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.008

Tate, A. T. (2016). The Interaction of Immune Priming with Different Modes of Disease Transmission. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01102

Tate, A. T., & Rudolf, V. H. W. (2012). Impact of life stage specific immune priming on invertebrate disease dynamics. *Oikos*, *121*(7), 1083-1092. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19725.x

Taylor, K., & Kimbrell, D. (2007). Host Immune Response and Differential Survival of the Sexes in Drosophila. *Fly*, *1*(4), 197-204. https://doi.org/10.4161/fly.5082

Taylor, M. J., Bandi, C., & Hoerauf, A. (2005). Wolbachia.Bacterial Endosymbionts of Filarial Nematodes. In *Advances in Parasitology* (Vol. 60, p. 245-284). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60004-8

Teixeira, L., Ferreira, Á., & Ashburner, M. (2008). The Bacterial Symbiont Wolbachia Induces Resistance to RNA Viral Infections in Drosophila melanogaster. *PLoS Biology*, *6*(12), e1000002. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002

Tetreau, G., Dhinaut, J., Gourbal, B., & Moret, Y. (2019). Trans-generational Immune Priming in Invertebrates : Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1938. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01938

Therneau, T. M., Grambsch, P. M., & Pankratz, V. S. (2003). Penalized Survival Models and Frailty. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, *12*(1), 156-175. https://doi.org/10.1198/1061860031365

Thiel, M. (2000). Extended parental care behavior in crustaceans—A comparative overview. *Crustacean Issues*, *12*, 211-226.

Thiel, M. (2003). Extended parental care in crustaceans: An update. *Revista Chilena de Historia Natural*, *76*(2). https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000200007

Thiel, M., & Watling, L. (Éds.). (2015). *Lifestyles and feeding biology*. Oxford University Press.

Tidbury, H. J., Best, A., & Boots, M. (2012). The epidemiological consequences of immune priming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1746), 4505-4512. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1841

Toledo, R., & Fried, B. (Éds.). (2011). Biomphalaria Snails and Larval Trematodes. Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7028-2

Torsvik, V., Goks0yr, J., & Daae, F. L. (1990). High Diversity in DNA of Soil Bacteria. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Nº 3; Vol. 56, p. 782-787). http://aem.asm.org/

Townson, H. (1993). The biology of mosquitoes. Volume 1. Development, nutrition and reproduction. By A.N. Clements. (London: Chapman & Hall, 1992). viii 509 pp. Hard cover £50. ISBN 0-412-40180-0. Bulletin of Entomological Research, 83(2), 307-308. doi:10.1017/S0007485300034830

Trauer, U., & Hilker, M. (2013). Parental Legacy in Insects : Variation of Transgenerational Immune Priming during Offspring Development. *PLoS ONE*, *8*(5), e63392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063392

Travis, J. (2009). On the Origin of The Immune System. *Science*, *324*(5927), 580-582. https://doi.org/10.1126/science.324_580

Tzur, A., Moore, J. K., Jorgensen, P., Shapiro, H. M., & Kirschner, M. W. (2011). Optimizing Optical Flow Cytometry for Cell Volume-Based Sorting and Analysis. *PLoS ONE*, *6*(1), e16053. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016053

Urs, K. C. D., & Hopkins, T. L. (1973). Effect of moisture on growth rate and development of two strains of Tenebrio molitor L. (Coleoptera, Tenebrionidae). Journal of Stored Products Research, 8(4), 291-297. https://doi.org/10.1016/0022-474X(73)90045-3

Valette, V., Durand, S., Bech, N., Grandjean, F., & Beltran-Bech, S. (2017). Multiple paternity in a wild population of Armadillidium vulgare : Influence of infection with Wolbachia? *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(2), 235-243. https://doi.org/10.1111/jeb.13009

Van Furth, R., & Cohn, Z. A. (1968). The Origin and Kinetics Of Mononuclear Phagocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *128*(3), 415-435. https://doi.org/10.1084/jem.128.3.415

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(3), 584-640. https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001

Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M.-H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., La Camera, S., Moumen, B., Greve, P., Bouchon, D., Berjeaud, J.-M., & Braquart-Varnier, C. (2016). Armadillidin H, a Glycine-Rich Peptide from the Terrestrial Crustacean Armadillidium vulgare, Displays an Unexpected Wide Antimicrobial Spectrum with Membranolytic Activity. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01484

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. https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.04.006

Vertyporokh, L., & Wojda, I. (2020). Immune response of Galleria mellonella after injection with non-lethal and lethal dosages of Candida albicans. *Journal of Invertebrate Pathology*, *170*, 107327. https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107327

Viegas, S. C., Mil-Homens, D., Fialho, A. M., & Arraiano, C. M. (2013). The Virulence of Salmonella enterica Serovar Typhimurium in the Insect Model Galleria mellonella Is Impaired by Mutations in RNase E and RNase III. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(19), 6124-6133. https://doi.org/10.1128/AEM.02044-13

Vilcinskas, A. (2021). Mechanisms of transgenerational immune priming in insects. *Developmental & Comparative Immunology*, *124*, 104205. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104205

Vogelweith, F., Körner, M., Foitzik, S., & Meunier, J. (2017). Age, pathogen exposure, but not maternal care shape offspring immunity in an insect with facultative family life. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 1-9. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0926-y

Vorburger, C., & Perlman, S. J. (2018). The role of defensive symbionts in host–parasite coevolution. *Biological Reviews*, *93*(4), 1747-1764. https://doi.org/10.1111/brv.12417

Wagner, R. R. (1961). Acquired resistance to bacterial infection in insects. *Bacteriological Reviews*, *25*, 100-110. https://doi.org/10.1128/br.25.2.100-110.1961

Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., & Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged Aedes aegypti populations. *Nature*, *476*(7361), 450-453. https://doi.org/10.1038/nature10355

Wang, J., Yang, B., Wang, W., Song, X., Jiang, Q., Qiu, L., Wang, L., & Song, L. (2019). The Enhanced Immune Protection in Chinese Mitten Crab Eriocheir sinensis Against the Second Exposure to Bacteria Aeromonas hydrophila. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2041. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02041

Wang, Q., Liu, Y., He, H.-J., Zhao, X.-F., & Wang, J.-X. (2010). Immune responses of Helicoverpa armigera to different kinds of pathogens. *BMC Immunology*, *11*, 9. https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-9

Wang, S., Liu, X., Xia, Z., Xie, G., Tang, B., & Wang, S. (2019). Transcriptome analysis of the molecular mechanism underlying immunity- and reproduction trade-off in Locusta migratoria infected by Micrococcus luteus. *PLOS ONE*, *14*(8), e0211605. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211605

Warburg, M. R. (2011). Cost of breeding in oniscid isopods: a partial review. *Crustaceana*, *84*(12/13), 1561-1580.

Warburg, M. R., Calahorra, Y., & Amar, K.-O. (2001). Non-Seasonal Breeding in a Porcellionid Isopod. *Journal of Crustacean Biology*, *21*(2), 375-383. https://doi.org/10.1163/20021975-99990137

Warburg, M. R., Linsenmair, K. E., & Bercovitz, K. (1984). The effect of climate on the distribution and abundance of isopods.

Watson, F. L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D. L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V. I., & Schmucker, D. (2005). Extensive Diversity of Ig-Superfamily Proteins in the Immune System of Insects. *Science*, *309*(5742), 1874-1878. https://doi.org/10.1126/science.1116887

Webby, R., & Kalmakoff, J. (1998). Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Archives of Virology*, *143*(10), 1949-1966. https://doi.org/10.1007/s007050050432

Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z., & Welch, J. J. (2015). The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *282*(1807), 20150249. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249

Werren, J. H. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *261*(1360), 55-63. https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0117

Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 741-751. https://doi.org/10.1038/nrmicro1969

Werren, J. H., & Windsor, D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *267*(1450), 1277-1285. https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1139

West, C. (2018). *Antiviral Immune Responses to Invertebrate Iridescent Virus 6 in Drosophila*. https://doi.org/10.13028/M25962

Wijnhoven, H., & Berg, M. P. (1999). Some Notes on the Distribution and Ecology of Iridovirus (Iridovirus, Iridoviridae) in Terrestrial Isopods (Isopoda, Oniscidae). *Crustaceana*, *72*(2), 145-156.

Williams, T. (1998). Invertebrate Iridescent Viruses. In L. K. Miller & L. A. Ball (Éds.), *The Insect Viruses* (p. 31-68). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0_2

Williams, T. (2008). Natural invertebrate hosts of iridoviruses (Iridoviridae). *Neotropical Entomology*, *37*(6), 615-632. https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000600001

Wilson, K., & Cotter, S. (2009). Density-Dependent Prophylaxis in Insects. In D. Whitman & T. Ananthakrishnan (Éds.), *Phenotypic Plasticity of Insects*. Science Publishers. https://doi.org/10.1201/b10201-7

Wilson, K., Grzywacz, D., Cory, J. S., Donkersley, P., & Graham, R. I. (2021). Trans-generational viral transmission and immune priming are dose dependent. *Journal of Animal Ecology*, *90*(6), 1560-1569. https://doi.org/10.1111/1365-2656.13476

Woese, C. R. (1994). There must be a prokaryote somewhere : Microbiology's search for itself. *Microbiological Reviews*, *58*(1), 1-9. https://doi.org/10.1128/mr.58.1.1-9.1994

Wojda, I., & Jakubowicz, T. (2007). Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in Galleria mellonella larvae. *Journal of Insect Physiology*, *53*(11), 1134-1144. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.003

Wray, C., & Wray, A. (Éds.). (2000). *Salmonella in domestic animals.* CABI. https://doi.org/10.1079/9780851992617.0000

Wu, G., Li, M., Liu, Y., Ding, Y., & Yi, Y. (2015). The specificity of immune priming in silkworm, Bombyx mori, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, *81*, 60-68.

Wu, G., Yi, Y., Lv, Y., Li, M., Wang, J., & Qiu, L. (2015). The lipopolysaccharide (LPS) of Photorhabdus luminescens TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in Galleria mellonella larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *127*, 63-72. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.007

Wu, G., Zhao, Z., Liu, C., & Qiu, L. (2014). Priming Galleria mellonella (Lepidoptera : Pyralidae) Larvae With Heat-Killed Bacterial Cells Induced an Enhanced Immune Protection Against Photorhabdus luminescens TT01 and the Role of Innate Immunity in the Process. *Journal of Economic Entomology*, *107*(2), 559-569. https://doi.org/10.1603/EC13455

Xian, J.-A., Wang, A.-L., Tian, J.-X., Huang, J.-W., Ye, C.-X., Wang, W.-N., & Sun, R.-Y. (2009). Morphologic, physiological and immunological changes of haemocytes from Litopenaeus vannamei treated by lipopolysaccharide. *Aquaculture*, *298*(1-2), 139-145. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.10.008

Xing, Z., Afkhami, S., Bavananthasivam, J., Fritz, D. K., D'Agostino, M. R., Vaseghi-Shanjani, M., Yao, Y., & Jeyanathan, M. (2020). Innate immune memory of tissue-resident macrophages and trained innate immunity : Re-vamping vaccine concept and strategies. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(3), 825-834. https://doi.org/10.1002/JLB.4MR0220-446R

Yang, W., Tran, N. T., Zhu, C., Zhang, M., Yao, D., Aweya, J. J., Gong, Y., Ma, H., Zhang, Y., Li, G., & Li, S. (2020). Enhanced immune responses and protection against the secondary infection in mud crab (Scylla paramamosain) primed with formalin-killed Vibrio parahemolyticus. *Aquaculture*, *529*, 735671. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735671

Yao, T., Lu, J., Bai, C., Xie, Z., & Ye, L. (2021). The Enhanced Immune Protection in Small Abalone Haliotis diversicolor Against a Secondary Infection With Vibrio harveyi. *Frontiers in Immunology*, *12*, 685896. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.685896

Ye, Y. H., Woolfit, M., Rancès, E., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Wolbachia-Associated Bacterial Protection in the Mosquito Aedes aegypti. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(8), e2362. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002362

Yi, Y., Xu, H., Li, M., & Wu, G. (2019). RNA-seq profiles of putative genes involved in specific immune priming in Bombyx mori haemocytes. *Infection, Genetics and Evolution*, *74*, 103921. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103921

Youmans, G. P., & Youmans, A. S. (1965). Nonspecific Factors in Resistance of Mice to Experimental Tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, *90*(6), 1675-1681. https://doi.org/10.1128/jb.90.6.1675-1681.1965

Yourth, C., Forbes, M., & Baker, R. (2002). Sex differences in melanotic encapsulation responses (immunocompetence) in the damselfly Lestes forcipatus Rambur. *Canadian Journal of Zoology*, *80*(9), 1578-1583. https://doi.org/10.1139/z02-159

Yu, Z., Liu, C., Fu, Q., Lu, G., Han, S., Wang, L., & Song, L. (2019). The differences of bacterial communities in the tissues between healthy and diseased Yesso scallop (Patinopecten yessoensis). *AMB Express*, *9*(1), 148. https://doi.org/10.1186/s13568-019-0870-x

Zanchi, C., Moret, Y., & Gillingham, M. A. F. (2019). *Relationship between early body condition, energetic reserves and fitness in an iteroparous insect* [Preprint]. Ecology. https://doi.org/10.1101/774893

Zanchi, C., Troussard, J.-P., Martinaud, G., Moreau, J., & Moret, Y. (2011). Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect : Male vs. female immune priming for offspring. *Journal of Animal Ecology*, *80*(6), 1174-1183. https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01872.x

Zanchi, C., Troussard, J.-P., Moreau, J., & Moret, Y. (2012). Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1741), 3223-3230. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0493

Zernoff, V. (1934) Influence des differentes concentrations des vaccins dans l'immunisation de Galleria mellonella. Compt. rend. soc. biol., 116, 304.

Zhang, S.-M., & Loker, E. S. (2003). The FREP gene family in the snail Biomphalaria glabrata: Additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. *Developmental & Comparative Immunology*, *27*(3), 175-187.

Zhang, X., Zeng, X., Sun, Y., Wang, Y., & Zhang, Z. (2020). Enhanced Immune Protection of Mud Crab Scylla paramamosain in Response to the Secondary Challenge by Vibrio parahaemolyticus. *Frontiers in Immunology*, *11*, 565958. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.565958

Zhang, X.-L., Tsui, I. S. M., Yip, C. M. C., Fung, A. W. Y., Wong, D. K.-H., Dai, X., Yang, Y., Hackett, J., & Morris, C. (2000). *Salmonella enterica* Serovar Typhi Uses Type IVB Pili To Enter Human Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, *68*(6), 3067-3073. https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3067-3073.2000

Zimmer, M. (2002). Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary-ecological approach. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *77*(4), 455-493. https://doi.org/10.1017/S1464793102005912

Zimmer, M. (2004). Effects of temperature and precipitation on a flood plain isopod community : A field study. *European Journal of Soil Biology*, *40*(3-4), 139-146. https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2005.02.001

Zuk, M., & Stoehr, A. M. (2002). Immune Defense and Host Life History. *The American Naturalist*, *160*(S4), S9-S22. https://doi.org/10.1086/342131

ANNEXE 1

Journal of Invertebrate Pathology 168 (2019) 107278

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jip

Survival capacity of the common woodlouse *Armadillidium vulgare* is improved with a second infection of *Salmonella enterica*

Cybèle Prigot-Maurice[a,1,*], Alexandra Cerqueira de Araujo[b,1], Sylvine Durand[a], Tiffany Laverré[a], Romain Pigeault[c], Julien Verdon[a], Philippe Bulet[d,e], Sophie Beltran-Bech[a,2], Christine Braquart-Varnier[a,2]

[a] Université de Poitiers - Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267, Bâtiment B35, 5 rue Albert Turpain, TSA 51106, F-86073 Poitiers Cedex 9, France
[b] Université François-Rabelais - Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte - UMR CNRS 7261, Avenue Monge, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France
[c] Département d'Écologie et d'évolution, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland
[d] CR Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, La Tronche, France
[e] Plateforme BioPark d'Archamps, 260 Avenue Marie Curie, Archamps Technopole F-74166, Saint-Julien-en-Genevois Cedex, France

A B S T R A C T

Immune priming has been widely observed in invertebrates. However, this phenomenon remains incompletely characterized concerning the time course of the protective effect and immune responses. Here, we investigated the existence of a protective effect in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* against a second infection with the bacterium *Salmonella enterica*. We primed animals with a low dose of living bacteria or with the bacterial culture medium. One day, 7 or 15 days later, we measured haemocytes concentration and viability and we injected a LD50 of living *S. enterica* to monitor the survival rates of infected individuals. We show that *A. vulgare* is better protected (i.e. survival improvement) upon secondary infection when it has encountered *S. enterica* 7 days before. This protection, which tends to persist 15 days after the first infection, is however not observed when the priming is performed only 1 day before the LD50 injection. Besides providing a new invertebrate example, we highlight this protection is dynamic and may be partly due to a high haemocyte production.

1. Introduction

Because invertebrates rely solely on the innate immune system and are not known to possess a vertebrate-like adaptive immunity (Kurtz, 2005; Milutinovic and Kurtz, 2016), they have long been considered unable to establish an immune memory (Hoffmann et al., 1999). In the past 20 years, several studies have shaken this paradigm by providing evidence that the invertebrate immune system could be stimulated during a first infection to pathogens, leading to better protection upon a second exposure. Studying this phenomenon, called "immune priming" (Milutinovic and Kurtz, 2016; Gourbal et al., 2018; Pradeu and Pasquier, 2018), is all the more relevant in that natural populations display variations in their immune priming (Khan et al., 2016). This variability may reflect adaptive responses to various environmental conditions independently from the evolution of resistance/tolerance strategies commonly assumed (Khan et al., 2017; Ayres and Schneider, 2008).

Immune priming has been observed in more than 40 invertebrate species including arthropod, mollusk, cnidarian, annelid and nematode species (Milutinovic and Kurtz, 2016). Among them, the ability to mount immune priming relies on several mechanisms and may occur against some pathogens but not others. It can be expressed against a broad repertoire of pathogens or be very specific to a single species of pathogen (Contreras-Guarduño et al., 2016; Milutinovic and Kurtz, 2016; Dhinaut et al., 2017), and may result in higher survival capacity when the primed individual faces a second infection (Milutinovic and Kurtz, 2016; Mellilo et al., 2018). This protective effect is often explained by immune changes involving either (i) humoral response (e.g. production of anti-microbial peptides or AMPs, reactive oxygen species (ROS) and phenoloxydase activity), (ii) cellular response (e.g. haemocyte production, phagocytosis, encapsulation) or/and (iii) immune-related gene expression, depending on the species (Wu et al., 2015; 2016; Pinaud et al., 2016; Kutzer et al., 2018; Fugmann, 2018, Mellilo et al., 2018). Although the invertebrate immune priming phenomenon has

* Corresponding author.
E-mail addresses: cybele.prigot@univ-poitiers.fr (C. Prigot-Maurice), alexandra.cerqueiradearaujo@etu.univ-tours.fr (A. Cerqueira de Araujo), sylvine.durand@univ-poitiers.fr (S. Durand), tiffany.lirand@univ-poitiers.fr (T. Laverré), julien.verdon@univ-poitiers.fr (J. Verdon), philippe.bulet@univ-grenoble-alpes.fr (P. Bulet), sophie.beltran.bech@univ-poitiers.fr (S. Beltran-Bech), christine.braquart@univ-poitiers.fr (C. Braquart-Varnier).
[1] Co-first authors.
[2] Co-last authors.

https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278
Received 22 August 2019; Received in revised form 7 November 2019; Accepted 8 November 2019
Available online 11 November 2019
0022-2011/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

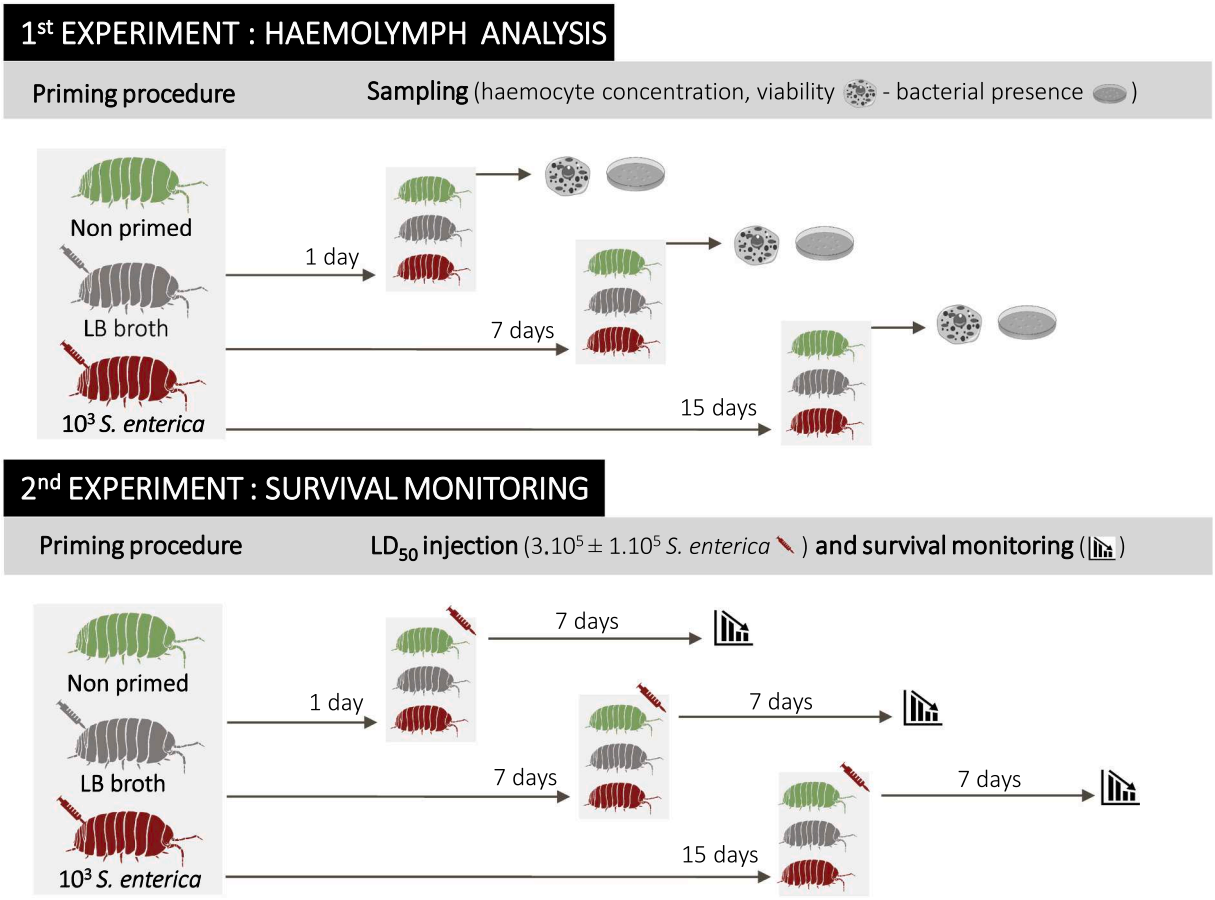


Fig. 1. Experimental diagram. The first experiment consisted to prime animals either with a low dose of living *S. enterica*, LB broth medium or without injection (control). 1, 7 or 15 days later, we sampled haemolymph to account haemocytes (concentration, viability) and estimate the bacterial persistency. The second experiment was based on the same priming procedure, but 1, 7 or 15 days later, we injected a LD_{50} of living *S. enterica* in all animals. Survival rates were then monitored for 7 days. These two types of experiments were divided into several independent experimental replicates including several independent series of priming injections.

been widely described, the delay required to provide a protective effect remains partly characterized (Little and Kraaijeveld, 2004). Few studies have addressed the time course of the immune response following the first infection by a pathogen (Rosengaus et al., 1999; Milutinovic and Kurtz, 2016; Browne et al., 2015).

It has been suggested that mounting an immune priming response may be costly for organisms (Moret and Schmid-Hempel, 2000; Jacot et al., 2005; Contreras-Garduño et al., 2014). Consequently, immune priming should preferably evolve in organisms for which probability of re-infection with the same pathogen(s) is high (Schmid-Hempel, 2005; Best et al., 2012) and is, thus, expected in species with long lifespan, low dispersion rate and group-living behaviors (Little and Kraaijeveld, 2004; Pigeault et al., 2016; Moret et al., 2019). Terrestrial isopods fulfill all the conditions assumed necessary for the evolution of immune priming. Most species can live up to 3 years and some have an estimated life expectancy of 5 years (Warburg et al., 1984). These organisms live in moist soil, an environment suitable for micro-organisms (Ranjard and Richaume, 2001) where 10^9 bacteria per gram of soil can be found (Torsvik et al., 1990). Isopods constitute the suborder of crustaceans best adapted to a terrestrial lifestyle with the evolution of various morphological, physiological and behavioral traits (Hornung, 2011). For example, they aggregate to fight efficiently against desiccation (Broly et al., 2013, 2014) and display a low dispersion rate (Beck and Price, 1981). They are mostly promiscuous (Zimmer, 2002; Durand et al., 2017), which increases the risk of pathogen transmission within populations. Considering these features, Roth and Kurtz (2009) supported the plausibility of immune priming in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. In this species, individuals that were previously primed with heat-killed *Bacillus thuringiensis* had higher proportions of phagocyting haemocytes during the second encounter with the same bacteria compared to non-primed individuals. This immune response lasts at least 14 days after the first infection. No other studies have investigated immune priming in terrestrial isopods and it is not known whether the first immune stimulation provides a protection to the animal in term of survival against a subsequent infection.

In this work, we explored the hypothesis that a protective effect exists in *Armadillidium vulgare*. This terrestrial isopod is highly gregarious, lives more than 3 years and has a well-described immune system (Braquart-Varnier et al., 2008, 2015; Chevalier et al., 2011). The aim of our study was to examine whether a first infection provides protection in terms of improved survival against a second infection with the same pathogen, and to determine the time period between two infections needed to observe this protection. To further our understanding of this phenomenon, we also measured haemocyte concentration and viability immediately before the second inoculation. In crustaceans, these immune cells defend organisms against pathogens via phagocytosis, nodulation and encapsulation but are also support humoral immune responses such as coagulation, phenoloxidase activities or antimicrobial peptide storage (Söderhäll and Cerenius, 1992; Lee and Söderhäll, 2002; Chevalier et al., 2011). Haemocytes are equally suspected to enhance their functions after a first infection, allowing a better immune response against subsequent pathogen infection (Gourbal et al., 2018).

To meet these aims, we first inoculated *A. vulgare* females with a non-lethal low dose of living *Salmonella enterica* bacteria (priming

treatment), which have been shown to be pathogenic for this species (Braquart-Varnier et al., 2015). After 1 day, 7 days or 15 days post-infection, we investigated the cellular response by measuring the haemocyte concentration and viability. Then, the protective effect of the first injection of bacteria was explored by monitoring the survival rates of *A. vulgare* following a LD_{50} injection of *S. enterica* occurring at the same time points (1, 7 or 15 days) after the first injection. Should a protective effect be triggered, we expected to observe higher survival rate in individuals previously primed with *S. enterica* compared to those not primed with *S. enterica*. We also expect to observe higher haemocyte concentrations and viabilities in response to the first infection as already observed in other biological models (Pope et al., 2001; Wu et al., 2014; Zang et al., 2014). These parameters may differ at each time point post-infection, which would provide insights about the temporal dynamics of the protective effect.

2. Materials and methods

2.1. Biological model

The *Armadillidium vulgare* laboratory line used descends from cross breeding of individuals sampled in 1982 at Helsingör (Denmark). Individuals were maintained in plastic boxes (10 × 30 cm, Ets Caubere) containing moistened potting mix and were supplied *ad libitum* with linden leaves and carrot slices. To carry out our experiments, we used 439 1-year-old (± 2 months) virgin females for survival monitoring and 153 additional females for the haemocyte analysis.

The pathogen used for infection was *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* J18 (Verdon et al., 2016), a Gram-negative bacterium which is found in soil and water (Murray, 1991; Andino and Hanning, 2015). Cultures of *S. enterica* were produced as described in Braquart-Varnier et al. (2015) (see S1 in supplementary materials for detailed method).

2.2. Experiments

2.2.1. Experimental design

We performed two experiments on individuals that received a first injection (i.e. priming procedure, see part 2.2.2). The first experiment was conducted to measure haemocyte concentration and viability after 1, 7 or 15 d post priming procedure (see part 2.2.3.1) but also the persistence of living *S. enterica* in haemolymph (see part 2.2.3.2). We selected these time points based on results of previous studies on crustacean immune priming (Roth and Kurtz, 2009; Chang et al., 2018). The second experiment was performed to monitor individual survival rate after receiving a LD_{50} of bacteria injected 1, 7 or 15 d after the priming procedure (see part 2.2.4 and Fig. 1). Different individuals were used for each experiment and time point. Each experiment was replicated several times (three independent experimental replicates for haemolymph analysis and seven for survival monitoring). Within each experimental replicate, we performed several series of the priming procedure (see S2 in supplementary materials). Datasets are available on the open access repository Mendeley Data (Prigot-Maurice et al., 2019).

Table 1
Sample size details of *A. vulgare* females used for haemocyte parameters and survival monitoring, for each priming treatment (Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure) and each time point after priming procedure. For the haemocyte concentration and viability, measurements were mostly made on same individuals. As a result, sample sizes were the same for the haemocyte concentration and viability, except for sample sizes with exponent letter. [a]: First number is haemocyte concentration sample size; second (in parentheses) is haemocyte viability sample size.

Time points (days)	Non-primed	LB-primed	*S. enterica*-primed	Total animals per time point
HAEMOCYTE PARAMETERS				
1	15[a] (17)	18[b]	19[a](14)	52 (49)
7	17	16	15	48
15	19	14	12[a] (14)	45 (47)
SURVIVAL MONITORING				
1	35	35	36	106
7	59	58	57	174
15	55	54	50	159

2.2.2. Priming procedure

Each individual was washed (0.28% NaClO then water) prior conducting three priming treatments: (1) non-injected ("non-primed" group) as a control, (2) injected with Luria-Bertani (LB) medium ("LB-primed" group), and (3) injected with a non-lethal dose of $10^3 \pm 1.10^3$ living *S. enterica* in 100 nL of LB medium ("*S. enterica*-primed" group). The sample sizes are summarized in Table 1. All injections were performed under sterile conditions using a Drummond TM Nanoject (3–000-205A), in two 50 nL consecutive injections. The *A. vulgare* were injected dorsally in their posterior abdominal segment. Each individual was then isolated in a plastic box (5 cm × 8 cm Ø, Ets Caubere) containing a moist paper, under a natural photoperiod at 20 °C and without food, to avoid any external contamination and variations in food intake. After each bacterial injection, the injected dose was controlled by spreading 100 µL of the solution diluted to 1 bacteria/µL onto LB agar plates. After an overnight culture at 37 °C, the number of *S. enterica* colonies was counted. All animals remained in their individual box for either 1, 7 or 15 d until haemolymph analysis (first experiment, see part 2.2.3) or LD_{50} injection for survival monitoring (second experiment, see part 2.2.4).

2.2.3. Haemolymph analysis

2.2.3.1. Haemocyte parameters. Haemocyte concentration and viability were generally measured on the same individual (see sample size in Table 1). The haemolymph sampling procedure as well as the measure of the number of immune cells per µL of haemolymph (i.e. concentration) and the percentage of living cells (i.e. viability) were performed as described by Sicard et al. (2010). Briefly, each individual was washed a second time (0.28% NaClO then water). The integument was pierced dorsally on the sixth tergite with a sterile needle, and the resulting drop of haemolymph was collected with a pipette. Three µL of haemolymph were diluted in 15 µL of MAS (27 mM sodium citrate: 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7; Herbinière et al. 2005) and 6 µL of 0.4% Trypan blue. Then, 10 µL of each sample were deposited in a counting chamber and analyzed in an automated cell counter (Countess TM Version B, Invitrogen).

2.2.3.2. Evaluation of S. enterica persistency. To test whether living *S. enterica* persist in the haemolymph of individuals primed with the bacteria at the three time points tested (1, 7, 15 d), 5 additional µL of haemolymph collected from individuals used to measure haemocyte parameters were added to 95 µL of LB medium. The solutions were plated onto LB agar plates and incubated overnight at 37 °C before counting the number of LB agar plates presenting at least one colony of *S. enterica* for each time point. *S. enterica* was identified by using MALDI Biotyper® Compass (v4.1 from Bruker Daltonik GmbH), according to the Bruker manufacturer protocol. This technique is commonly use in clinical microbiology for strain identification because it is more precise than the morphological approach (Scott et al., 2016; Kostrzewa, 2018).

2.2.4. Survival monitoring

All individuals (non-primed, LB-primed and *S. enterica*-primed) intended for survival monitoring were injected with a LD_{50} (dosage to kill 50% of animals in 7 days) of $3.10^5 \pm 1.10^5$ living *S. enterica* in 100 nL (Braquart-Varnier et al., 2015; see sample size in Table 1), either 1, 7 or 15 d after the priming procedure. Individuals were returned to their

boxes and survival was monitored every 8 h for 7 d. Humidity was controlled and adjusted daily. The injected dosage was controlled using the same method as the priming procedure.

2.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R, version 3.4.1 (R Core Team, 2017).

For the haemocyte analysis, we constructed two generalized linear mixed-effect models: one with concentration and the other with viability as response variables, both built using the *lme4* package (Fox and Weisberg, 2011) and tested with Wald χ^2 using the *car* package (Bates et al., 2015). Haemocyte concentration (number of haemocytes per µL) was modeled with a Poisson error distribution and haemocyte viability (percentage of living cells) was modeled with a Binomial error distribution. For these two models, the priming treatment (non-primed, LB-primed and *S. enterica*-primed) and the time point (1, 7, 15 d) were entered as categorical fixed effects with the interaction between these two terms. In addition, to correct the non-independence of samples within the same series in a given replicate, we entered two categorical random factors: the experimental replicates and the series nested within each experimental replicate (Harrison et al., 2018). For the haemocyte concentration, we added an Observation Level Random Effect (OLRE). This variable corresponds to a unique level of a random factor for each data point, in order to cope with over dispersion (Harrison, 2014).

For the survival data (frequency of living animals), a global mixed-effects Cox proportional hazard regression model was built using *coxme* packages (Therneau et al., 2003). We included the priming treatment, the time point and their interaction as fixed effects and the experimental replicate as well as the series nested within each replicate as random factors. We obtained the Hazard Ratios (HR) from this model as an estimate of the ratio between the instantaneous risks of death between control (non-primed) and the priming treatments (LB-primed, *S. enterica*-primed).

In all statistical models, our focal variable of interest was always the priming treatment. The fixed effect "time point" was treated as a covariate and the inclusion of the interaction term between "time point" and "priming treatment" allowed us to compare the three priming treatments at each time point, independently of the two other time points. These comparisons were made by analyzing all relevant pairs of means with Tukey adjustment (*lsmeans* package; Lenth, 2016). Using this approach, the interaction term and the main time point term were retained in the models even if not significant (Agresti, 2002). However, we did not use these models to statistically test for the effect of time point on haemocyte parameters and animal survival because of the correlation between the fixed effect "time point" and the random effect "experimental replicate", preventing the correct attribution of variance to each effect (see S2 in supplementary materials for more details).

3. Results

3.1. Haemolymph analysis

3.1.1. Variation in haemocyte parameters

Priming treatment had an effect on haemocyte concentration ($\chi^2 = 16.42$, df = 2, $p < 0.001$), but there was no significant effect of time post-priming ($\chi^2 = 1.19$, df = 2, $p = 0.550$) nor of the interaction between priming treatment and time post-priming ($\chi^2 = 4.20$, df = 4, $p = 0.379$). At 1 and 7 d post-priming, the non-primed and LB-primed individuals had more haemocytes than *S. enterica*-primed ones (1 d: $p = 0.004$ and $p = 0.023$, respectively; 7 d: $p = 0.043$ and $p = 0.023$, respectively; Table 2, Fig. 2). In contrast, no difference in haemocyte concentration between these priming treatments was observed at 15 d post priming (non-primed *vs S. enterica*-primed: $p = 0.799$; LB-primed *vs S. enterica*-primed: $p = 0.966$, Table 2, Fig. 2). For all time points, no significant difference in haemocyte concentration was observed between non-primed and LB-primed individuals ($p > 0.05$ for all comparisons, Table 2, Fig. 2).

Table 2
Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of haemocyte parameters for the priming treatments (Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during priming procedure) at time points between priming and haemolymph sampling, 1, 7 and 15 d.

HAEMOCYTE CONCENTRATION (number of cells per µL of haemolymph)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.600	0.188	**0.004****
S. enterica-primed/LB-primed	0.471	0.179	**0.023***
LB-primed/Non-primed	0.128	0.191	0.778
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.470	0.193	**0.043***
S. enterica-primed/LB-primed	0.515	0.196	**0.023***
LB-primed/Non-primed	−0.045	0.190	0.968
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.128	0.201	0.799
S. enterica-primed/LB-primed	0.053	0.215	0.966
LB-primed/Non-primed	0.075	0.192	0.919
HAEMOCYTE VIABILITY (frequency of living cells)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.269	0.056	< **0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.177	0.054	**0.003****
LB-primed/Non-primed	−0.091	0.054	0.207
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.434	0.055	< **0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.267	0.054	< **0.001*****
LB-primed/Non-primed	−0.167	0.056	**0.008****
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	−0.427	0.055	< **0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	−0.158	0.057	**0.016****
LB-primed/Non-primed	−0.269	0.057	< **0.001*****

Values where $p \leq 0.05$ are given in bold. Stars indicate statistical differences between priming treatments with *$p < 0.05$, **$p \leq 0.01$, ***$p \leq 0.001$.

Priming treatment had an effect on haemocyte viability (percentage of living cells) ($\chi^2 = 139.49$, df = 2, $p < 0.001$), but there was no significant effect of the time post-priming ($\chi^2 = 1.50$, df = 2, $p = 0.470$) nor of the interaction between priming treatment and time, even if a trend was observed ($\chi^2 = 8.57$, df = 4, $p = 0.072$). Whatever the time period after the priming procedure, haemocyte viability was higher for *S. enterica*-primed individuals than non-primed individuals ($p < 0.001$ for all comparisons, Table 2, Fig. 3) and LB-primed individuals (1 d: $p = 0.003$; 7 d: $p < 0.001$; 15 d: $p = 0.016$, Table 2, Fig. 3). Haemocyte viability was not significantly different between non-primed and LB-primed individuals at 1 d after priming ($p = 0.20$, Table 2, Fig. 3), whereas non-primed individuals had a lower haemocyte viability compared to LB-primed one's at 7 d ($p = 0.008$, Table 2, Fig. 3) and 15 d after the priming procedure ($p < 0.001$, Table 2, Fig. 3).

3.1.2. Presence of living S. enterica in haemolymph

One day after the priming injections, 91% (20 out of 22 plates) of the LB agar plates spread with haemolymph from *S. enterica*-primed individuals contained *S. enterica* colonies. At 7 d, 100% displayed colonies (10 plates) whereas only 59% (10 out of 17 plates) of the plates presented colonies 15 d after priming. This shows that *S. enterica* was still present in the haemolymph of some individuals when we injected the LD_{50} ($3.10^5 \pm 1.10^5$ living *S. enterica*). No *S. enterica* was detected in the haemolymph from non-primed and LB-primed individuals.

3.2. Survival rate in response to a LD_{50} injection of S. enterica

Priming treatment had an effect on the survival rate ($\chi^2 = 18.88$, df = 2, $p < 0.001$, Fig. 4) as well as the interaction between priming treatment and time post-priming ($\chi^2 = 15.12$, df = 4, $p = 0.004$).

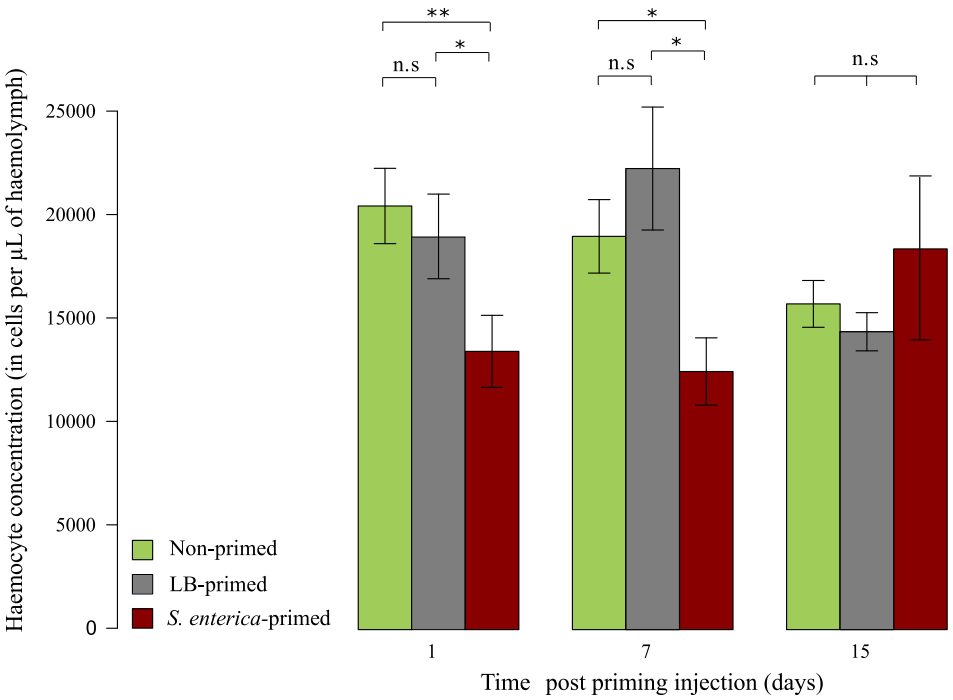


Fig. 2. Haemocyte concentration of *A. vulgare* females for each time point after the priming procedure (1, 7, 15 d). Non-primed: non injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 living *S. enterica* during the priming procedure. Values correspond to the mean ± SE and stars indicate statistical differences between priming treatments (n.s: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

Therefore, the effect of the priming treatment depends on the time post priming. No effect of the time point factor alone was observed on the survival rate ($\chi^2 = 2.58$, df = 2, p = 0.274).

When the LD_{50} injection occurred 1 d after the priming procedure, *S. enterica*-primed individuals did not survive significantly better than non-primed individuals (p = 0.411, Table 3, Fig. 4A). LB-primed individuals displayed a significantly higher survival rate than non-primed ones (p = 0.001, Table 3, Fig. 4A) and *S. enterica*-primed individuals (p = 0.037, Table 3, Fig. 4A). The risks of death of LB-primed and *S. enterica*-primed individuals were 78% (HR = 0.22; 95% CI = [0.094–0.52]) and 33% (HR = 0.67; 95% CI = [0.35–1.26]) lower than that of non-primed controls.

When the LD_{50} injection was performed 7 d after the priming procedure, survival rate was higher for *S. enterica*-primed individuals than LB-primed and non-primed ones (p = 0.003 and p = 0.0001 respectively, Table 3, Fig. 4B). No significant difference between LB-primed and non-primed individuals was observed (p = 0.792, Table 3, Fig. 4B). The risk of death of *S. enterica*-primed individuals was 52% lower than that of non-primed controls (HR = 0.48; 95% CI = [0.27–0.84]), whereas that of LB-primed ones was 25% lower than that of non-primed individuals (HR = 0.75; 95% CI = [0.44–1.27]). At 15 d after priming procedure, no significant differences were observed between the three priming treatments ($p > 0.05$ for all comparisons, Table 3, Fig. 4C). Nevertheless, *S. enterica*-primed individuals tended to have a higher survival rate than non-primed individuals (p = 0.095, Table 3, Fig. 4C), with a risk of death 62% lower than that of non-

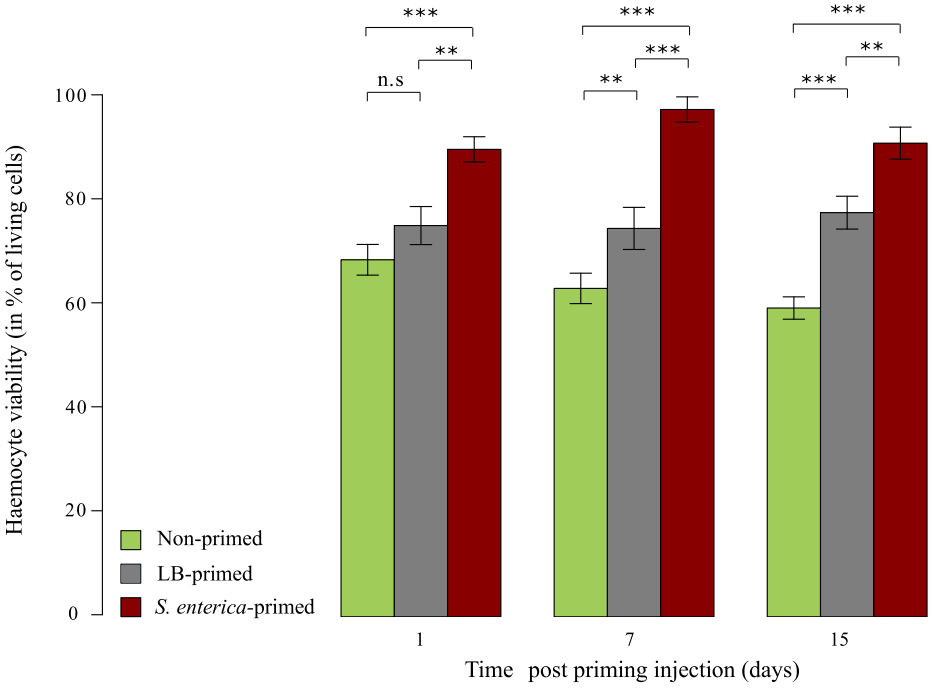


Fig. 3. Haemocyte viability of *A. vulgare* females for each time point after the priming procedure (1 d, 7 d, 15 d). Non-primed: non injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 living *S. enterica* during the priming procedure. Values correspond to the mean ± SE and stars indicate statistical differences between priming treatments (n.s: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$).

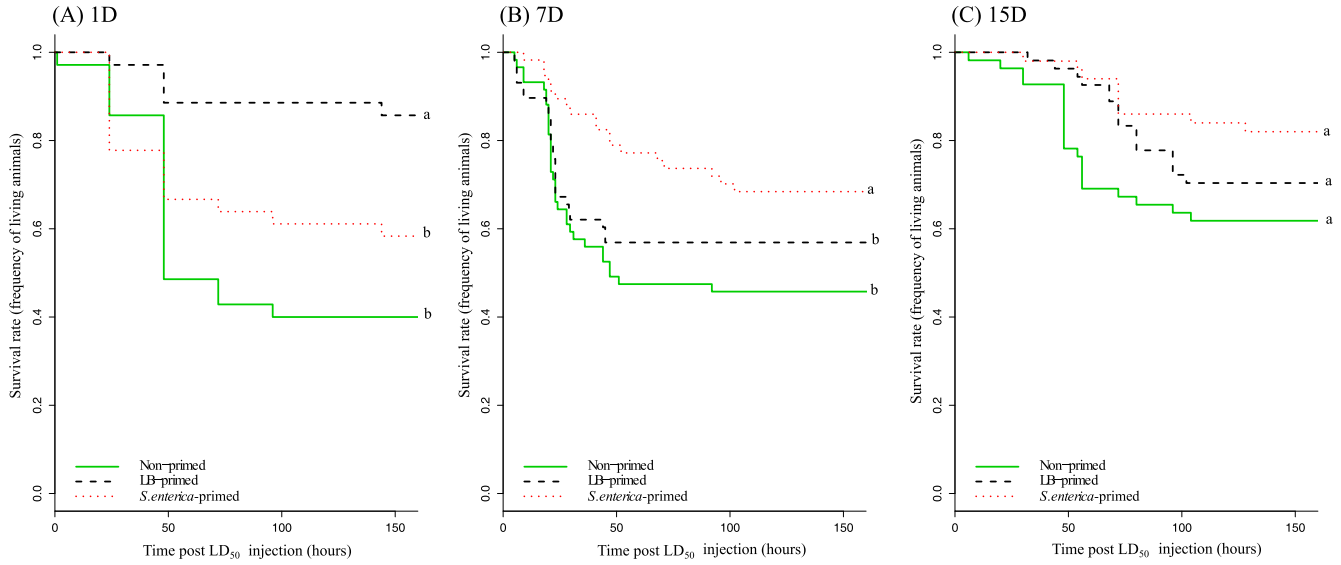


Fig. 4. Survival rate (%) of *A. vulgare* females following the lethal injection of *S. enterica* occurring (**A**) 1 day, (**B**) 7 days or (**C**) 15 days after the priming procedure. Non-primed: non injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 living *S. enterica* during the priming procedure. Different letters beside curves indicate significant differences between the survival curves based on Tukey's range test ($p \leq 0.05$).

Table 3
Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of survival rate for the priming treatments (Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure) under the time points (time elapsed between priming procedure and LD_{50} injection.

SURVIVAL RATE (frequency of living animals)			
Days	estimate	std error	*p-value*
1 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.412	0.324	0.411
S. enterica-primed/LB-primed	−1.103	0.450	**0.037***
LB-primed/Non-primed	1.515	0.435	**0.001****
7 d			
S. enterica-primed/Non-primed	1.208	0.296	< **0.001*****
S. enterica-primed/LB-primed	1.030	0.316	**0.003****
LB-primed/Non-primed	0.178	0.274	0.792
15 d			
S. enterica-primed/Non-primed	0.858	0.413	0.095
S. enterica-primed/LB-primed	0.488	0.430	0.492
LB-primed/Non-primed	0.369	0.332	0.506

Values where $p \leq 0.05$ are given in bold. Stars indicate statistical differences between priming treatments with *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p \leq 0.001$.

primed (HR = 0.38; 95% CI = [0.17–0.83]). The instantaneous risk of death of LB-primed individuals was 34% lower than that of non-primed controls (HR = 0.66; 95% CI = [0.34–1.26]).

4. Discussion

4.1. Main results overview

Immune priming in invertebrates is defined as a phenomenon by which a first activation of the immune system (by killed/living pathogens or inactivated pathogen units) is associated with enhanced protection of the host against subsequent exposure to pathogens (Kurtz, 2005; Gourbal et al., 2018). In this study, we tested for enhanced protection in *Armadillidium vulgare* following a subsequent inoculation of the Gram-negative bacterium *Salmonella enterica*.

Our results demonstrated the existence of a protective effect in this species because *A. vulgare* survival after a sublethal infection with *S. enterica* was higher when its immune system was activated during inoculation with the same bacteria. This protection is dynamic: immune primed individuals showed a higher survival rate than control individuals when the second infection occurred 7 d after a first infection with the same bacterial strain. There was a trend towards the persistence of this protection 15 d after the first infection (p-value = 0.09, Table 3, Fig. 2), but this protection was not effective when the LD_{50} injection was performed only 1 d after priming. We observed fluctuations in haemocyte concentration and viability, which also highlight a related dynamic immune response differing at each time following the infection.

4.2. When the first bacterial infection is too recent to trigger an immune protection, a simple stimulation without bacteria is enough

Firstly, we observed that a first activation of the immune system with Luria Bertani broth resulted in higher survival of an injection of bacteria at the LD_{50}. In fact, LB-primed individuals survival rate was about twice that of non-primed ones when the LD_{50} injection occurred 1 d after the LB-injection. Higher survival is likely the result of a protection phenomenon termed as "immune enhancement" by Contreras-Guarduño et al. (2016).

Because LB-primed individuals were not primed with the pathogen, we hypothesized that an immune response was triggered by the piercing in the integument during the priming procedure (Cerenius and Söderhäll, 2011). When the lethal dosage of *S. enterica* arrived in the haemolymph 1 d after the LB broth injection, the bacteria could face an already "ready-to-fight" immune system, leading to better protection (by resistance and/or tolerance) and to a higher survival rate. As haemocyte concentration is known to rapidly decrease following an injury in crustaceans (Söderhäll et al., 2003, 2016), we might expect to observe fewer haemocytes in LB-primed individuals compared to non-primed ones at 1 d post-priming. But LB-primed individuals had haemocyte concentration and viability similar to non-primed individuals. This suggests a highly effective immune system having already renewed haemocytes after the injury of the cuticle (Söderhäll et al., 2003, 2016).

Furthermore, we observed an intermediate survival rate in *S. enterica*-primed individuals at 1 d. As the immune system of *S. enterica*-primed individuals should be activated as in LB-primed, the absence of immune protection compared to non-primed individuals could reflect either a saturation or a depletion event of *A. vulgare* immune system facing a high number of bacteria. Braquart-Varnier et al. (2015) showed

that 24 h post-injection with 10^4 living *S. enterica*, the bacterial load in the haemolymph was higher than the number of bacteria injected. The immune system of *S. enterica*-primed individuals might not have enough time, energy or reserve of immune effectors to cope with a new infection of *S. enterica* occurring too soon after the first infection. This hypothesis is supported by the lower haemocyte concentration observed in *S. enterica*-primed individuals, suggesting the immune cellular response was still fighting bacteria persisting in the haemolymph since the priming procedure. The loss of circulating haemocytes following an infection was previously observed in *A. vulgare* exposed to heat-killed *Escherichia coli* (Herbinière, 2005) and in other crustaceans (Persson et al., 1987; Muñoz et al., 2002; Söderhäll et al., 2003). Following this loss of immune cells, new haemocytes are found to be released rapidly in the haemolymph to compensate for the loss (Söderhäll et al., 2003; Chevalier et al., 2011). We hypothesize the high viability of haemocytes in *S. enterica*-primed individuals reflects an important hematopoietic activity, but new haemocytes might be directly used in protection against bacteria without totally compensating previous cell loss, both at 1 and 7 d after the priming procedure. However, haemocyte concentration of *S. enterica*-primed individuals became similar to those of other groups at 15 d post-priming. This suggests the compensation was effective between 7 and 15 d following the first infection, either by even greater haemocyte production (Pipe and Coles, 1995; Zhang et al., 2014; Söderhäll, 2016) or a smaller loss of new haemocytes.

4.3. Evidence of a protective effect against the same pathogen: a minimal delay required between successive infections

We demonstrated increased survival when *A. vulgare* had encountered *S. enterica* 7 d before receiving a LD_{50} of the same pathogen, with boosted survival rates – approximately 50% higher than non-primed individuals. This protection tended to be effective until 15 d post-priming procedure (30% increase in survival), which is consistent with previous studies suggesting immune priming in terrestrial and aquatic crustaceans may last for 7 to 30 d (Roth et al., 2009; Chang et al., 2018).

Because the improved survival for LB-primed individuals observed at 1 d disappeared for individuals treated at 7 d and 15 d, we suppose the immune enhancement against *S. enterica* induced by the piercing disappeared between 1 day and 7 d post-priming procedure. By contrast, the first infection with *S. enterica* protected individuals from the LD_{50} infection, supporting that the protective effect is established between 1 and 7 d following the first infection. With regards to the duration of the protective effect, we cannot determine whether the trend of better protection observed 15 d after the priming procedure is related to a decrease in the protective effect over time or an analytical limit. This absence of significant differences between *S. enterica*-primed and non-primed individuals at 15 d could also be influenced by the animal physiological states. Individuals displayed different levels of nutritional stress at 1, 7 or 15 d post-priming, which may affect the resistance/tolerance ability of animals facing a second infection (Siva-Jothy and Thompson, 2002; Akoda et al., 2009; Ayres and Schneider 2009; Ponton et al., 2013; Adamo, 2017).

Interestingly, we showed that living *S. enterica* bacteria from the first injection were still present in haemolymph of *S. enterica*-primed individuals until 15 d post-priming procedure. While we would expect to observe a higher mortality in such individuals because they should be weak due to the constant fight against bacteria from the first infection, *A. vulgare* still presented higher survival rates when receiving a LD_{50} of bacteria 7 (and potentially 15) d later. We thus highlight that the enhanced protection against a second infection with *S. enterica* in *A. vulgare* is possible despite the lack of clearance of the same pathogenic bacteria in the haemolymph. This species is thus able to better survive inoculation with a large quantity of living pathogen, provided the successive infections are separated enough in time. Since the natural habitat of *A. vulgare* is highly contaminated by several species of bacteria (Ranjard and Richaume, 2001; Karimi et al., 2018), it would not be surprising that during the immune system evolution, *A. vulgare* developed strong resistance and/or tolerance to repeated pathogenic infections. Most of the studies focusing on immune priming used inactivated pathogens or purified molecules to trigger this phenomenon (Milutinovic and Kurtz, 2016; Chang et al., 2018), but the use of living pathogens seems more appropriate to describe the immunological capacities occurring under natural conditions.

4.4. Going inside the possible underlying mechanism(s)

Three main mechanisms are currently proposed to explain the protection conferred by immune priming (i) the “immune memory”, a recalled biphasic immune response implying a specific pathogen recognition, (ii) the “immune shift” consisting in a shift from one immune effector to another between successive infections and (iii) the “sustained immune boost”, an up-regulated and long lasting immune response lasting from the first to the second infection events (Contreras-Garduño et al., 2015; Coustau et al., 2016; Pinaud et al., 2016; Greenwood et al., 2017; Lanz-Medosa and Garduño, 2018; Gourbal et al., 2018; Melillo et al., 2018; Moret et al., 2019). In this study, as *S. enterica* persists in the haemolymph until 15 d after the first sublethal infection, the more plausible mechanism explaining such protection could be a sustained immune boost in *A. vulgare* individuals primed with the bacteria. As an example, the butterflies *Parasemia plantaginis* and *Galleria mellonella* display a sustained immune response to some pathogens, conferring a protective effect and with highly maintained ROS levels and haemocyte density following a first exposure (Mikonranta et al., 2014; Wu et al., 2014). Sustained immune response in our study was illustrated by the high haemocyte viability at any time for *S. enterica*-primed individuals. However, this high viability of haemocytes could also reveal the production and/or differentiation of a competent cell subpopulation (Sokolova et al., 2004; Snyman and Odendaal, 2009). As stated by Gourbal et al. (2018), “insects are able to select and activate a competent subpopulation of cells with enhanced capacities of lysis or phagocytosis”. For example, Rodrigues et al. (2010) demonstrated that the immune priming protection in mosquitoes against *Plasmodium* is not linked to a variation in haemocyte concentration but to an increased proportion of circulating granulocytes. Similarly, the survival improvement of *S. enterica*-primed individuals could be due to the selection and/or production of a more efficient subset of haemocytes, resulting in a protective effect against the second infection of *S. enterica*. We noticed that LB-primed individuals also displayed higher haemocyte viability than non-primed ones at 7 and 15 d post-priming, suggesting LB broth injection could also induce a cellular immune response (e.g Markus et al., 2005).

The protective effect of immune priming in invertebrates is not based on a universal system but mobilizes a diversity of immune effectors (Brehélin and Roch, 2008; Pradeu and Pasquier, 2018, Melillo et al., 2018). We thus assume that haemocyte concentration and viability in *A. vulgare* cannot fully explain the increase in survival. The next step to further investigate the immune priming mechanism would be to analyze the dynamics of other immune parameters, for example, haemocyte types, ROS and AMP production. We also suggest studying the immune response over a longer period of time and testing the specificity of this response against different pathogenic species. In addition, inactivated pathogens could be used for the priming injection in order to determine the end of the first immune response if there is one (Milutinovic and Kurtz, 2016).

4.5. Concluding remarks

Ours results contribute to the understanding of immune priming, by providing additional details about the protective effect (in terms of survival) and the haemocyte responses in another example of a long-lived non-model arthropod. Since cell proliferation is not often

monitored during the priming response (Contreras-Guarduño et al. 2016), this work also constitutes a baseline for further studies on cellular responses and the temporal dynamics of immune priming in invertebrates.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

We thank Maryline Raimond and Clémentine Bernier for their help in the laboratory and Charlotte Depeux for discussions on the subject.

Funding

This work was supported by the grant Vivipary and Immune Priming (PEPS EXOMOD CNRS); the State-Region Planning Contracts (CPER); the European Regional Development Fund (FEDER); the French Centre National de la Recherche Scientifique; the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the University of Poitiers.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278.

References

Adamo, S.A., 2017. Stress responses sculpt the insect immune system, optimizing defense in an ever-changing world. Dev. Comp. Immunol. 66, 24–32. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.005.

Agresti, A., 2002. Categorical data analysis. 2nd Edition, Hoboken, NJ: Wiley. doi:10.1002/0471249688.

Akoda, K., Van Den Bossche, P., Marcotty, T., Kubi, C., Coosemans, M., Dedeken, R., 2009. Nutritional stress affects the tsetse fly's immune gene expression. Med. Vet. Entomol. 23, 195–201. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00799.x.

Andino, A., Hanning, I., 2015. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars, 2015. Scientific. World J. https://doi.org/10.1155/2015/520179.

Ayres, J.S., Schneider, D.S., 2009. The role of anorexia in resistance and tolerance to infections in Drosophila. PLoS Biol. 7. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000150.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. J. Statist. Softw., [S.l.] 67 (1), 1–48. https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01.

Beck, M.L., Price, J.O., 1981. Genetic variation in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*. J. Hered. 72, 15–18. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109417.

Best, A., Tidbury, H., White, A., Boots, M., 2012. The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in invertebrate hosts. J. R. Soc. Interface 10, 20120887. https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0887.

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, e3286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003286.

Braquart-Varnier, C., Raimond, M., Mappa, G., Chevalier, F.D., Clec'h, W Le, Sicard, M., 2015. The hematopoietic organ: a cornerstone for *Wolbachia* propagation between and within hosts. Front. Microbiol. 6, 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01424.

Brehélin, M., Roch, P., 2008. Specificity, learning and memory in the innate immune response. Invertebrate Surv. J. 5 (2), 103–109 https://prodinra.inra.fr/record/42302.

Broly, P., Deneubourg, J.L., Devigne, C., 2013. Benefits of aggregation in woodlice: a factor in the terrestrialization process? Insectes Soc. 60, 419–435. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0313-7.

Broly, P., Devigne, L., Deneubourg, J.L., Devigne, C., 2014. Effects of group size on aggregation against desiccation in woodlice (Isopoda: Oniscidea). Physiol. Entomol. 39, 165–171. https://doi.org/10.1111/phen.12060.

Browne, N., Surlis, C., Kavanagh, K., 2014. Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 63 (1), 21–26. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006.

Cerenius, L., Söderhäll, K., 2011. Coagulation in Invertebrates. J. Innate Immun. 3, 3–8. https://doi.org/10.1159/000322066.

Chang, Y.H., Kumar, R., Ng, T.H., Wang, H.C., 2018. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. In: Developmental and Comparative Immunology Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003.

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018531.

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Rodríguez, M.H., Alvarado-Delgado, A., Lanz-Mendoza, H., 2014. Cost of immune priming within generations: Trade-off between infection and reproduction. Microbes Infect. 16, 261–267. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.010.

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Moreno-García, M., Velazquez-Meza, M.E., Valverde, V., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M.H., Lanz-Mendoza, H., 2015. *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection. Dev. Comp. Immunol. 52, 172–181. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.004.

Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., Canales-Lazcano, J., 2016. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. Ecol. Entomol. 41, 351–366. https://doi.org/10.1111/een.12300.

Coustau, C., Kurtz, J., Moret, Y., 2016. A novel mechanism of immune memory unveiled at the invertebrate-parasite interface. Trends Parasitol. 32, 353–355. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.005.

Dhinaut, J., Chogne, M., Moret, Y., 2018. Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. J. Anim. Ecol. 87, 448–463. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661.

Durand, S., Cohas, A., Braquart-Varnier, C., Beltran-Bech, S., 2017. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. Behav. Ecol. Sociobiol. 71, 90. https://doi.org/10.1007/s00265-017-2317-1.

Fox, J., Sanford, W., 2011. Cox Proportional-hazards regression for survival data in R. In: An R Companion to Appl Regression, Second Ed. pp. 1–18. https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.02.029.

Fugmann, S. D., Gung, C., & Hospital, M., 2018. Invertebrate adaptive immunology, 1–8. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20729-2.

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G.J.M., Van Der Meer, J.W.M., Conrath, U., Netea, M.G., 2018. Innate immune memory: an evolutionary perspective. Immunol. Rev. 283, 21–40. https://doi.org/10.1111/imr.12647.

Greenwood, J.M., Milutinović, B., Peuß, R., Behrens, S., Esser, D., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., Kurtz, J., 2017. Oral immune priming with *Bacillus thuringiensis* induces a shift in the gene expression of *Tribolium castaneum* larvae. BMC Geno. 18, 329. https://doi.org/10.1186/s12864-017-3705-7.

Herbiniere, J., 2006. Contribution à la mise en évidence des effecteurs impliqués dans l'immunité innée d'Armadillidium vulgare, crustacé isopode terrestre infecté par une bactérie du genre Wolbachia. Ecologie, Environnement. Université de Poitiers, 2005. Français.

Harrison, X.A., 2014. Using observation-level random effects to model overdispersion in count data in ecology and evolution. PeerJ 2, e616. https://doi.org/10.7717/peerj.616.

Harrison, X.A., Donaldson, L., Correa-Cano, M.E., Evans, J., Fisher, D.N., Goodwin, C.E.D., Robinson, B.S., Hodgson, D.J., Inger, R., 2018. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. PeerJ 6https://doi.org/10.7717/peerj.4794. e4794 1-32.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284, 1313–1318. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313.

Hornung, E., 2011. Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: structure, physiology and behavior. Terr. Arthropod Rev. 4, 95–130. https://doi.org/10.1163/187498311X576262.

Jacot, A., Scheuber, H., Kurtz, J., Brinkhof, M.W.G., 2005. Juvenile immune system activation induces a costly upregulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 272, 63–69. https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2919.

Khan, I., Prakash, A., Agashe, D., 2016. Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. Ecol. Evol. 6 (21), 7847–7855. https://doi.org/10.1002/ece3.2532.

Khan, I., Prakash, A., Agashe, D., 2017. Experimental evolution of insect immune memory versus pathogen resistance. Proc. R. Soc. B 284, 20171583. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1583.

Karimi, B., Chemidlin, Prévost-Bouré N., Dequiedt, S., Terrat, S., Ranjard, L., 2018. —Atlas français des bactéries du sol. Muséum national d'Histoire naturelle. Paris; Biotope, Mèze 192, p.

Kostrzewa, M., 2018. Application of the MALDI Biotyper to clinical microbiology: progress and potential. Exp. Rev. Proteom. https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1438193.

Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. Trends Immunol. 26, 186–192. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001.

Kutzer, M.A.M., Kurtz, J., Armitage, S.A.O., 2019. A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. J. Anim. Ecol. 88 (4), 566–578. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953.

Lanz-Mendoza, H., Garduño, J., 2018. Insect Innate Immune Memory. In: Cooper, Edwin L. (Ed.), Advances in Comparative Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 193–211. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_9.

Lee, S.Y., Söderhäll, K., 2002. Early events in crustacean innate immunity. Fish Shellfish Immunol. 12, 421–437. https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0420.

Lenth, R.V., 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. J. Statist. Software 69 (1), 1–33. https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01.

Little, T.J., Kraaijeveld, A.R., 2004. Ecological and evolutionary implications of

immunological priming in invertebrates. Trends Ecol. Evol. 19, 58–60. https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011.
Márkus, R., Kurucz, É., Rus, F., Andó, I., 2005. Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in Drosophila melanogaster. Immunol. Lett. 101, 108–111. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.03.021.
Melillo, D., Marino, R., Italiani, P., Boraschi, D., 2018. Innate immune memory in invertebrate metazoans: a critical appraisal. Front. Immunol. 9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915.
Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M., Freitak, D., 2014. Insect immunity: Oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. Front. Zool. 11, 1–7. https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23.
Milutinović, B., Kurtz, J., 2016. Immune memory in invertebrates. Semin. Immunol. 28, 328–342. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004.
Moret, Y., Schmid-Hempel, P., 2000. Survival for immunity: The price of immune system activation for bumblebee workers. Science (80-.). 290, 1166–1168. https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1166.
Moret, Y., Coustau, C., Braquart-Varnier, C., Gourbal, B., 2019. Immune Priming and Trans-Generational Protection From Parasites. In: Encyclopedia of Animal Behavior. Elsevier, pp. 764–774. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90726-X.
Muñoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D., Bachère, E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. Eur. J. Biochem. 269, 2678–2689. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02934.x.
Murray, C.J., 1991. Salmonellae in the environment. Rev. Sci. Tech. Off. Int. des Epizoot. 10, 765–785. https://doi.org/10.5772/2470.
Persson, M., Cerenius, L., Söderhäll, K., 1987. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus Dana*, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. J. Fish Dis. 10, 471–477. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb01098.x.
Pigeault, R., Garnier, R., Rivero, A., Gandon, S., 2016. Evolution of transgenerational immunity in invertebrates. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 283. https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1136.
Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F.C., Olive, M.A., Allienne, J.F., Galinier, R., Dheilly, N.M., Kieffer-Jaquinod, S., Mitta, G., Théron, A., Gourbal, B., 2016. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. PLoS Pathog. 12, 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361.
Pipe, R.K., Coles, J.A., 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. Fish Shellfish Immunol. 5, 581–595. https://doi.org/10.1016/S1050-4648(95)80043-3.
Ponton, F., Wilson, K., Holmes, A.J., Cotter, S.C., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2013. Integrating nutrition and immunology: a new frontier. J. Insect Physiol. 59, 130–137. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.011.
Pope, E.C., Powell, A., Roberts, E.C., Shields, R.J., Wardle, R., Rowley, A.F., 2011. Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after "vaccination". PLoS ONE 6, 1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020960.
Pradeu, T., Du Pasquier, L., 2018. Immunological memory: What's in a name? Immunol. Rev. 283, 7–20. https://doi.org/10.1111/imr.12652.
Prigot-Maurice, C., Cerqueira de Araujo, A., Durand, S., Laverré, T., Pigeault, R., Verdon, J., Bulet, P., Beltran-Bech, S., Braquart-Varnier, C., 2019. Datasets of Survival capacity of the common woodlouse Armadillidium vulgare is improved with a second infection of Salmonella enterica. Mendeley Data. https://doi.org/10.17632/nn5j83fp34.2. v2.
R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org.
Ranjard, L., Richaume, A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol. 152, 707–716. https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7.
Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves, L.C., Dixit, R., Barillas-mury, C., 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in Anopheles gambiae mosquitoes. NIH Public Access. Science (80-.). 329, 1353–1355. https://doi.org/10.1126/science.1190689.
Rosengaus,R.B., Traniello,J.F.A., J.J., T. Chen, Brown, R.D. Karp., 1999. Immunity in a social insect. Naturwissenschaften 86, 588–591, http://dx.doi.org/10. 1007/s001140050679.
Roth, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P., Kurtz, J., 2009. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 276, 145–151. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1157.
Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 50, 529–551. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420.
Scott, J.S., Sterling, S.A., To, H., Seals, S.R., Alan, E., Scott, J.S., Sterling, S.A., To, H., Seals, S.R., Alan, E., 2016. Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis 4235. https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1165350.
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, 819–826. https://doi.org/10.1007/s00114-0100699-2.
Siva-Jothy, M.T., Thompson, J.J.W., 2002. Short-term nutrient deprivation affects immune function. Physiol. Entomol. 27, 206–212. https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00286.x.
Snyman, R.G., Odendaal, J.P., 2009. Effect of cadmium on haemocyte viability of the woodlouse *Porcellio laevis* (Isopoda, Crustacea). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83, 525–529. https://doi.org/10.1007/s00128-009-9814-5.
Söderhäll, I., 2016. Crustacean hematopoiesis. Dev. Comp. Immunol. 58, 129–141. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.009.
Söderhäll, I., Bangyeekhun, E., Mayo, S., Söderhäll, K., 2003. Haemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. Dev. Comp. Immunol. 27, 661–672. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(03)00039-9.
Söderhäll, K., Cerenius, L., 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Fish Dis. 2, 3–23. https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90053-Z.
Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes, F.M., 2004. Cadmium-induced apoptosis in oyster haemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. J. Exp. Biol. 207, 3369–3380. https://doi.org/10.1242/jeb.01152.
Therneau, T.M., Grambsch, P.M., Pankratz, V.S., 2003. Penalized survival models and frailty. J. Comput. Graph. Stat. https://doi.org/10.2307/1391074.
Torsvik, V., Gok0syr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 782–787.
Warburg, M.R., Llnsenmair, K.E., Bercovitz, K., 1984. The effect of climate on the distribution and abundance of isopods. Symp. Zool. Soc. L. 53, 339–367. https://doi.org/10.1108/eb003826.
Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M.H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., La Camera, S., Moumen, B., Greve, P., Bouchon, D., Berjeaud, J.M., Braquart-Varnier, C., 2016. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01484.
Wu, G., Zhao, Z., Liu, C., Qiu, L., 2014. Priming *Galleria mellonella*; (Lepidoptera: Pyralidae) Larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photorhabdus luminescens*; TT01 and the role of innate immunity in the process. J. Econ. Entomol. 107, 559–569. https://doi.org/10.1603/EC13455.
Wu, G., Li, M., Liu, Y., Ding, Y., Yi, Y., 2015. The specificity of immune priming in silkworm, *Bombyx mori*, is mediated by the phagocytic ability of granular cells. J. Insect Physiol. 81, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.004.
Wu, G., Xu, L., Yi, Y., 2016. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionatal cellular and humoral immune responses. Immunol. Lett. 174, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2016.04.013.
Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., Song, L., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. Dev. Comp. Immunol. 45, 141–150. https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.015.
Zimmer, M., 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary-ecological approach. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 77https://doi.org/10.1017/S1464793102005912. S1464793102005912.

ANNEXE 2

Immune priming in *Armadillidium vulgare* against *Salmonella enterica*: direct or indirect costs on life history traits?

Cybèle PRIGOT-MAURICE[1*], Charlotte DEPEUX[1*], Hélène PAULHAC[1], Christine BRAQUART-VARNIER[1#], Sophie BELTRAN-BECH[1#]

1 Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, 5 11 rue Albert Turpin, TSA51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

*Co-first authors
#Co-last authors
Contact : cybele.prigot@univ-poitiers.fr

Abstract

Invertebrate's immune priming is defined as an enhanced protection against second pathogenic infection, when individuals have been previously exposed to same, or different, pathogens. Immune priming can be energetically costly for individuals, that consequently impacts the trade-off between life-history traits like reproduction, growth, and lifetime. Here, we investigated the reproductive cost(s) and senescent patterns of immune priming against *S. enterica* in the common woodlouse *A. vulgare* (Crustacean, Isopoda). We used four different groups of females that either (1) have never been injected, (2) injected twice with *S. enterica* (i.e. immune-primed females, 7 days between infections), (3) firstly injected with LB-broth, then with *S. enterica* or (4) females injected only once with *S. enterica*. All females were allowed to breed with one non-infected males and followed for 8 months. Then, we compared the number of clutches produced, the time taken to produce the clutch(es), the number of offspring of each clutch, the senescent biomarkers of females and the parameters of their haemocytes. We highlighted that immune priming did not significantly impact reproductive abilities, senescent patterns, and immunity post-breeding of females *A. vulgare*, but it had an indirect effect through the weight of females. The lighter immune-primed females took less time to produce the first clutch, that contained less offspring, but they were more likely to produce a second clutch. The opposite effects were observed in the heavier immune-primed females. We showed that immune priming was not as much costly as expected, at least on these traits in this generation, but this was likely to influence the reproductive strategies of females depending on their weight.

Keywords

immune priming, isopod, crustacean, reproduction, trade-off, survival, senescence, haemocytes

Introduction

Because fighting pathogens is a real challenge for all living organisms, they acquired an important and complex biological process: the immune system (Siva-Jothy et al. 2005, Danilova 2006). The immune system is commonly divided into: (1) the innate immunity, which is found in all organisms and is based on non-specific recognition of intruders (Medzhitov and Janeway 2000) and (2) the adaptive immunity, which is observed only in jawed vertebrates and allows the remembering of previously encountered pathogens to prepare the immune response upon the secondary exposure thanks to specialized cells : the lymphocytes (Cooper and Alder 2006). Since invertebrates only have the innate immunity, it has long been thought that they were not able to express adaptative features in their immune response (Janeway and Medzhitov, 2002; Cooper and Eleftherianos, 2017). Recent finding reported the other way around : more than 40 invertebrates species improve their survival abilities upon a second pathogenic infection when they have been previously exposed to the same – or another – pathogen (Little and Kraaijeveld 2004, Kurtz 2005, Milutinović and Kurtz 2016, Netea et al. 2019). This immune process in invertebrate is called "immune priming". The protection in place during the first infection can lasts for few days to several month depending on the species (Milutinović and Kurtz 2016) and is mediated by three, non-exclusive, major mechanisms : (1) the recalled immune response, involving a first immune response that return to basal levels before the second pathogenic exposure, then a second enhanced immune response with same immune components ; (2) the immune shift, that involve a first type of immune response (e.g. cellular), then a second, better, immune response of a different kind (e.g. humoral) during the second infection and (3) the sustained immune response, which last from the first to the second infection event (Coustau et al. 2016, Melillo et al. 2018).

Although immune priming is advantageous in terms of survival, its implementation could be costly for the host, particularly when it relies on the long-lasting sustained immune response (Moret 2003, Contreras-Garduño et al. 2014, 2019, Coustau et al. 2016, Shikano et al. 2016, Rosengaus et al. 2017, Dhinaut et al. 2018, Khan et al. 2019). According to the theory of life history trait, organisms must allocate their limited energy to different biological functions by making trade-offs. Individuals which invest a lot in reproduction during their early life may have lower survival abilities (Descamps et al. 2006, Lemaître et al. 2015). On the opposite side, individuals investing

in their somatic maintenance (including pathogens clearance) have less energy for the other functions, that could often decrease their reproductive abilities (Rolff and Siva-Jothy 2003, Schmid-Hempel 2005, Luu and Tate 2017). In *A. gambiae*, immune-primed females which clear the second infection of *P. berghei* do not produce eggs, and those which do not successfully eliminate *P. berghei* got lower hatching rate compared to non-primed females (Contreras-Garduño et al. 2014). In addition, the immune responses of invertebrates sometimes involved cytotoxic compounds (phenoloxidase products, reactive oxygens species, etc), which can damage the cells and tissues of the host, especially if the immune response is systemic (Moret, 2003; Saad et Siva-Jothy, 2006; Söderhäll et Cerenius 1998). However, the investment in immune functions can sometimes enhance the reproductive abilities of individuals, through the terminal investment strategy (Adamo 1999, Duffield et al. 2017, Luu and Tate 2017). Females *T. molitor* previously challenged with *A. globiformis* or *B. thuringiensis* display higher hatching rate of eggs than the non-primed females (Dhinaut et al. 2018). The terminal investment strategy can also be triggered by senescent pattern of individuals, because ageing results in somatic deterioration and reduced lifetime, like immune response do (Comfort 1964).

Nevertheless, several studies did not observe the impact of repeated infections with pathogens on the reproductive abilities of individuals, within same or different generations (Faria et al. 2015, Gupta et al. 2016, Prakash et al. 2022). In a recent experimental evolution study, *T. castaneum* lineages that evolved with two subsequent infections with inactivated and live *B. thuringiensis* during 14 generations display lower reproductive cost compared to individuals that evolved only with inactivated *B. thuringiensis* challenges (Prakash et al. 2022). These experiments highlight that reproduction is not always influenced by the selection of increased immune resistance across generations. Most empirical studies that investigated the influence of immune priming on the reproduction of females analysed reproductive abilities after the first infection and on the next generation (Zanchi et al. 2012, Trauer and Hilker 2013, McNamara et al. 2014, Rosengaus et al. 2017, Dhinaut et al. 2018). Although these results provide important knowledges on the evolutionary trade-offs with reproduction resulting from a first immune stimulation, we are currently lacking knowledges about the reproductive cost of females that survived both the first stimulation and the second infections with living pathogens (Contreras-Garduño et al. 2014, Khan et al. 2019, Kutzer et al. 2019, Prakash et al. 2022). We also ignore whether immune priming and the following reproduction affect the ageing pattern of individuals, although they should be linked.

Among the numerous species in which immune priming has been observed, the common woodlouse *A. vulgare* (terrestrial isopod, crustacean) is an appropriated model to investigate this issue. *A. vulgare* can mount an immune priming response with two subsequent infections of living *Salmonella enterica* injected 7 days apart (Prigot-Maurice et al. 2019). The underlying mechanism is expected to be the sustained immune response of primed-individuals, which display long-lasting, higher viability of haemocyte compared to the individuals of controls treatment (Prigot-Maurice et al. 2019). This assumption is notably supported by the persistence of *S. enterica* in the haemolymph of individuals between the infections. Although primed individuals should die faster than those submitted to the other treatments, this study shows that they are even more able to survive and deal with very high titres of pathogenic bacterium (Prigot-Maurice et al., 2019). Hence, the energetic costs of mounting long-lasting immune priming and simultaneously repairing the tissues damaged by persistent *S. enterica* infection should be very high in this host-pathogen system. In addition, female *A. vulgare* develop a ventral poach, named marsupium, in which the eggs incubate throughout embryogenesis (Surbida and Wright 2001). This extensive maternal care also requires energic resources (Warburg et al. 2001). *A. vulgare* is an indeterminate grower that allocates energy in growth all its lifetime. Since the size of individuals is closely correlated to the weight in this species, the tallest and heaviest individuals are the oldest. In natural populations, the average lifespan of *A. vulgare* is around two years, although the majority of individuals dies around the age of one year-old, following the first reproductive event (Paris and Pitelka 1962). This long lifespan for an invertebrate species opens the possibility to easily observed trade-offs between somatic maintenance and reproductive investment. Recently, several biomarkers have been identified to estimate the cellular senescent patterns in *A. vulgare* (Depeux et al. 2019). Because these biomarkers allow to determine the senescent patterns of individuals of the same age, they may also provide important information about the cost of maintaining survival and/or reproduction under stressful conditions, like infections with pathogen.

In this study, we explored the impact of immune priming with *S. enterica* in the reproductive abilities and the resulting senescent patterns of *A. vulgare*. Our main objectives were: (1) to test whether mounting an immune priming response affects the reproduction of females that successfully survived two subsequent infections with living *S. enterica* and (2) to explore to what extend immune priming and reproduction change the senescent patterns of individuals, by using

two senescent biomarkers (β-galactosidase activity, size of the viable haemocytes) described in Depeux et al., (2020). Since reproduction is known to negatively affect the immune system (Lawniczak et al. 2007), we also (3) compare the total concentration and viability of haemocytes after the last reproductive event of females. To do so, we used females firstly injected (i.e. primed) either with a low living dose of *S. enterica*, sterile LB-broth or non-primed females. Seven days later, we injected all these females with LD_{50} of *S. enterica*. Since the fecundity of terrestrial isopod females is correlated with their size (Sutton et al. 1983, Antoł and Czarnoleski 2018, Durand et al. 2018) and immune responses may decrease the growth and/or weight of the females (Moret 2006, Bascuñán-García et al. 2010, Kelly 2011), we weighed the females that survived the second infection of *S. enterica* and allowed them to mate with one virgin, non-injected male. We also added females that have never been injected with *S. enterica* but maintained in same experimental conditions as the females of other treatments. To compare the reproductive cost of females mounting immune priming or not, we measured the probability of producing one or two clutches, the time taken to produce these clutches, and the number of viable offspring in each clutch. After the reproductive(s) event(s), we analysed the β-galactosidase activity and the haemocyte parameters (size of viable haemocytes, concentration, and viability of haemocytes) of all females.

Materials and method

1. *Biological model and bacterial strain*

In this experiment, we used the same *A. vulgare* line used in the study of Prigot-Maurice et al. (2019). The virgin females of 1 year old (+/- 2 months) come from laboratory cross breeding initially sampled at Helsingor, Denmark, in 1982. During the breeding period, females were kept in moistened potting mix supplied with linden leaves and carrot slices *ad libitum* in 10x30 cm boxes, under natural photoperiod and room temperature.

To perform the infections, we used the *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* J18 strain (Verdon et al., 2016). The cultures of *S. enterica* were performed as described in Braquart-Varnier et al. (2015). Briefly, the *S. enterica* strain came from one frozen glycerol stock, streaked on Luria-Bertani Broth plates (25 $g.L^{-1}$ of LB base, Invitrogen 12795-027 supplemented with 15 $g.L^{-1}$ of agar-agar, Fisher BioReagentsTM BP1423-2) at 37°C overnight. One Colony Forming Unit (CFU)

was then added to 5 mL of liquid LB broth at 37°C, 180 rpm overnight. 100 µL of this *S. enterica* culture were grown in 3 mL of fresh LB broth with same condition to reach an optical density of 0.8 (600nm). 1 mL were centrifugated (2 min, 4°C, 13 000 g) and the bacterial pellet was resuspended in 100 µL of LB broth. This first tube contained 10^6 *S. enterica* for 100 nL of injection (LD_{50} dosage). Serial dilution was then achieved to obtain the dosage for the first injection (10^3 *S. enterica* for 100 nL). To control the quantity of injected *S. enterica*, we diluted 4 times more the first tube, reaching a concentration of 1 bacterium per µL. We plated 100 µL of this solution onto LB agar plate and we counted the number of CFU after an overnight culture at 37°C.

2. Experimental design

Firstly, we performed the priming procedure (see part II.3) on three females' treatments: either primed (i.e. primo-injected) with the low dose of *S. enterica* (SAP, for *S. enterica*-primed), with sterile LB broth (LPB, for LB-primed) or without priming injection (NP, for non-primed; Fig.1). We added a fourth treatment in which the females have never been injected (NI, for non-injected). We used a total of 123 females, including 33 NP, 33 LBP, 32 SA and 25 NI. 7 days after the priming procedure, SAP, NP and LBP females were all injected with a LD_{50} of *S. enterica* (see part II.3) and their survival were monitored for 22 days (see part II.3). Surviving females (NP = 20, LBP = 27, SAP= 26, NI = 25) were weighted and placed onto a box (5x8cm Ø) with one virgin non-injected male (Fig.1). Each pair of individuals were kept on moistened potting mix with linden leaves and carrot slices *ad libitum* under a stimulating photoperiod (18:6, D/N) at 21°C.

Every three days for around 8 months, we measure the survival rate and the physiological states of all females by observing their ventral face. The females that were about to lay eggs develop a marsupium following a parturial moult, which is observable under a binocular loupe (Moreau and Rigaud 2002). Once females were ready to deliver their offspring, they were placed alone in a box with a soft humid paper. For each female, we counted the number of clutches (one or two), the number of days that they took to produce each clutch (i.e. from the contact to male to the delivery of offspring; or the time between the first and the second clutch), the number of offspring produced for each clutch and the total number of produced offspring (Fig.1). After the second clutch (when it occurred), we washed the females (0.28% NaClO then water) and measured the viable haemocyte size, viability, and concentration (see part II.4). We dissected the nervous chain to quantify the β-

galactosidase activity (see part II.5). Since not all females produced a second clutch, we decided to sample and dissect the females that had only one clutch at the same time we did this for the last females which produced the second clutch (around 8 months after the beginning of the experiment; Fig. 1).

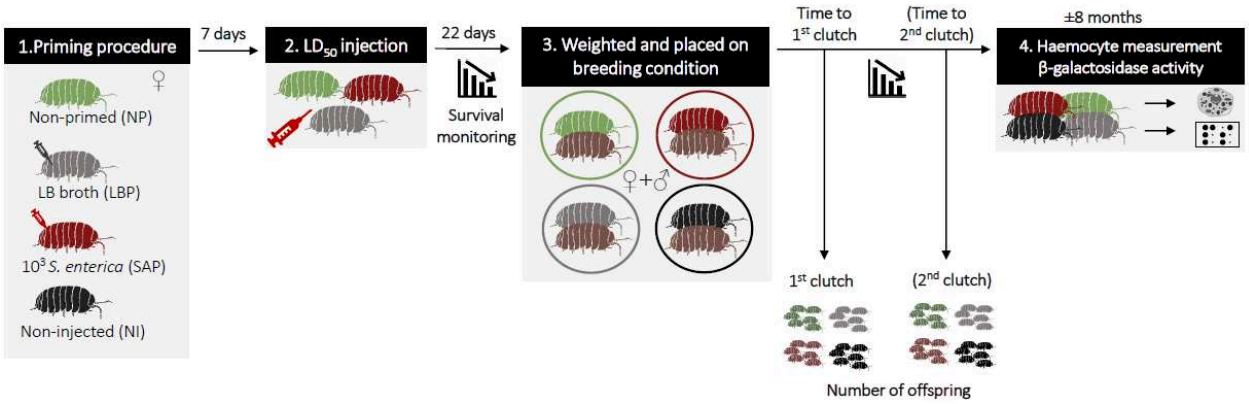


Figure 1. Experimental diagram. **(1)** The priming procedure consisted of injected either a low dose of living *S. enterica* (SAP), or sterile LB Broth (LBP). The non-primed (NP) and non-injected (NI) females did not receive the first injection, as controls. **(2)** NP, LBP and SAP treatments received the second, LD_{50} injection of living *S. enterica.* **(3)** All females (NI, NP, LBP, SAP) were allowed to reproduce individually in a box with one virgin, non-injected males (brown woodlouse). We checked the survival of females, the number of clutch (1 or 2), the time to produce each clutch (i.e. number of days) and the number of offspring in each clutch. **(4)** Regularly, we sampled and dissected females that produced the second clutch to analyse haemocytes and β-galactosidase activity. Around 8 months later, we waited the last females produce their second clutch to also sample and dissect females that produced only one clutch.

2.1. Priming procedure and LD_{50} injections

Priming procedure with *S. enterica* was performed as described in Prigot-Maurice et al. (2019). Briefly, females were washed (0.28% NaClO then water) and injected dorsally between the 6th and 7th pereion segment under sterile conditions using a Drummond TM Nanoject (3–000-205A). Injections were performed by two successive injections of 50 nL, either with $10^3 \pm 1.10^2$ living *S. enterica*, or sterile LB Broth. All females (SAP, LBP, NP and NI) were individually isolated in plastic box, on a moist paper without food. We controlled the injected dosage as described above (see part II.1). 7 days later, the SAP, LBP and NP females were injected with $10^6 \pm 1.10^5$ living *S. enterica* in 100 nL of LB broth (i.e. LD_{50}, dosage to kill 50% of animal in 7 days) in the same way as for the priming procedure. Females were replaced on their box, and we monitored their survival (i.e. immune priming protection) every 8 hours for 7 days. We adjusted the humidity of each box daily. Then, females were placed alone on moistened potting mix with

linden leaves and carrot slices *ad libitum* during 15 days before we added the virgin, non-injected male.

2.2. Haemocyte analysis

After their second clutch, females were washed (0.28% NaClO then water). The haemocyte concentration (number of haemocytes per µL of haemolymph), the viability of haemocytes (percentage of viable haemocytes) and the size of viable haemocytes (µM) were measured as described in (Sicard et al. 2010). 3 µL of haemolymph were sampled by piercing the females in the 6th tergite with a sterile needle and directly diluted in 15 µL of MAS solution (27mM sodium citrate:336mM NaCl, 115mM glucose, 9mM EDTA, pH 7; (Herbinière 2005)). We added 6 µL of Trypan blue (0.4%) and 10 µL of the resulting sample were deposited in the counting chamber of the automated cell counter Countess^{TM} Version B (Invitrogen). We waited that the last females produced their second clutch (around 8 months) to sample and dissect females which produced only one clutch.

2.3. β-galactosidase activity

After collecting their haemolymph, all females used for haemocyte analysis (see Part II.2.b) were dissected in Ringer solution (135 mM sodium chloride, 2 mM potassium chloride, 2 mM calcium chloride, 2 mM sodium bicarbonate) to collect their nerve cords. The β-galactosidase activity was measured as described in (Depeux et al. 2019). Briefly, each nerve chain was deposited in 300 µL of Lyse buffer 1X (5 mM Chaps detergent, 40 mM citric acid, 40 mM sodium phosphate, 0.5 mM benzamidine, and 0.25 mM PMSF, pH 6) and ground manually before being centrifuged for 30 min at 15 000 g, 4 °C. The supernatant was collected, and proteins were assayed using the BCA (bicinchoninic acid assay) assay (Thermo Fisher Scientific) and homogenized at 0.04 mg. mL to perform the β-galactosidase activity assay on the same titres of proteins. Subsequently, 100 µL of each protein sample was added to the MUG reagent solution (4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside) in a 96-well microplate. The fluorescence produced by the synthesis of 4-methylumbelliferone (4-MU) was measured by the multimode Mithrax microplate reader (LB940

HTS III, excitation filter: 120nm, emission filter: 460nm; Berthold Technologies) for 120 minutes. Two replicates were set up for each sample to obtain the result by averaging the replicates.

4. Statistical Analysis

All statistical analysis were performed with Rstudio (v.1.4; (R Core Team 2017)). We compared the survival rates of females after the LD_{50} and during the reproductive period by using two global mixed effects Cox proportional hazard regression models, built with the *coxme* package (Therneau et al. 2003). We entered the priming treatment (NP, LBP, SA, NI) as fixed effect, and the Hazard Ratios (HR) were estimated thanks to the instantaneous risks of death between control (NP or NI) and other priming treatment (NP, LBP and SAP).

The differences of the weight between the females before reproduction were tested with a linear mixed effect model built with *lme4* and *car* package (Fox and Weisberg 2011, Bates et al. 2014), including the priming treatment as fixed effect.

Concerning the first reproductive event, we tested the probability of producing the first clutch with one generalized linear mixed effect model with binary logistic regression (i.e. 1-0; (Harrell 2015). As the weight of females is known to influence their fecundity (Sutton et al. 1983, Antoł and Czarnoleski 2018, Durand et al. 2018), we included the weight, the priming treatment, and their interaction as fixed effects. The time to produce the first clutch (i.e. number of days from the first contact with male, to the delivery of offspring) and the number of offspring of the first clutch were modelled in two linear mixed effect models including the weight, the treatment and their interaction as fixed effects. For the second reproductive event, we used three models like those concerning the first reproductive event. Since the first reproduction can influence the second reproduction because of energy investment, we added the number of produced offspring in the first clutch as fixed effect with the treatment, the weight and the interaction between the treatment and the weight.

The total number of offspring (first and second clutch included) was analysed with one linear mixed effect models including the treatment and the weight as fixed effect.

The haemocyte concentrations (number of cells per µL of haemolymph), the size of viable haemocytes and β-galactosidase activity were analysed using linear models with Gaussian distribution and viability (proportion of viable haemocytes) using one generalised model with Binomial distribution (Harrison et al. 2018). Since the haemocyte parameters and ageing biomarkers were analysed both in females having one or two clutch(es), we used four mixed effect models, including the treatment, the number of clutches of the females and the total number of offspring (first and second clutch included) as fixed effects. To deepen the potential interdependence of treatments and reproduction, we only allowed interactions of the treatment with the total number of offspring and the treatments with the number of clutches.

For all models (i.e. survival, weight, probability of producing the first and second clutch, time to produce these clutches, the number of offspring inside each clutch, haemocytes parameters and β-galactosidase activity), we entered the experimental replicate as random factor. This factor allows to correct the non-independence of samples within the same replicate of treatment (Harrison et al. 2018). Whether the treatment influenced the considered variable, we compared the pairs of means between each treatment by using Tukey adjustment (*lsmeans* packages; (Lenth 2016)). When interactions with treatment and weight were significative in our models, we performed the Pearson's correlation test for each treatment, to obtain the effect of weight for each treatment.

The R script and the datasets used to perform our analysis are available on the open access repository Mendeley Data (https://data.mendeley.com/datasets/gd24nvncvf/draft?a=0155be3c-0f7c-4338-b990-33f82e59d161)

Results

1. Survival abilities

The survival abilities of females after the LD_{50} injection and before reproduction tended to be influenced by the treatment (Chisq = 5.17, df = 2, p = 0.07; Fig. 2A). SAP and LBP females tended to better survive than NP females (p = 0.06 for each, Tab. 1S), with 59% lower risk of death for each (LBP: HR = 0.41, 95% CI= [0.15-1.1]; SAP: HR = 0.41, 95% CI = [0.16-1.1]). No difference of survival was observed between SAP and LBP females (Fig. 2A, Tab. 1S). During the

reproductive period, the survival of females was not influenced by the treatment (Chisq = 0.53, df = 3, p = 0.91; Fig. 3). Whatever the number of previous infections with *S. enterica*, injected females had same survival abilities than females that had never been injected (Fig. 2B, Tab.1S).

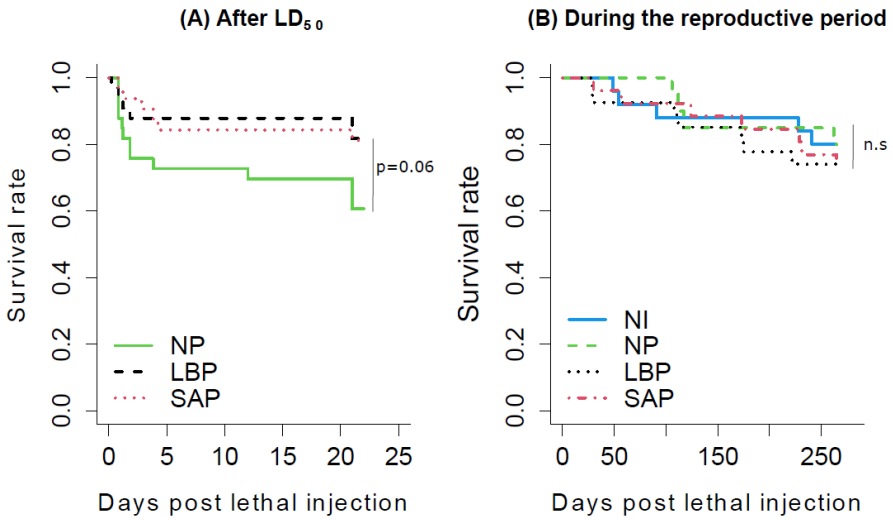


Figure 2. Survival rate **(A)** 22 days after the LD_{50} injection and **(B)** during the reproductive period (around 8 months). NP: females non-primed in the priming procedure, LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI: females that have never been injected. NP, LBP and SAP received the LD_{50} injection. Statistical results are presented in Table 1S.

2. Weight of females

The weight of females after the second infection with *S. enterica* (before reproduction) was influenced by the treatment (Chisq = 8.05, df = 3, p = 0.04; Fig. 1S; Tab. 2S). NI females tended to be heavier than NP females (Mean ± SE: NI = 0.15g ± 0.008, NP = 0.12g ± 0.01; estimate = 0.03, se = 0.01, df = 82.8, p = 0.09; Fig. 4) and SAP females (Mean ± SE: NI = 0.15g ± 0.008, SAP = 0.12g ± 0.007, estimate = 0.02, se = 0.01, df = 82.7, p = 0.07, Fig. 1S). No differences of weight were observed between the females of the other treatments (NI vs LBP: estimate = 0.01, se = 0.01, df = 82.7, p = 0.46; NP vs LBP: estimate = -0.01, se = 0.01, df = 80.7, p=0.76; NI vs SAP: estimate = -0.0007, se = 0.0122, df = 81.0, p = 0.99; LB vs SAP: estimate = 0.01, se = 0.01, df = 81.5, p = 0.76).

3. Reproduction

3.1. First reproductive event

During the reproductive period, almost all the females produced the first clutch (SAP: 23/24, LBP: 20/22, NP: 22/22 and NI: 21/22). The probability to produce the first clutch was neither influenced by the treatment (Chisq = 1.09, df = 3, p = 0.77) nor by the weight of females before reproduction (Chisq = 0.18, df = 1, p = 0.66) or the interaction between treatment and weight (Chisq = 2.61, df = 3, p = 0.45). Females were able to produce a first clutch regardless their treatment or their weight before reproduction.

The time to produce the first clutch was neither influenced by the treatment (Chisq = 1.15, df = 3, p = 0.76, Fig. 3) nor by the weight of females before reproduction (Chisq = 0.49, df = 1, p = 0.48, Fig. 3). However, the interaction between treatment and weight showed significant effect (Chisq = 13.32, df = 3, p = 0.003, Fig. 3A). The time to produce the first clutch depended on the weight of females, but differently according to their treatment. In NI treatment, lighter females took longer time to produce the first clutch (around 200 days) comparing to heavier NI females (around 50 days; Pearson's correlation: t = -2.34, df = 19, p = 0.03; Fig. 3A). Conversely, in SAP females, heavier females took longer time to produce the first clutch (around 200 days) comparing to lighter SAP females (around 100 days; Pearson's correlation: t = 2.13, df = 21, p = 0.04; Fig. 3A). In LBP and NP females, no difference in the time to produce the first clutch was observed according to their weight (LB: t = 1.17, df = 18, p = 0.25; NP: t = -0.82, df = 17, p = 0.42; Fig. 3A).

The number of offspring in the first clutch tended to be influenced by the treatment (Chisq = 7.07, df = 3, p = 0.06; Fig. 2S; Tab.3S). NI females tended to produce more offspring than NP (Tukey's range test: estimate = 39.38, se = 16.4, p = 0.08) and SAP ones (Tukey's range test: estimate = 37.18, se =15.7, p = 0.09; Fig.2S; Tab. 3S). No significant effect was observed by the weight (Chisq = 0.40, df = 1, p = 0.52). However, the interaction between the weight and the treatment influenced the number of offspring in the first clutch (Chisq = 9.92, df = 3, p = 0.01; Fig.3B). Hence, the number of offspring in the first clutch depend on the female's weight differently inside each treatment (Fig. 3B). Lighter SAP females produced less offspring than heavier SAP females (Pearson's correlation test: t = 3.50, df =21, p = 0.002; Fig. 3B), but the weight did not influence the number of offspring in the females of the other treatments (NI: t = -1.12, df = 17, p = 0.27; NP: t = 0.09, df = 17, p = 0.92; LBP: t = -0.73, df = 18, p = 0.47; Fig. 3B).

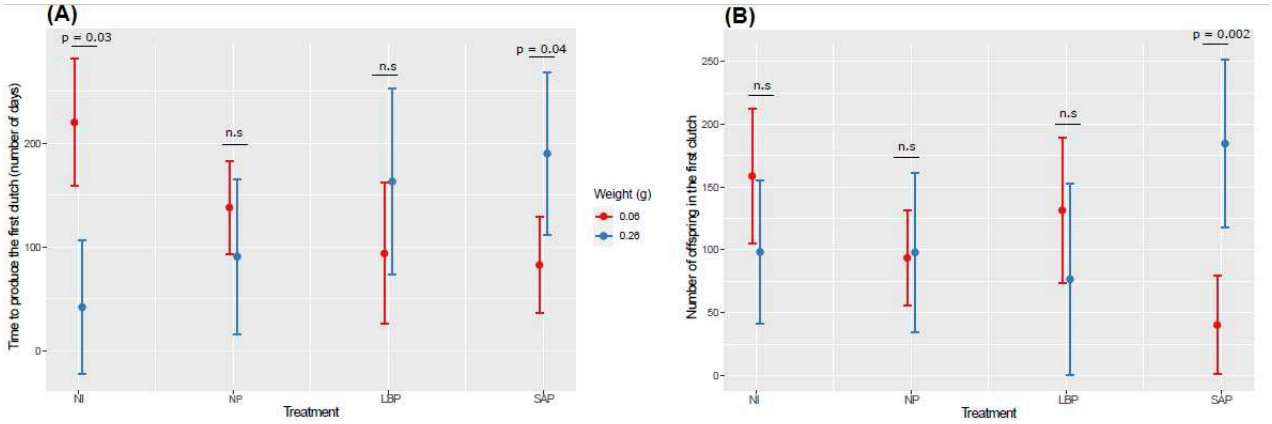


Figure 3. Interaction plot between **(A)** the time to produce the first clutch and **(B)** the number of offspring in the first clutch, according to females' weight and treatment. NI: non-injected females; NP: non-primed females LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI, NP and LBP have received the LD_{50} injection. Weight = 0.06 ± SE and Weight = 0.26 ± SE are the predicted values of weight given by the statistical model. Error bars correspond to value ± se.

3.2. Second reproductive event

Among the females which produced the first clutch, half of them produced the second clutch, regardless of the treatment (NI: 10/21; NP: 10/19; LBP: 10/20; SAP: 11/23). Hence, the probability to produce the second clutch was not influenced by the treatment (Chisq = 0.19, df = 3, p = 0.97). This was neither influenced by the number of offspring in the first clutch (Chisq = 0.20, df = 1, p = 0.64), nor by the interaction between the treatment and the weight (Chisq = 0.14, df = 3, p = 0.98). However, the weight of the females influenced the probability of producing the second clutch (Chisq = 4.60, df = 1, p = 0.03; Fig.4). Whatever the treatment, heavier females had less chance (around 25%) to produce the second clutch comparing to lighter females (around 75%; Fig. 4).

The time to produce the second clutch after the first one was neither influenced by the treatment (Chisq = 3.80, df = 3, p = 0.28) nor by the weight of females (Chisq = 0.97, df = 1, p = 0.32), nor by the number of offspring in the first clutch (Chisq = 1.68, df = 1, p = 0.19), or the interaction between the treatment and the weight (Chisq = 7.03, df = 3, p = 0.07). Whatever the treatment and the weight of females, they took similar time to produce the second clutch.

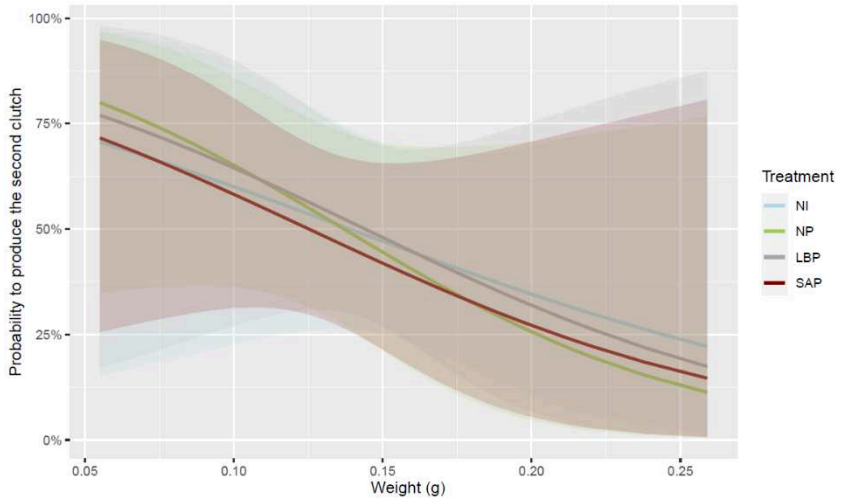


Figure 4. Probability to produce a second clutch according to the female's weight and treatment. NI: non-injected females; NP: non-primed females LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI, NP and LBP have received the LD_{50} injection.

The number of offspring in the second clutch was neither influenced by the treatment (Chisq = 5.38, df = 3, p = 0.14), nor by the weight of females (Chisq = 0.54, df = 1, p = 0.45) or the number of offspring of the first clutch (Chisq = 0.27, df = 1, p = 0.60). There was no effect of the interaction between the treatment and the weight of females (Chisq = 2.53, df = 3, p = 0.46). All females produced as much offspring in the second clutch, regardless their treatment, their weight, and the cost of producing offspring during the first clutch.

3.3. Total number of offspring

The total number of offspring (first and second clutch included) tended to be influenced by the treatment (Chisq = 7.46, df = 3, p = 0.058). Although SAP females tend to produce less offspring than NI females (p = 0.11, Fig. 3S, Tab. 4S), no significant differences were observed by comparing the pairs of treatments (Fig. 3S, Tab. 4S). The total number of offspring was neither influenced by the weight (Chisq = 0.95, df = 1, p = 0.32) nor by the interaction between treatment and weight (Chisq = 0.95, df =1, p = 0.31). (Fig. 3S, Tab. 4S).

4. Haemocyte parameters

The haemocyte concentration was neither influenced by the treatment (Chisq = 2.77, df = 3, p = 0.42), not by the total number of offspring (Chisq = 0.00, df = 1, p = 0.99), nor the number of clutches (Chisq = 0.16, df = 1, p = 0.68) nor by the interactions between these factors (Interaction treatment * total number of offspring: Chisq = 1.56, df = 3, p = 0.66; Interaction treatment * number of clutches: Chisq = 0.52, df = 3, p = 0.91). The number of infections with *S. enterica* and the following reproductive event(s) did not impact the concentration of haemocytes.

The viability of haemocytes was neither influenced by the treatment: Chisq = 1.04, df = 3, p = 0.79), nor by the total number of offspring (Chisq = 1.15, df = 1, p = 0.28), nor by the number of clutches (Chisq = 0.11, df = 1, p = 0.73), nor the interaction between these factors (Interaction treatment * total number of offspring: Chisq = 0.67, df = 3, p = 0.87; Interaction treatment * number of clutches: Chisq = 0.91, df = 3, p = 0.82). The number of infections with *S. enterica* and the following reproductive event(s) did not impact the viability of haemocytes.

5. Senescence biomarkers

The size of the viable haemocytes was only influenced by the number of clutches that females produced, with an increasing of this cell size in case of second clutch production (Chisq = 12.99, df = 1, p = 0.003, Fig. 5). There was no influence of the other fixed factors (treatment: Chisq = 2.60, df = 3, p = 0.55; total number of offspring: Chisq = 0.64, df = 1, p = 0.64; interaction treatment * total number of offspring: Chisq = 2.71, df = 3, p = 0.43; interaction treatment * number of clutches: Chisq = 3.62, df = 3, p = 0.30).

The β-galactosidase activity was not influenced by the female's treatment (Chisq = 7.10, df = 3, p = 0.06). Even if a tendency of significant effect is observed, no differences were observed by comparing the pairs of treatments ($p > 0.05$ for all comparisons). The β-galactosidase activity was neither influenced by the total number of offspring (Chisq = 0.46, df = 1, p = 0.49), nor by the number of clutches (Chisq = 0.08, df = 1, p = 0.76), nor the interactions between these factors (iInteraction treatment * total number of offspring: Chisq = 2.42, df = 3, p = 0.48; Interaction

treatment * number of clutches: Chisq = 2.24, df = 3, p = 0.52). Whatever the treatment and the following reproductive event(s), the β-galactosidase activity of females is similar.

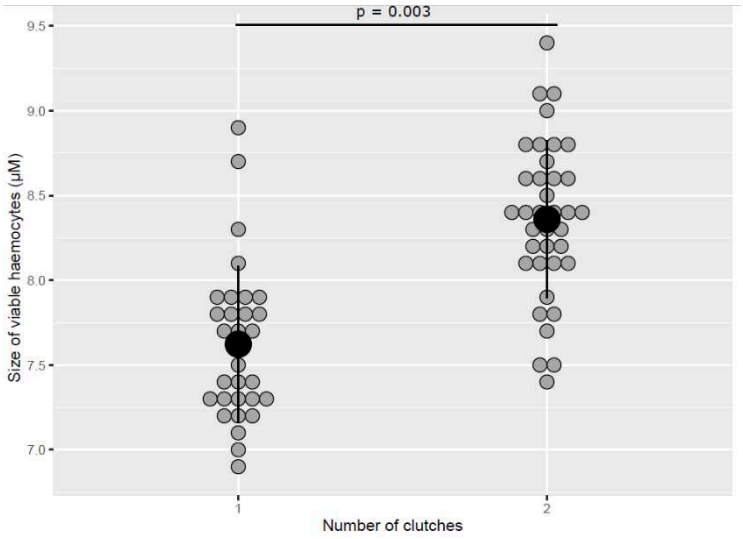


Figure 5. Size of viable haemocytes (µM) according to the number of clutches that females produced (1 or 2 clutches), all treatments confounded.

Discussion

1. Results overview

Our study investigated the impact of immune priming with *S. enterica* on the reproductive abilities of the common woodlouse *A. vulgare*, known for its indeterminate growth and relatively long-life span. We observed a protective effect of priming against the second infection in terms of survival, thus confirming the previous results presented in Prigot-Maurice et al. 2019, 2021 (Fig.6). In surviving females, we showed a negative effect of immune priming on the growth of *A. vulgare* females. While we hypothesised that reproduction would be greatly affected by the persistent infection of *S. enterica* during immune priming, only small effects were found. Indeed, we highlighted a decrease in the number of offspring produced during the first clutch of females experiencing two subsequent infections with living *S. enterica* but generally, the reproductive traits were more often explained by the interaction between the treatment and the female's weight (Fig.6). Finally, no effect of immune priming was observed, neither on haemocyte parameters (concentration and viability) nor on senescent biomarkers (size of viable haemocytes and β-galactosidase activity).

2. Immune priming indirectly impacts the first reproductive event through the weight of females

After the LD_{50}, females that received one or two infections with *S. enterica* (NP or SAP) tended to be lighter than females that have never been injected (NI). This result suggest that infection induced a metabolic cost, probably because the infected females have invested in immunity, rather than in growth. At the reverse, the never-injected females have probably invested in their growth, which could explain their higher weight compared to injected-females. However, the injection of LB did not impact the weight of females *A. vulgare,* while these females have also been exposed to the second infection with *S. enterica*. This result does not support the finding of other studies, showing that individuals injected with non-pathogenic immunostimulants (e.g. LPS), became lighter as well (*T.molitor*, (Moret 2006); *H. crassidens*, (Kelly 2011)). Thus, in *A. vulgare*, the first immune stimulation without pathogens (LBP treatment) appears to prevent the energetical cost of the following infection with *S. enterica*.

Concerning the reproductive traits, we did not observe any difference in survival between the females of the different treatments (NP, LBP, SAP, NI) during the breeding period. This result shows that even if reproduction is costly, it does not decrease the survival abilities of females that have experienced a single or double infection(s) with *S. enterica* in the eight following months. In addition, all females that received infections (NP, LBP and SAP) were as likely to produce the first clutch as females that have never been injected (NI). Furthermore, the time taken to provide this first clutch was not directly dependent on the treatment, but we observed an indirect effect of the treatment through the weight of the females. In never-injected (control) females, the lighter ones took longer time (200 days on average) to breed than the heavier ones (50 days on average). We suggest that these difference in controls females is the result of a strategy to optimise reproduction. Producing clutch is an expensive event in *A. vulgare*, because the production of the marsupium requires considerable energy from the female (Surbida and Wright 2001, Antoł and Czarnoleski 2018). However, the size of the marsupium is proportional to the size of the female, making the largest females the ones that normally produce more offspring by clutch (Antoł and Czarnoleski 2018). Because larger females *A. vulgare* are known to have a higher fecundity (Durand et al. 2018), it is in the interest of females to grow before the breeding season under non-stressful conditions. By investing in their growth, non-injected females are probably investing indirectly in

their reproduction, by preparing the optimal physical conditions to produce as many offspring as possible in each clutch event (Lawlor et al., 1976).

Interestingly, the opposite effect was observed in the double-infected females: the lighter SAP females took less time (100 days) to produce the first clutch than the heavier SAP females (200 days). This result shows that when females lost weight or invest more resource in immunity in response to the double infections (i.e. are lighter), they invest more quickly in the offspring production. Two non-exclusive hypotheses could explain this result : (1) because the weight/size of individuals is related to their intrinsic quality in term of fecundity (Durand et al. 2018), the lighter SAP females could have lower quality than the heavier SAP females. Consequently, the lighter SAP females could compensate for their lower quality by accelerating their first reproduction. (2) During a stressful event occurring in the lifetime of an organism, the resource allocation choices may be altered. Here, the SAP females had to invest more in immune-related functions compare to non-infected, control females. For the heavier SAP females, we assume that the cost of growth and somatic maintenance during the infection of *S. enterica* does not allow them to invest instantly in reproduction, while for the lighter SAP females, the energy not used in growth may be directly invested in reproduction. Whatever the more probable explanation (the 1st and/or 2nd hypothesis previously stated), since the lighter SAP females reproduced faster than the heavier SAP females, this may be the result of terminal investment strategy for lighter SAP females. In the case of stressful conditions like an infection, organism could opt for the total investment of their energy in reproduction, in order to maximise their fitness (Creighton et al. 2009). To verify this hypothesis, the lifetime of the lighter and heavier SAP females after the reproduction should be investigated. Indeed, if the mortality at the population level is higher in the lighter SAP females compared to the heavier SAP females, immune priming of the lighter SAP females is expected to induce terminal investment in reproduction (Luu and Tate 2017).

We also observed that the females infected twice with *S. enterica* (SAP females) tended to produce fewer offspring in the first clutch than non-injected females (NI). Generally, infections often decrease the number or the viability rate of eggs produced (Kelly 2011). In our study, this effect observed for the first clutch of SAP females strictly depends on the weight of the females. Indeed, we observed that the lighter SAP females produced fewer offspring than the heavier SAP females. Although empirical data showed that in natural conditions, smaller females produced less

offspring in *A. vulgare* (Antoł and Czarnoleski 2018, Durand et al. 2018), this effect was neither observed among our controls females (NI) nor in the single-infected females (LBP and NP). Hence, we hypothesised that the lighter SAP females are likely to have been more affected by the two infections of *S. enterica*, so they are likely to have less energy to produce numerous offspring, even if they do so more quickly.

3. No effect of immune priming on the second reproductive event, but the weight of females is negatively correlated with the chance to produce a second clutch regardless the treatment

The probability of producing the second clutch and the time to produce it were similar between the females of the different treatment (NP, LBP, SAP or NI). However, the probability of producing the second clutch depended on the weight of the females: the lighter females had a 75% chance of producing a second clutch, compared to 25% for the heavier females. This result probably shows that the investment in the first clutch in the heavier females is more expensive than those of the lighter females. As we have already assumed, the cost of producing a marsupium is high, and proportional to the female size (Dangerfield and Telford 1995, Antoł and Czarnoleski 2018; Lawlor, 1976). Hence, we suppose that the heavier females may not have the energy to produce a second, large marsupium during the time course of the experiment.

Nevertheless, this result raises questions about the reproductive strategies of females. According to theoretical predictions, females producing one single clutch should provide higher rates of care to their offspring than those producing several clutches (Tallamy and Brown 1999, Gilbert and Manica 2010, Meunier et al. 2012). In *F. auricularia*, for example, females that provide more pronounced maternal care to their offspring are less likely to reproduce later (Koch and Meunier 2014). In general, females' weight is positively correlated with the mass of eggs produced but not always with the number of eggs produced (Fox and Czesak 2000, Kudo 2006). Although phenotypic plasticity on reproductive traits has already been demonstrated in *A. vulgare* in case of environment variations (Hassall et al. 2005), a greater investment of parents, notably in offspring size, does not necessarily increase their survival probability (Depeux et al. 2020). However, if we consider the marsupium as an advanced maternal care (Antoł and Czarnoleski 2018), then the

heavier females might allocate more energy into the quality of offspring produced (in terms of growth or survival for example (McGinley 1989)). By contrast, if the lighter females have less energy reserves available for their offspring, then they may counterbalance the quality of their offspring by producing a second clutch. Dangerfield et al. (1995) notably postulated these assumptions when observing 4 different species of terrestrial isopods: "*the tactic of repeated reproduction, with a relatively conservative allocation of resources to each reproductive event to enhance survival probabilities, would be favoured, particularly in an environment where juvenile mortality and the chance of complete brood failure is high*". Our results about the lighter SAP females particularly confirm this statement: the lighter females that experiencing two subsequent infections with living *S. enterica* produced less offspring in the first clutch, but they were more likely to produce a second clutch, probably to counterbalance the number, and potentially the quality of offspring.

4. While immune priming neither impacts the haemocyte parameters nor the senescent patterns after reproduction, producing two clutches increases the cellular senescence of females.

For the senescence biomarkers, we only observed an effect of the investment in reproduction on the size of the viable haemocytes: regardless of treatment, females that produced a second clutch had larger viable haemocytes than those that produced only one clutch. The size of haemocytes in *A. vulgare* increases with the age of the individuals, making this morphometric trait a biomarker of senescence (Depeux et al., 2020). Here, for an identical age between females, the larger size of the haemocytes could therefore show premature senescence in females that produced two clutches. This result could illustrate a trade-off between the energy allocated to reproduction or somatic maintenance.

Finally, we observed no effect of the treatment or the reproductive event(s) on the haemocyte parameters of females (concentration and viability). This result shows that several months after *S. enterica* infection(s), immune cell production is no longer impacted by this/these infection(s) (Prigot-Maurice et al., 2019), nor by the reproductive(s) event(s) occurring after these infections. However, these immune parameters only reflect the quantity and basal viability of the haemocytes

of the females. This does not exclude that the immune response of these haemocytes, thus the immunocompetence of the females against a next threat, is not impacted by the reproduction (Lawniczak et al., 2007), since the females that produce two clutches show higher senescent pattern through the size of their viable haemocytes.

Conclusion

Our experiment aimed to evaluate the effect of immune priming with *S. enterica* on *A. vulgare* reproductive abilities and senescent patterns. The Figure 6 illustrates the different resource allocation that we observed during this experiment. As expected, we observed a positive effect of immune priming on the survival of females: the first encounter with *S. enterica* improves the survival abilities of females after the second and lethal infection. Conversely, immune priming had a negative impact on the weight of females (Fig.6). We assume that the investment in somatic maintenance to clear the two infections of *S. enterica* was made at the cost of growth. Concerning reproduction, the effect of immune priming closely depends on the weight of females. Two different strategies were observed in females that experiencing two subsequent infections with *S. enterica* (Fig.6). (1) The lighter SAP females took less time to produce the first clutch, they also produced less offspring in this clutch but had higher probability to produce a second clutch. These results suggest an important effect of immune priming on the available energy, which was then allocated in a significant way to reproduction, like a terminal investment strategy. In addition, the intense investment in reproduction (by the production of two clutches) led to the increase in the viable haemocyte size of females (Fig.6). This suggests an increase in the cellular senescence (Depeux et al. 2020), thus theoretically a decrease in total lifetime. By contrast, (2) the heavier SAP females took more time to produce the first clutch, that contained more offspring, but the probability of producing a second clutch was reduced (Fig.6). Thus, these two different strategies illustrate a plasticity in resource allocation following two infections with *S. enterica* that depends on the investment of each female in the different physiological functions, namely the growth or the reproduction.

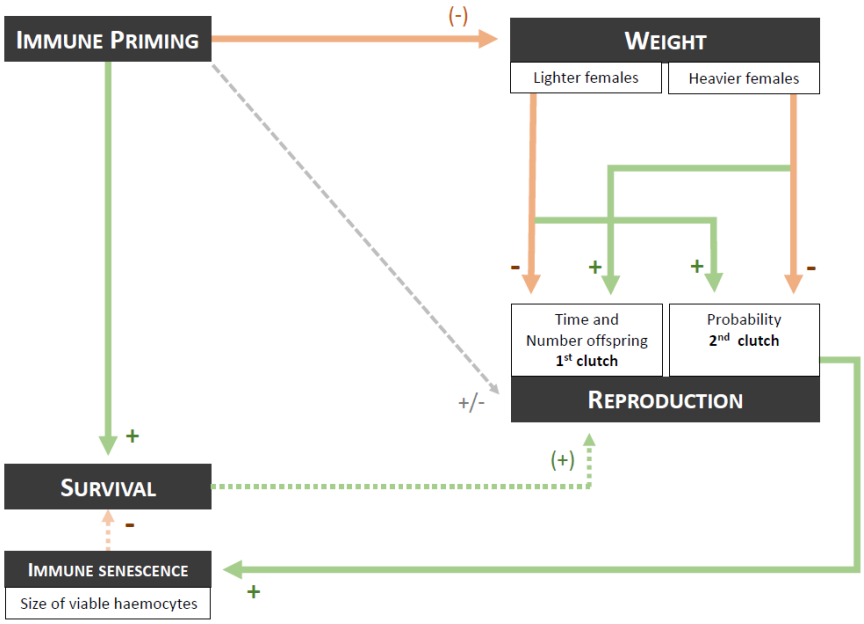


Figure 6. Summary diagram of the results. Orange arrows indicate a negative effect. Green arrows indicate a positive effect. If the corresponding sign is in brackets, the effect considered is a trend ($0.05 < p < 0.10$). +/- indicates that there is no general effect.

Although females infected twice with *S. enterica* (SAP) used two different strategies of reproduction depending on their weight, they still have higher survival abilities and a total number of offspring similar to females that received only a single injection (NP). From this statement, immune priming in *A. vulgare* against *S. enterica* appears to be adaptive. *A. vulgare* maintains high survival rate, with no apparent reproductive costs, while an immune response is sustained for at least 7 days and *S. enterica* persists in the haemolymph of females between the two infections. Although some predictions assume that organisms that develop gradually with a long lifespan would favour costly immune processes (Johnson et al., 2012), our study shows that this is probably not the case of *A. vulgare* against *S. enterica*.

If the resources of individuals are limited and that allocations are inevitable between reproduction or resistance to infection, natural selection should select for the most optimal immune responses to these allocations (Raw, 2012). Thus, we hypothesise that in *A. vulgare*, the cost of ongoing infection is reduced by increased tolerance against *S. enterica,* rather than increased resistance, which would require much more energy at the expense of other biological functions (Raw, 2012; Behnke et al., 1992; Zuk and Stoehr, 2002). That said, although we did not observe significant costs of double infections and/or immune priming on the reproductive traits we

observed, it is not excluded that other traits are affected, such as the total lifespan of females or certain traits in the next generation. In *A. vulgare*, for example, older individuals produce larger and more numerous offspring than younger individuals, but the offspring of older individuals have reduced survival abilities and are unable to reproduce (Depeux et al, 2020). In the present study, the total number of offspring is not altered by double infections and/or immune priming, but this does not prove that the quality of the offspring is not impacted. Immune priming is often associated with certain costs in the following generations (Dhinaut et al., 2018; Zanchi et al., 2012; Robinson and Green, 2020). In *Crassostrea gigas* for example, offspring from immune-primed mothers have a longer developmental time, which delays their sexual maturity compared to offspring from non-primed mothers (Robinson and Green, 2020). To further understand the adaptive features of immune priming in *A. vulgare*, it is thus required to look at the reproductive, survival and growth abilities of offspring from females *A. vulgare* that have established an immune priming during their lifetime.

Because *A. vulgare* is a detritivore and gregarious organism living for several years in a moist environment particularly rich in microbial density and diversity (Warburg et al., 1984; Broly et al., 2013; Ranjard and Richaume, 2001; Zimmer, 2002), the decreasing cost of immune priming on the reproduction in the evolutionary scale of this species could also prove the importance of its role. Overall, our results highlight that immune priming is not always associated with significant reproductive costs in individuals which express it, even if the underlying mechanism is a sustained immune response lasting from the first to the second infection (Prigot-Maurice et al., 2019).

Authors contribution

CPM and CD wrote the manuscript, tables, figures and developed the presented idea. CPM performed the bacterial cultures and infections, weighted, measured the reproductive abilities of animals, and built the models of the statistical analysis. CD performed the animal's dissections and measure the β-galactosidase activity. HP performed the haemocytes measurement. SBB and CBV supervised this work and corrected the manuscript. All authors discussed the results of this experiment and the presented work.

Declaration of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

We would like to thank the two futures anonymous reviewers for their constructive comments. We would also like to thank Richard Cordaux (Team Manager) for supporting our publication proposal, Benjamin Macchi (Teaching assistant) for its technical support and Sebastien Thobie for reviewing the English language.

Funding

This work was supported by the Vivipary and Immune Priming grant (PEPS EXOMOD CNRS), State-Region Planning Contracts, the European Regional Development Fund, the French National Centre for Scientific Research, the French Ministry of Higher Education and Research, and the University of Poitiers.

Immune priming in *Armadillidium vulgare* against *S. enterica*: direct or indirect costs on life history traits?

Cybèle PRIGOT-MAURICE[1*], Charlotte DEPEUX[1*], Hélène PAULHAC[1], Christine BRAQUART-VARNIER[1#], Sophie BELTRAN-BECH[1#]

[1] Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, 5 11 rue Albert Turpin, TSA51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

* Co-first authors

Co-last authors

Contact: cybele.prigot@univ-poitiers.fr

Supplementary material

Table 1S. Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of survival according to females' treatments (NP: non-primed; LBP: primed with LB; SAP: primed with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure; NI: non-injected) before and after reproduction.

SURVIVAL RATES (frequency of living females)			
22 days after LD_{50}	estimate	std error	*p.value*
NP *vs* LPB	0.914	0.494	**0.064**
NP *vs* SAP	0.912	0.495	**0.065**
LBP *vs* SAP	0.578	0.578	0.99
During the reproductive period	estimate	std error	*p.value*
NP *vs* LPB	-0.33	0.627	0.952
NP *vs* SAP	0.318	0.627	0.957
LBP *vs* SAP	0.01	0.535	1.00
NI *vs* NP	0.01	0.671	1.00
NI *vs* LBP	-0.31	0.586	0.951
NI *vs* SAP	-0.299	0.586	0.956

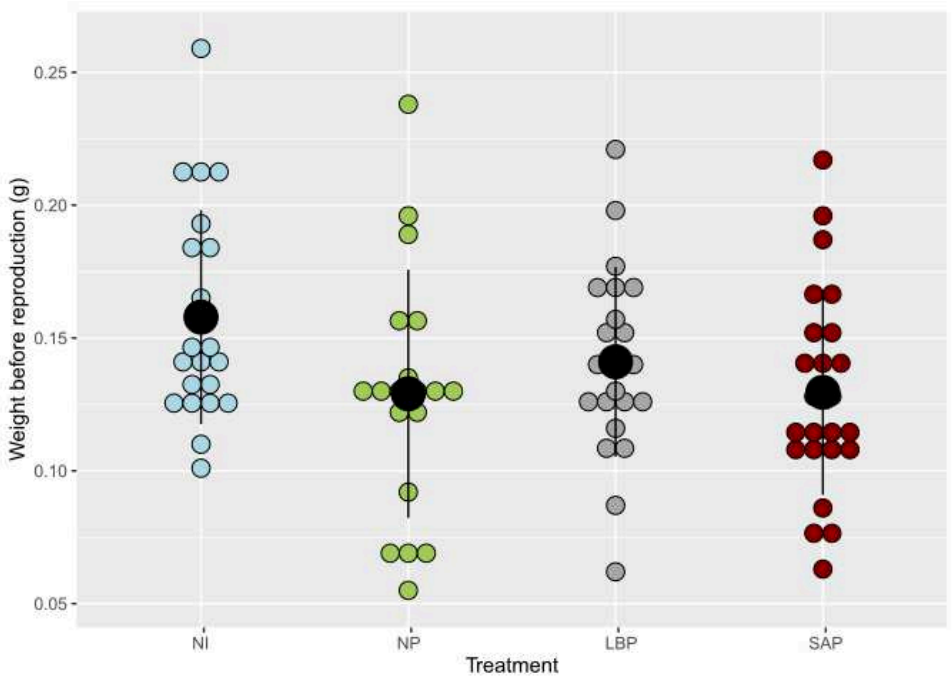


Figure 1S. Weight of females according to the priming treatment. NI: non-injected females; NP: non-primed females; LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI, NP and LBP received the LD_{50} injection. Mean ± SE: NI = 0.15g ± 0.008, NP = 0.12g ± 0.01, LBP = 0.14g ± 0.007, SAP = 0.12g ± 0.007).

Table 2S. Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of the weight of females according to the treatments (NP: non-primed; LBP: primed with LB; SAP: primed with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure; NI: non-injected) before and after reproduction.

WEIGHT OF FEMALES			
	estimate	std error	*p.value*
NP *vs* LPB	0.01	0.012	0.76
NP *vs* SAP	-0.0007	0.012	0.99
LBP *vs* SAP	0.01	0.011	0.76
NI *vs* NP	0.03	0.012	**0.09**
NI *vs* LBP	0.01	0.012	0.46
NI *vs* SAP	0.02	0.012	**0.07**

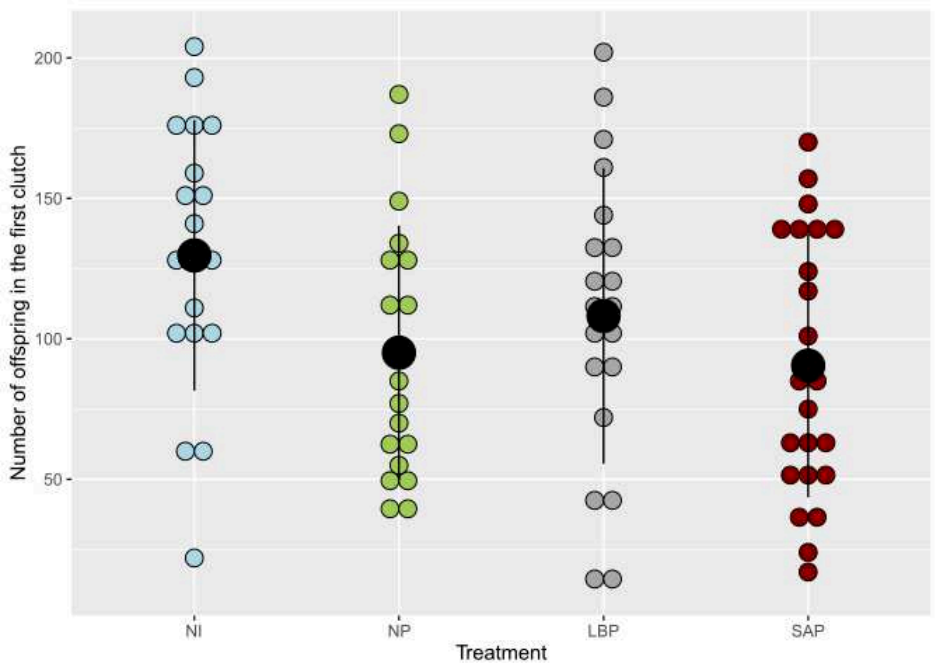


Figure 2S. Number of offspring in the first clutch according to the females' treatment. NI: non-injected females; NP: non-primed females; LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI, NP and LBP received the LD_{50} injection.

Table 3S. Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of the number of offspring in the first clutch according to females' treatments (NP: non-primed; LBP: primed with LB; SAP: primed with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure; NI: non-injected) before and after reproduction.

NUMBER OF OFFSPRING IN THE FIRST CLUTCH			
	estimate	std error	*p.value*
NP *vs* LPB	-14.37	15.4	0.78
NP *vs* SAP	-2.21	14.8	0.99
LBP *vs* SAP	12.16	14.8	0.84
NI *vs* NP	39.38	16.4	**0.08**
NI *vs* LBP	25.01	15.9	0.40
NI *vs* SAP	37.18	15.7	**0.09**

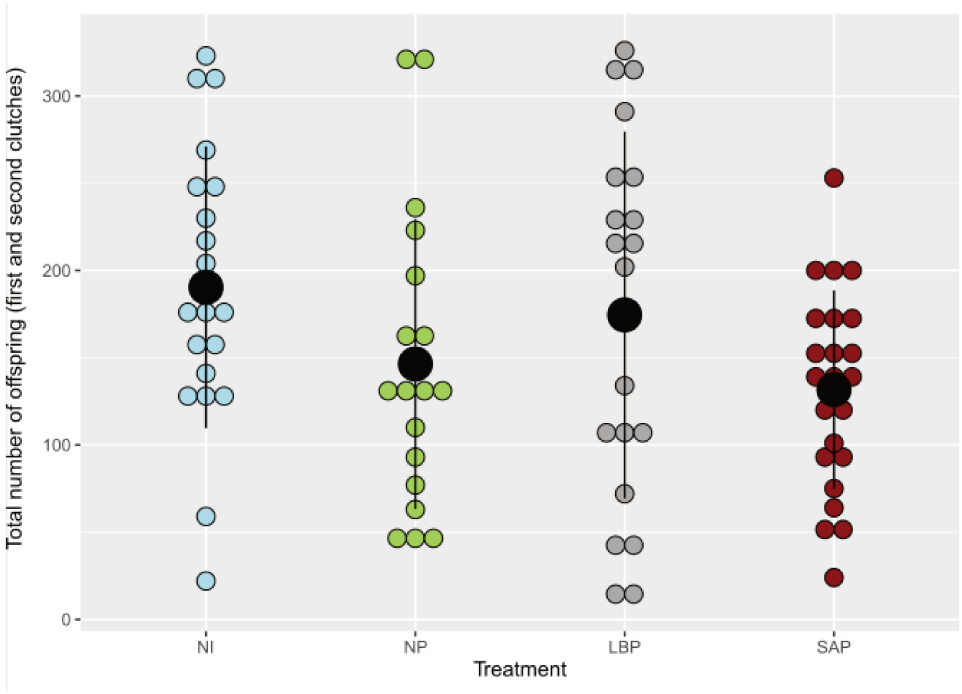


Figure 3S. Total number of offspring (first and second clutches included) according to the females' treatment. NI: non-injected females; NP: non-primed females; LBP: females primed with sterile LB broth, SAP: females primed with 10^3 living *S. enterica*. NI, NP and LBP received the LD_{50} injection.

Table 4S. Pairwise comparisons (Tukey adjustment) of the total number of offspring according to females' treatments (NP: non-primed; LBP: primed with LB; SAP: primed with 10^3 *S. enterica* during the priming procedure; NI: non-injected) before and after reproduction.

TOTAL NUMBER OF OFFSPRING (first and second clutches included)			
	estimate	std error	*p.value*
NP *vs* LPB	-35.5	27.2	0.56
NP *vs* SAP	5.5	26.2	0.99
LBP *vs* SAP	41.0	26.1	0.40
NI *vs* NP	56.7	28.7	0.20
NI *vs* LBP	21.2	28.0	0.87
NI *vs* SAP	62.2	27.4	**0.11**

Reference

Adamo SA (1999) Evidence for adaptive changes in egg laying in crickets exposed to bacteria and parasites. Animal Behaviour 57: 117–124. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0999

Antoł A, Czarnoleski M (2018) Size dependence of offspring production in isopods: a synthesis. ZooKeys 801: 337–357. https://doi.org/10.3897/zookeys.801.23677

Bascuñán-García AP, Lara C, Córdoba-Aguilar A (2010) Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, Acheta domesticus. Journal of Insect Physiology 56: 204–211. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.005

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2014) Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint arXiv:1406.5823.

Broly, P., Deneubourg, J.L., Devigne, C., (2013). Benefits of aggregation in woodlice: a factor in the terrestrialization process? Insectes Soc. 60, 419‑435. https://doi.org/10.1007/s00040-013-0313-7.

Comfort A (1964) Ageing: The biology of senescence. Routledge Kegan Paul. London.

Contreras-Garduño J, Rodríguez MC, Rodríguez MH, Alvarado-Delgado A, Lanz-Mendoza H (2014) Cost of immune priming within generations: trade-off between infection and reproduction. Microbes and Infection 16: 261–267. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.010

Contreras-Garduño J, Méndez-López TT, Patiño-Morales A, González-Hernández GA, Torres-Guzmán JC, Krams I, Mendoza-Cuenca L, Ruiz-Guzmán G (2019) The costs of the immune memory within generations. The Science of Nature 106: 59. https://doi.org/10.1007/s00114-019-1657-2

Cooper MD, Alder MN (2006) The Evolution of Adaptive Immune Systems. Cell 124: 815–822. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001

Coustau C, Kurtz J, Moret Y (2016) A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate–Parasite Interface. Trends in Parasitology 32: 353–355. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.005

Creighton JC, Heflin ND, Belk MC (2009) Cost of reproduction, resource quality, and terminal investment in a burying beetle. The American Naturalist 174: 673–684.

Dangerfield JM, Telford SR (1995) Tactics of reproduction and reproductive allocation in four species of woodlice from southern Africa. Journal of Tropical Ecology 11: 641–649. https://doi.org/10.1017/S0266467400009196

Danilova N (2006) The evolution of immune mechanisms. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 306B: 496–520. https://doi.org/10.1002/jez.b.21102

Depeux C, Lemaître J, Moreau J, Dechaume-Moncharmont F, Laverre T, Paulhac H, Gaillard J, Beltran-Bech S (2020) Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. Journal of Evolutionary Biology. https://doi.org/10.1111/jeb.13667

Depeux C, Samba-Louaka A, Becking T, Braquart-Varnier C, Moreau J, Lemaître J-F, Laverre T, Paulhac H, Dechaume-Moncharmont F-X, Gaillard J-M, Beltran-Bech S (2019) The crustacean *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Oniscoidea), a new promising model for the study of cellular senescence. Evolutionary Biology. preprint https://doi.org/10.1101/583914

Descamps S, Boutin S, Berteaux D, Gaillard J-M (2006) Best squirrels trade a long life for an early reproduction. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273: 2369–2374. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3588

Dhinaut J, Chogne M, Moret Y (2018) Immune priming specificity within and across generations reveals the range of pathogens affecting evolution of immunity in an insect. Cotter S (Ed.). Journal of Animal Ecology 87: 448–463. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12661

Duffield KR, Bowers EK, Sakaluk SK, Sadd BM (2017) A dynamic threshold model for terminal investment. Behavioral Ecology and Sociobiology 71: 185. https://doi.org/10.1007/s00265-017-2416-z

Durand S, Loiseau V, Prigot C, Braquart-Varnier C, Beltran-Bech S (2018) Producing offspring in *Armadillidium vulgare*: Effects of genetic diversity and inbreeding. Evolution & Development 20: 65–77. https://doi.org/10.1111/ede.12248

Faria VG, Martins NE, Paulo T, Teixeira L, Sucena É, Magalhães S (2015) Evolution of *Drosophila* resistance against different pathogens and infection routes entails no detectable maintenance costs: EVOLUTION OF RESISTANCE HAS NO MAINTENANCE COSTS. Evolution 69: 2799–2809. https://doi.org/10.1111/evo.12782

Fox CW, Czesak ME (2000) Evolutionary Ecology of Progeny Size in Arthropods. Annual Review of Entomology 45: 341–369. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.341

Fox J, Weisberg S (2011) Cox Proportional-hazards regression for survival data in R. In: An R Companion to Appl Regression. In: An R Companion to Appl Regression. , 1–18.

Gilbert JDJ, Manica A (2010) Parental Care Trade-Offs and Life-History Relationships in Insects. The American Naturalist 176: 212–226. https://doi.org/10.1086/653661

Gupta V, Venkatesan S, Chatterjee M, Syed ZA, Nivsarkar V, Prasad NG (2016) No apparent cost of evolved immune response in *Drosophila melanogaster*: BRIEF COMMUNICATION. Evolution 70: 934–943. https://doi.org/10.1111/evo.12896

Harrell FE (2015) Binary Logistic Regression. In: Regression Modeling Strategies. Springer Series in Statistics. Springer International Publishing, Cham, 219–274. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19425-7_10

Harrison XA, Donaldson L, Correa-Cano ME, Evans J, Fisher DN, Goodwin CED, Robinson BS, Hodgson DJ, Inger R (2018) A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. PeerJ 6: e4794. https://doi.org/10.7717/peerj.4794

Hassall M, Helden A, Goldson A, Grant A (2005) Ecotypic differentiation and phenotypic plasticity in reproductive traits of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). Oecologia 143: 51–60. https://doi.org/10.1007/s00442-004-1772-3

Herbinière J (2005) Contribution à la mise en évidence des effecteurs impliqués dans l'immunité innée d'Armadillidium vulgare, crustacé isopode terrestre infecté par une bactérie du genre Wolbachia. Université de Poitiers Available from: https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00011699.

Janeway CA, Medzhitov R (2002) Innate Immune Recognition. Annual Review of Immunology 20: 197–216. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Kelly CD (2011) Reproductive and physiological costs of repeated immune challenges in female Wellington tree weta (Orthoptera: Anostostomatidae): IMMUNE CHALLENGES IN FEMALE TREE WETA. Biological Journal of the Linnean Society 104: 38–46. https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01714.x

Khan SR, Manialawy Y, Siraki AG (2019) Isoniazid and host immune system interactions: A proposal for a novel comprehensive mode of action. British Journal of Pharmacology 176: 4599–4608. https://doi.org/10.1111/bph.14867

Koch LK, Meunier J (2014) Mother and offspring fitness in an insect with maternal care: phenotypic trade-offs between egg number, egg mass and egg care. BMC Evolutionary Biology 14: 125. https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-125

Kudo S (2006) Within-clutch egg-size variation in a subsocial bug: the positional effect hypothesis. Canadian Journal of Zoology 84: 1540–1544. https://doi.org/10.1139/z06-163

Kurtz J (2005) Specific memory within innate immune systems. Trends in Immunology 26: 186–192. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001

Kutzer MAM, Kurtz J, Armitage SAO (2019) A multi-faceted approach testing the effects of previous bacterial exposure on resistance and tolerance. Tate A (Ed.). Journal of Animal Ecology 88: 566–578. https://doi.org/10.1111/1365-2656.12953

Lawlor, L.R. (1976), Molting, Growth and Reproductive Strategies in the Terrestrial Isopod, Armadillidium Vulgare. Ecology, 57: 1179-1194. https://doi.org/10.2307/1935043

Lawniczak M, Barnes A, Linklater J, Boone J, Wigby S, Chapman T (2007) Mating and immunity in invertebrates. Trends in Ecology & Evolution 22: 48–55. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.012

Lemaître J-F, Berger V, Bonenfant C, Douhard M, Gamelon M, Plard F, Gaillard J-M (2015) Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 282. https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0209

Lenth RV (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. Journal of Statistical Software 69. https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01

Little TJ, Kraaijeveld AR (2004) Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. Trends in Ecology & Evolution 19: 58–60. https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011

Luu H, Tate AT (2017) Recovery and immune priming modulate the evolutionary trajectory of infection-induced reproductive strategies. Journal of Evolutionary Biology 30: 1748–1762. https://doi.org/10.1111/jeb.13138

McGinley MA (1989) The influence of a positive correlation between clutch size and offspring fitness on the optimal offspring size. Evolutionary Ecology 3: 150–156. https://doi.org/10.1007/BF02270917

McNamara KB, van Lieshout E, Simmons LW (2014) The effect of maternal and paternal immune challenge on offspring immunity and reproduction in a cricket. Journal of Evolutionary Biology 27: 1020–1028. https://doi.org/10.1111/jeb.12376

Medzhitov R, Janeway CharleSJ (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways: Innate immune recognition. Immunological Reviews 173: 89–97. https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2000.917309.x

Melillo D, Marino R, Italiani P, Boraschi D (2018) Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal. Frontiers in Immunology 9: 1915. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915

Meunier J, Wong JWY, Gómez Y, Kuttler S, Röllin L, Stucki D, Kölliker M (2012) One clutch or two clutches? Fitness correlates of coexisting alternative female life-histories in the European earwig. Evolutionary Ecology 26: 669–682. https://doi.org/10.1007/s10682-011-9510-x

Milutinović B, Kurtz J (2016) Immune memory in invertebrates. Seminars in Immunology 28: 328–342. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004

Moreau J, Rigaud T (2002) The Shape of Calcium Carbonate Deposits as an External Marker for Female Reproductive Status in Terrestrial Isopods. Journal of Crustacean Biology 22: 353–356. https://doi.org/10.1163/20021975-99990242

Moreau J, Martinaud G, Troussard J-P, Zanchi C, Moret Y (2012) Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. Oikos 121: 1828–1832. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19933.x

Moret Y (2003) Explaining variable costs of the immune response: selection for specific versus non-specific immunity and facultative life history change. Oikos 102: 213–216. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12496.x

Moret Y (2006) 'Trans-generational immune priming': specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, Tenebrio molitor. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273: 1399–1405. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3465

Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL (2019) Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. Cell Host & Microbe 25: 13–26. https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006

Paris OH, Pitelka FA (1962) Population characteristics of the terrestrial isopod Armadillidium vulgare in California grassland. Ecology 43: 229–248.

Prakash A, Agashe D, Khan I (2022) The costs and benefits of basal infection resistance vs immune priming responses in an insect. Developmental & Comparative Immunology 126: 104261. https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104261

Prigot-Maurice C, Cerqueira De Araujo A, Beltran-Bech S, Braquart-Varnier C (2021) Immune priming depends on age, sex and Wolbachia in the interaction between Armadillidium vulgare and Salmonella. Journal of Evolutionary Biology 34: 256–269. https://doi.org/10.1111/jeb.13721

Prigot-Maurice C, Cerqueira de Araujo A, Durand S, Laverré T, Pigeault R, Verdon J, Bulet P, Beltran-Bech S, Braquart-Varnier C (2019) Survival capacity of the common woodlouse Armadillidium vulgare is improved with a second infection of Salmonella enterica. Journal of Invertebrate Pathology 168: 107278. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278

Ranjard, L., Richaume, A., (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbiol. 152, 707‑716. https://doi.org/10.1016/S0923- 2508(01)01251-7.

R Core Team (2017) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available from: https://www.R-project.org/.

Rolff J, Siva-Jothy MT (2003) Invertebrate Ecological Immunology. Science 301: 472–475. https://doi.org/10.1126/science.1080623

Rosengaus RB, Hays N, Biro C, Kemos J, Zaman M, Murray J, Gezahegn B, Smith W (2017) Pathogen-induced maternal effects result in enhanced immune responsiveness across generations. Ecology and Evolution 7: 2925–2935. https://doi.org/10.1002/ece3.2887

Schmid-Hempel P (2005) EVOLUTIONARY ECOLOGY OF INSECT IMMUNE DEFENSES. Annual Review of Entomology 50: 529–551. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420

Shikano I, Hua KN, Cory JS (2016) Baculovirus-challenge and poor nutrition inflict within-generation fitness costs without triggering transgenerational immune priming. Journal of Invertebrate Pathology 136: 35–42. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.001

Sicard M, Chevalier F, Vlechouver MD, Bouchon D, Grève P, Braquart-Varnier C (2010) Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and Wolbachia. Naturwissenschaften 97: 819–826. https://doi.org/10.1007/s00114-010-0699-2

Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J (2005) Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. In: Advances in Insect Physiology. Elsevier, 1–48. https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7

Surbida K, Wright JC (2001) Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in Armadillidium vulgare (Isopoda: Oniscidea). Physiological and Biochemical Zoology 74: 894–906. https://doi.org/10.1086/324474

Sutton SL, Hassall M, Willows R, Davis RC, Grundy A, Sunderland KD (1983) Life histories of terrestrial isopods: a study of intra- and interspecific variation. In: Cambridge University Press, Cambridge.

Tallamy DW, Brown WP (1999) Semelparity and the evolution of maternal care in insects. Animal Behaviour 57: 727–730. https://doi.org/10.1006/anbe.1998.1008

Therneau TM, Grambsch PM, Pankratz VS (2003) Penalized Survival Models and Frailty. Journal of Computational and Graphical Statistics 12: 156–175. https://doi.org/10.1198/1061860031365

Trauer U, Hilker M (2013) Parental Legacy in Insects: Variation of Transgenerational Immune Priming during Offspring Development. Terenius O (Ed.). PLoS ONE 8: e63392. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063392

Warburg, M.R., Llnsenmair, K.E., Bercovitz, K., (1984). The effect of climate on the distribution and abundance of isopods. Symp. Zool. Soc. L. 53, 339‑367. https://doi. org/10.1108/eb003826.

Warburg MR, Calahorra Y, Amar K-O (2001) Non-Seasonal Breeding in a Porcellionid Isopod. Journal of Crustacean Biology 21: 375–383. https://doi.org/10.1163/20021975-99990137

Zanchi C, Troussard J-P, Moreau J, Moret Y (2012) Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 279: 3223–3230. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0493

Zimmer, M.,(2002). Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionaryecological approach. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 77https://doi.org/10.1017/ S1464793102005912. S1464793102005912.

ANNEXE 3

Tableau des bactéries isolées chez *A. vulgare*. La correspondance indique le pourcentage d'homologie de séquence avec une bactérie référencée dans la base du NCBI.

Sexe	Provenance	Prélèvement	Température	Espèce	Type	Correspondance
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Buttiauxella gaviniae*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Buttiauxella gaviniae*	Gram -	100%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Bacillus sp*	Gram +	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Bacillus sp*	Gram +	100%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Acinetobacter johnsonii*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Pseudomonas sp* **ou** *marincola*	Gram -	100%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Pseudomonas sp* **ou** *marincola*	Gram -	100,00%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Pseudomonas putida*	Gram -	99,80%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Pseudomonas sp*	Gram -	97%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Pseudomonas putida* **ou** *japonica*	Gram -	100%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Erwinia billingiae*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Citrobacter gillenii*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Aeromonas sp*	Gram -	98,90%
Femelle	Ligugé	Intestin	20°C	*Flavobacterium fluminis*	Gram -	99,30%
Mâle	Ligugé	Intestin	20°C	*Chryseobacterium sp*	Gram -	99,60%
Femelle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Chryseobacterium sp*	Gram -	99,10%
Mâle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Citrobacter werkmanii*	Gram -	99,80%
Mâle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Rhodococcus erythropolis*	Gram +	95,20%
Femelle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Pseudomonas oryzihabitans*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Pseudarthrobacter sp*	Gram +	99,80%
Femelle	Ligugé	Hémolymphe	20°C	*Lelliottia nimipresuralis*	Gram -	100%
Femelle	Élevage	Hémolymphe	20°C	*Vibrio rumoiensis*	Gram -	99,80%
Femelle	Élevage	Hémolymphe	20°C	*Aeromonas sp* **ou** *aquatica*	Gram -	98,10%
Mâle	Élevage	Hémolymphe	20°C	*Pantoea agglomerans*	Gram -	100%
Mâle	Élevage	Hémolymphe	20°C	*Pseudomonas sp ou marincola*	Gram -	97%
Mâle	Élevage	Hémolymphe	20°C	*Pseudomonas marincola*	Gram -	100%
Mâle	Ligugé	Intestin	37°C	*Buttiauxella gaviniae*	Gram -	99,60%
Mâle	Ligugé	Intestin	37°C	*Buttiauxella gaviniae*	Gram -	99,60%
Mâle	Élevage	Hémolymphe	37°C	*Serratia rubidaea*	Gram -	100%
Femelle	Élevage	Intestin	37°C	*Escherichia coli*	Gram -	100%
Femelle	Élevage	Intestin	37°C	*Raoultella planticola*	Gram -	99,70%
Mâle	Élevage	Intestin	37°C	*Raoultella planticola*	Gram -	100%
Mâle	Élevage	Hémolymphe	37°C	*Aeromonas sp*	Gram -	99,40%
Mâle	Élevage	Intestin	37°C	*Pantoea sp*	Gram -	100%
Femelle	Ligugé	Intestin	37°C	*Acinetobacter lwoffii*	Gram -	99,60%
Mâle	Ligugé	Intestin	37°C	*Citrobacter freundii*	Gram -	99,80%

ANNEXE 4

Received: 1 July 2020 | Revised: 22 September 2020 | Accepted: 14 October 2020

DOI: 10.1111/jeb.13721

RESEARCH PAPER

JOURNAL OF Evolutionary Biology eseb WILEY

Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between *Armadillidium vulgare* and *Salmonella*

Cybèle Prigot-Maurice[1] | Alexandra de Cerqueira De Araujo[2] | Sophie Beltran-Bech[1] | Christine Braquart-Varnier[1]

[1]Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267, Université de Poitiers - UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Poitiers Cedex 9, France

[2]Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte - UMR CNRS 7261, Université François-Rabelais - UFR Sciences et Techniques, Tours, France

Correspondence
Prigot-Maurice Cybèle, Université de Poitiers - UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267. Bâtiment B8-B35, 5 rue Albert Turpain, TSA 51106, F-86073 Poitiers Cedex 9, France.
Email: cybele.prigot@gmail.com

Funding information
This work was supported by the grant Vivipary and Immune Priming (PEPS EXOMOD CNRS); the State-Region Planning Contracts (CPER); the European Regional Development Fund (FEDER); the French Centre National de la Recherche Scientifique; the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; and the University of Poitiers.

Abstract

The protection conferred by a first infection upon a second pathogenic exposure (*i.e.* immune priming) is an emergent research topic in the field of invertebrate immunity. Immune priming has been demonstrated in various species, but little is known about the intrinsic factors that may influence this immune process. In this study, we tested whether age, gender and the symbiotic bacterium *Wolbachia* affect the protection resulting from immune priming in *A. vulgare* against *S. enterica*. We firstly primed young and old, symbiotic and asymbiotic males and females, either with a non-lethal low dose of *S. enterica*, LB broth or without injection (control). Seven days post-injection, we performed a LD_{50} injection of *S. enterica* in all individuals and we monitored their survival rates. We demonstrated that survival capacities depend on these three factors: young and old asymbiotic individuals (males and females) expressed immune priming (*S. enterica*-primed individuals survived better than LB-primed and non-primed), with a general decline in the strength of protection in old females, but not in old males, compared to young. When *Wolbachia* is present, the immune priming protection was observed in old, but not in young symbiotic individuals, even if the *Wolbachia* load on entire individuals is equivalent regardless to age. Our overall results showed that the immune priming protection in *A. vulgare* depends on individuals' states, highlighting the need to consider these factors both in mechanistical and evolutionary studies focusing on invertebrate's immunity.

KEYWORDS

crustacean, immune priming, immunity, infection, protection, *Salmonella*, survival, *Wolbachia*

1 | INTRODUCTION

During their entire life, animals are in constant interaction with invisible microbes. A set of mechanisms, involving both specialized defender cells and the production of antimicrobial components (Siva-Jothy et al., 2005; Sompayrac, 2019), have been selected in hosts to recognize and defend against pathogenic microbes: the immune system (Beck & Habicht, 1996; Chaplin, 2010; Müller et al., 2008; Nicholson, 2016). The immune system is a highly plastic process, constantly influenced by various environmental and internal factors (Buchmann, 2014; Chiu et al., 2017). Among them, a lot of attention have been paid to age, gender and symbiosis.

Several immune functions are age and gender-related (Klein & Flanagan, 2016; Stanley, 2012). With ageing, the immune system

Prigot-Maurice Cybèle and Cerqueira de Araujo Alexandra are Co-first authors.

Beltran-Bech Sophie and Braquart-Varnier Christine are Co-last authors.

© 2020 European Society For Evolutionary Biology. Journal of Evolutionary Biology © 2020 European Society For Evolutionary Biology

undergoes a general decline according to time by the immuno-senescence process (Stanley, 2012). For example, capacities of nodulation, encapsulation or phagocytosis decrease with age, as well in drosophila as in bumble bee, cricket or scorpion flies (Mackenzie et al., 2011; Kurtz, 2002; Doums et al., 2002; Park et al., 2011). These reductions of immuno-competences in older individuals may increase the susceptibility to infection (Adamo et al., 2001; Kurz & Tan, 2004; Mackenzie et al., 2011; Stanley, 2012; Roberts & Hughes, 2014; Pigeault et al., 2015). Ageing can affect differently immune abilities in males and females (Adamo et al., 2001; Mackenzie et al., 2011), and in many invertebrate species, females have generally greater immune defence's compared to males (Arizza et al., 2013; Kurtz et al., 2000; May, 2007; Pigeault et al., 2014; Rheins & Karp, 1985; Rolff, 2001; Taylor & Kimbrell, 2007; Vogelweith et al., 2017; Yourth et al., 2002). Differences in life history strategy could explain this gender effect, where females would invest more on their longevity, including the defence against pathogens, while males maximize multiple mating (Bateman, 1948; May, 2007; Rolff, 2002). Although effects of ageing and gender have been clearly demonstrated, most of studies focused on a specific age and sex to conduct their experiments, sometimes leading to a not well representative comprehension of immune processes (Ben Ami, 2019).

Symbiosis between hosts and microorganisms is widely recognized as a driving force of the immune system evolution, notably through the deep modifications it exercises on the host immune functions (Chiu et al., 2017; Gross et al., 2009; Heddi & Zaidman-Rémy, 2018; McFall-Ngai, 2002; Oliver et al., 2014; Werren et al., 2008). Symbionts can interfere directly with pathogens through competition, by producing antimicrobial components or indirectly by triggering up-regulation of host immunity (Clay, 2014; Oliver & Moran, 2009; Oliver et al., 2014). In the last case, the symbiont-mediated defence induces the over-expression of immune genes (e.g. melanization process, antimicrobial peptides production) or the modification of cellular immune response, improving the host defences (Kambris et al., 2009; Pan et al., 2012; Rancès et al., 2012; Weiss et al., 2012). Fruit flies, mosquitoes, aphids and bean bugs harbouring *Wolbachia*, *Regiella insecticola* and *Burkholderia* respectively, display greater resistance against pathogenic viruses, bacteria and fungi (Hedges et al., 2008; Kim et al., 2015; Moreira et al., 2009; Sarborough et al., 2005; Teixeira et al., 2008; Walker et al., 2011, Ye et al., 2013). As this immuno-modulation driven by symbionts can be considered as a functional immune extension of the host (Chiu et al., 2017; Oliver & Moran, 2009), defensive symbioses have opened the conceptual framework of innate immunity.

More than just detecting and fighting pathogenic microbes, the innate immune system of some invertebrates displays adaptive features, similar to the immune memory of vertebrates (Kurtz, 2005; Milutinovic & Kurtz, 2016). Called "immune priming", the invertebrate's immune system can be stimulated during a first pathogenic infection, providing the host with protection (better resistance and/or tolerance) in the event of a new exposure to a pathogen (Cooper & Eleftherianos, 2017; Gourbal et al., 2018; Little & Kraaijeveld, 2004). With more than 40 species expressing this ancestral "adaptative immunity", researchers pointed out variable features and mechanisms (Milutinović & Kurtz, 2016; Lanz-Mendoza & Garduño, 2018). Immune priming is most of the time the result of a second faster, enhanced and/or a sustained immune response, but processes are still investigated (Contreras-Garduño et al., 2015; Coustau et al., 2016; Mikonranta et al., 2014; Pinaud et al., 2016; Pradeu & Pasquier, 2018). Identifying and disentangling the factors affecting immune priming is thus required to better understand its functions and evolution. Previous experiments already showed that immune priming depends on age and gender (Daukste et al., 2012; Moret et al., 2019), but few studies have experimented the influence of symbiotic bacteria or bacterial communities on immune priming (Braak et al., 2013; Contreras-Garduño et al., 2015; Futo et al., 2016). To our knowledge, only one study showed that none of the three symbionts of aphid (*Serratia symbiotica*, *Hamiltonella defensa* or *Regiella insecticola*) affect the immune priming protection (Braak et al., 2013). However, asymbiotic aphids do not have the abilities to mount an immune priming response, which does not allow a definitive conclusion on the effect (or lack of effect) of symbiont on immune priming. Even though we know that age, sex and symbiosis affect the host immunity, we ignore how these factors and their interactions affect immune priming in invertebrate models.

Terrestrial isopods are appropriate organisms to investigate this question. Compared to dipterian models, these crustaceans have a long lifespan (natural populations display 13% of two-year-old individuals; Pitelka & Paris, 1962; Warburg et al., 1984), especially suitable for ageing effects' study (Depeux et al., 2020; Pitelka & Paris, 1962). Age and gender induce variations in their immune parameters (Depeux et al., 2020; Pigeault et al., 2014; Sicard et al., 2010) and several species harbour the maternally transmitted endosymbiont *Wolbachia* (Bouchon et al., 1998; Cordaux et al., 2012). In the common woodlouse *Armadillidium vulgare*, this intracellular bacterium feminizes genotypic males into functional phenotypic females (Martin et al., 1973; Rigaud & Juchault, 1993; Bouchon et al., 2008), but also protects the host against some pathogens (Braquart-Varnier et al., 2015). Individuals harbouring *Wolbachia* survived better facing *Salmonella enterica* or *Listeria ivanovii* infections, compared to asymbiotic ones. *Wolbachia* is detectable in most animal tissues, including haematopoietic organs and haemocytes (Braquart-Varnier et al., 2015), where it induces the over-expression of immune genes and a decline in immune functions in older individuals (Chevalier et al., 2011, 2012; Sicard et al., 2010). In addition, *A. vulgare* can mount an immune priming protection against *S. enterica* (Prigot-Maurice et al., 2019). A first infection occurring 7 days before a second sub-lethal infection improves survival rates of primed individuals and increases persistently their haemocyte viabilities (Prigot-Maurice et al., 2019).

Hence, by using *A. vulgare* and its pathogenic bacterium *S. enterica*, we explored how age, gender and *Wolbachia* affect the host survival upon secondary infection (i.e. immune priming protection). We monitored survival rates facing a LD_{50} injection of *S. enterica*-primed or non-primed individuals, young (1 year old) or old (2 years old), and harbouring or not the feminizing *w*VulC *Wolbachia* strain (symbiotic

females or asymbiotic males and females). Knowing that *Wolbachia* loads can be correlated with the host resistance to pathogens (Lu et al., 2012; Osborne et al., 2012), we additionally compared the *Wolbachia* load in young and old symbiotic individuals. For the first time, we demonstrated interactions of these three factors on the immune priming protection in an invertebrate species.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Biological model

Armadillidium vulgare individuals descended from two laboratory lineages sharing the same genetic background. The symbiotic line (w^+, infected with *w*VulC *Wolbachia*) was experimentally created from the asymbiotic line (w^-, non-infected with *Wolbachia* and sampled at Helsingör, Denmark, 1982). In 2012, we infected 35 asymbiotic females with the *w*VulC *Wolbachia* strain coming from 5 infected females. The transinfection was made as described in Le Clech' et al. (2012): infected ovaries of the 5 females were sampled and grinded in a Ringer solution. After filtration, 1 μl of ovaries suspension was injected in the general cavity of receiver females. Because *w*VulC *Wolbachia* strain is highly feminizing in this species (Le Clech' et al., 2012), almost all infected individuals are phenotypically females (Cordaux et al., 2004). Symbiotic lineage was thus maintained by crossbreeding symbiotic females (in 2012) and daughters (2013–2019) with non-infected asymbiotic males. All individuals were maintained under natural photoperiod at 20°C, by same clutches (sibling separated) in 10 × 30 cm plastic boxes containing moistened potting mix supplied with ad libitum linden leaves and fresh carrot slices.

For the survival experiment (details in part 2.2.1), we used 528 individuals divided in 6 different groups: 1-year-old w^- females, 2-year-old w^- females, 1-year-old w^- males, 2-year-old w^- males, 1-year-old w^+ females and 2-year-old w^+ females (see Table 1 for sample size details). Ages of individuals (1 and 2 years old) represent the bulk of natural populations (Pitelka & Paris, 1962) and were approximated around ± 2 months. As 90% of the broods harbouring *Wolbachia* are females (Martin et al., 1973; Rigaud & Juchault, 1993; Bouchon et al., 2008), we did not obtain enough w^+ males to conduct our experiment on this group and we ignore whether the w^+ females were genetically male or female. Because *A. vulgare* is an indeterminate grower, old individuals are bigger than young ones. We paid attention to use individuals of equivalent size for each age classes and all individuals were virgin at the time of the experiment.

To perform our experiment, we used the pathogenic bacterium *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* J18 (Verdon et al., 2016), already known to induce immune priming in *A. vulgare* (Prigot-Maurice et al., 2019). *S. enterica* is a gram-negative and facultative intracellular bacterium, with the same structure and ecological niche as *Wolbachia*. *S. enterica* is commonly found in soil, where live woodlice (Jacobsen & Bech, 2012), and is also pathogen for several invertebrate species (Aballay et al., 2000; Rottschaefer & Lazzaro, 2012; Viegas et al., 2013). Cultures of *S. enterica* were produced as described in Prigot-Maurice et al. (2019). In short, we performed the bacterial cultures from a frozen glycerol stock dropped in Luria-Bertani (LB) broth, composed of 25 g/L of LB base (Invitrogen 12795-027) and eventually supplemented with 15 g/L of agar-agar (Fisher BioReagentsTM BP1423-2) to spread bacteria onto LB agar plates. Bacterial growth was performed in 5 ml of fresh LB Broth at 37°C, 180 rpm overnight. For the injections, we reached the bacterial solutions to 0.7 optical density (600 nm) and concentrated them around 10^6 bacteria/μL. We then performed serial dilutions to obtain the correct dosages used for priming treatment and LD_{50} injection (details in part 2.2.1).

2.2 | Immune priming experiment

2.2.1 | Survival monitoring

To analyze the protection of immune priming depending on the age of individuals (1 or 2 years old) and their symbiotic states linked to gender (w^- females, w^- males, w^+ females), we used the same method as Prigot-Maurice et al. (2019). Briefly, we performed three priming treatments for each group of individuals: (1) non-injected ("non-primed" group) as a control, (2) injected with 100 nl of sterile Luria-Bertani medium ("LB-primed" group), and (3) injected with a non-lethal dose of $10^3 \pm 1.10^3$ living *S. enterica* in 100 nl of LB medium ("*S. enterica*-primed" group; see sample sizes in Table 1). Injections were achieved in the dorsal posterior abdominal segment of *A. vulgare* using

TABLE 1 Sample size details of *A. vulgare* individuals used for the survival experiments

Symbiotic states	Age	Non-primed	LB-primed	*S. enterica*-primed	Total number of animals per group
w^- females	1-year-old	35	34	35	104
	2-year-old	27	22	18	67
w^- males	1-year-old	34	35	34	103
	2-year-old	34	28	22	84
w^+ females	1-year-old	35	35	35	105
	2-year-old	23	21	21	65

Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during the priming treatment. w^-: asymbiotic individuals, w^+: symbiotic individuals harbouring *w*VulC *Wolbachia* strain.

a Drummond TM Nanoject (3-000-205A). After each bacterial injection, we controlled the injected dose by spreading 100 µl of the solution (diluted to 1 bacterium/µL) onto LB agar plates. The number of *S. enterica* colonies (CFU) was counted after an incubation at 37°C overnight. We kept only the data of individuals for which the injected dose was between 90 and 110 CFU, with an expected quantity of 100 CFU. We isolated individuals of the same group and priming treatment per 5 in plastic boxes (5 cm × 8 cm Ø) containing a moist paper, under a natural photoperiod at 20°C. Seven days later, non-primed, LB-primed and *S. enterica*-primed individuals were all injected with a LD_{50} (dosage killing 50% of individuals in 7 days) of $3.10^6 \pm 1.10^6$ living *S. enterica* in 100 nl (Braquart-Varnier et al., 2015; Prigot-Maurice et al., 2019). The injected dose was controlled as for the priming treatment. Individuals were returned to their boxes, and their survival rates were monitored every 8 hr for 7 days (168 hr post-injection). This experiment was replicated between seven and eight independent experimental replicates per treatment and age, containing for each between 2 and 6 individuals (see Appendix S1). Within each experimental replicate, we performed one or two series of priming treatment using different bacterial cultures (see Appendix S1).

2.2.2 | Wolbachia titration

To explore the effect of *Wolbachia* load in the immune priming protection according to age, we performed *Wolbachia* titration on 22 young (1 year old) and 25 old (2 years old) w^+ females. After a wash in 0.28% NaClO and water, individuals were crushed entirely in a sterile mortar with liquid nitrogen. We extracted the total DNA of resulting powders using a classic phenol-chloroform method (Kocher et al., 1989). qPCR reactions were then performed to measure the copy number of the *wsp* gene (*Wolbachia* surface protein) as described in Braquart-Varnier et al. (2015). We quantified the total DNA concentration for each sample with a Nanodrop 1,000 spectrophotometer (Thermo) at 260 nm. One microlitre of DNA (15–69 ng) was added to 5 µl of SYBR Green Master mix with 0.5 µl of each specific primer (*wsp208f* and *wsp413r*) and 3 µl of sterile water. Using a Roche Light Cycler 480, we set the qPCR reaction program as follows: 10 s at 95°C, then 10 s at 95°C, 10 s at 60°C and 20 s at 72°C, repeated in 45 cycles. Three technical replicates were analyzed for each sample, and we verified the specificity of qPCR products with a melting curve from 65 to 97°C. The number of *wsp* gene copies was estimated thanks to a standard dilution curve of the *wsp* gene purified by standard PCR product. To obtain normalized and comparable values, we divided the number of *wsp* copies (mean of the three replicates) by the total amount of DNA for each sample (Braquart-Varnier et al., 2015).

2.3 | Statistical analysis

We performed all statistical analyses with R, version 3.6.3 (R Core Team, 2020).

The protection of immune priming, reflected by the frequency of living animals following the LD_{50}, was tested with a global mixed-effects Cox proportional hazard regression model (*coxme* packages; Therneau et al., 2003). We entered the priming treatment (non-primed, LB-primed and *S. enterica*-primed), the age (1 or 2 years old) and the symbiotic states (w^- females, w^- males or w^+ females) as categorical fixed effects. We decided to merge the gender (female, male) and the *Wolbachia* presence/absence (w^+, w^-) in a single variable (*i.e.* symbiotic states) as we cannot determine whether the w^+ females are genetically males or females. These three symbiotic states still allowed us to compare only the effect of gender in asymbiotic individuals (w^- males versus w^- females). We included the interactions between the three fixed effects to compare the survival rate of priming treatments (a) inside each symbiotic states (w^- females, w^- males, w^+ females), (b) between symbiotic states (w^- females versus w^- males versus w^+ females) and (c) between their age (1 versus 2 years old of each symbiotic state). These comparisons were carried out by analyzing the pairs of means with Tukey adjustment (*lsmeans* package; Lenth, 2016). To correct the non-independence of samples within the same series of priming treatment in a given experimental replicate, we also entered three categorical random factors in the model: the box containing several individuals, nested in series of injection, themselves nested within each replicate (Harrison et al., 2018). These random factors also allowed to consider the slight variations of injected doses in the statistical analysis. The hazard ratios (HR) from this model were obtained as an estimate of the ratio between the instantaneous risks of death comparing priming treatments, age and symbiotic states.

The Wilcoxon–Mann–Whitney test was used to compare *Wolbachia* titration (*wsp* gene copies/ng of total DNA) between 1-year-old and 2-year-old w^+ females by using the *rstatix* package (Kassambara, 2020), as the data were not normally distributed (Shapiro–Wilk normality test: 1-year-old: $W = 0.936$, $p = .166$; 2-year-old: $W = 0.898$, $p = .01$) and the variances were not homogenous (Bartlett's K-squared = 14.594, $df = 1$, $p < .001$).

The datasets and the R script used for all our analyses are available on the open access repository Mendeley Data (Prigot-Maurice et al., 2020: https://data.mendeley.com/datasets/6myn7xp5d2/draft?a=7ed556a6-6d5f-4130-875c-5391b92b947b).

3 | RESULTS

3.1 | Immune priming

The priming treatment (non-primed, LB-primed, *S. enterica*-primed), the age (1 year old, 2 years old) and the symbiotic state (w^- males, w^- females, w^+ females) had all effects on the survival abilities of individuals following a LD_{50} injection of *S. enterica* (priming treatment: $\chi^2 = 84.09$, $df = 2$, $p < .001$; age: $\chi^2 = 13.56$, $df = 1$, $p < .001$; symbiotic state: $\chi^2 = 7.99$, $df = 2$, $p = .01$; Figure 1). No interactions were significant between the fixed effects, excepted a tendency for

the interaction of symbiotic state and priming treatment ($\chi^2 = 8.55$, $df = 4$, $p = .07$).

Whatever the group of *A. vulgare* (age, gender and symbiotic state), the *S. enterica*-primed individuals always survived better than non-primed and LB-primed ones ($p < .05$ for all comparisons, with lower risks of death included between 53% and 87%, Table 2, Figure 1), excepted for the 1-year-old w^+ females, where no difference in survival rate was observed between the three priming treatments ($p > .05$, Table 2, Figure 1). For all group of individuals (w^- females, w^- males, w^+ females, 1 year old or 2 years old), non-primed and LB-primed individuals did not show difference in their survival rate facing the LD_{50} injection into a same group of individuals ($p > .05$, Table 2, Figure 1).

Concerning the age of individuals, the 1-year-old w^- females survived better than 2-year-old comparing same priming treatment

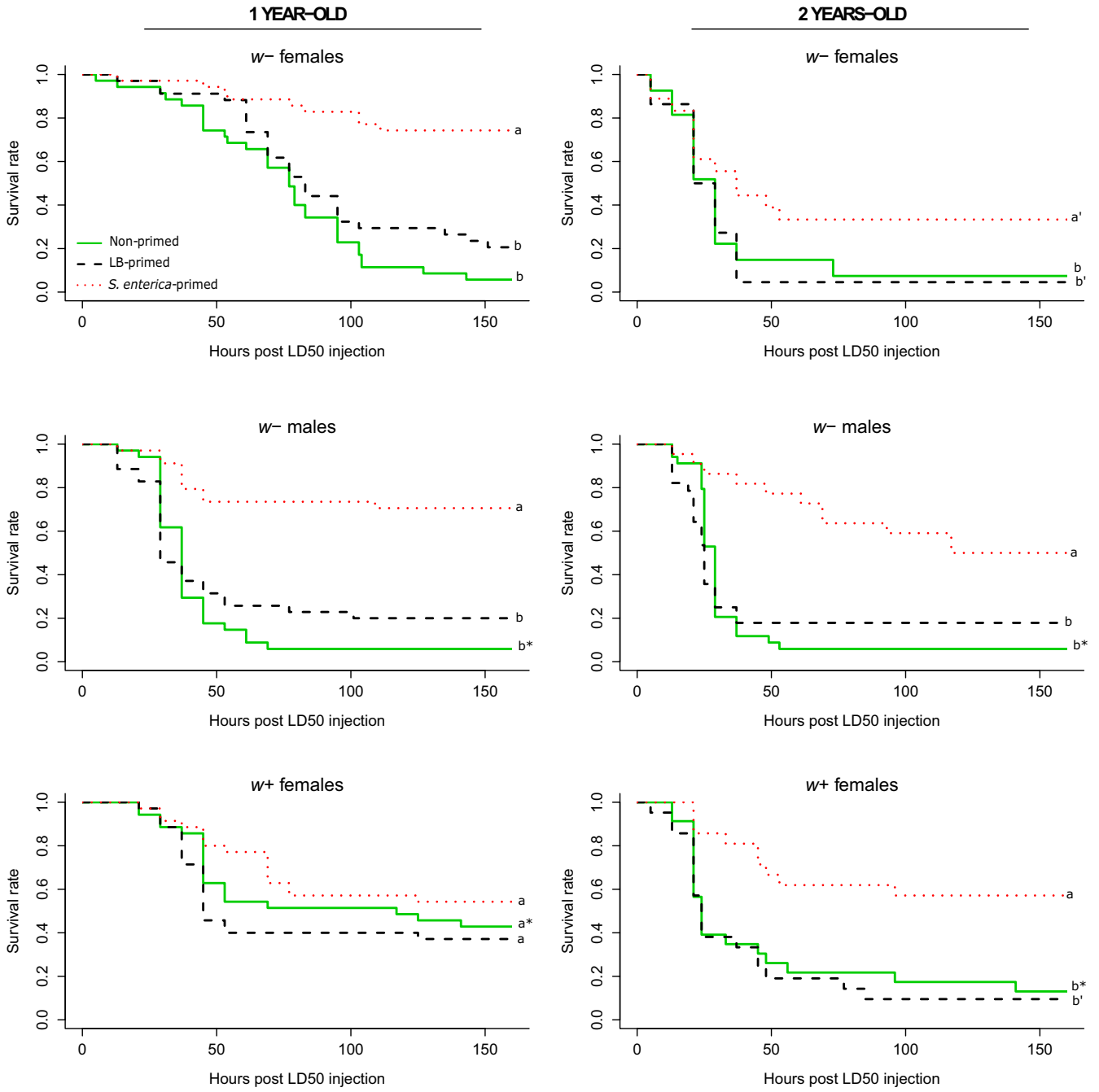


FIGURE 1 Survival rates of primed (LB-primed: injected with LB;*S. enterica*-primed: injected with 10^3*S. enterica*during priming treatment) and non-primed (non-injected during priming treatment) individuals facing a LD_{50}injection, according to their symbiotic states (w^-: asymbiotic individuals, w^+: symbiotic individuals harbouring*w*VulC*Wolbachia*strain) and age (1 or 2 years old). Different letters indicate significant differences between priming treatments inside one symbiotic state. Single quotation mark indicates significant difference of the same priming treatment between 1 and 2-year-old individuals of same symbiotic states. Stars indicate significant differences of same priming treatment between different symbiotic states of same age

TABLE 2 Pairwise comparisons (Tukey adjustment) and hazard ratio of survival rates for the priming treatments (Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during priming treatment) according to age (1 or 2 years old) and symbiotic state of individuals (w^-: asymbiotic individuals, w^+: symbiotic individuals harbouring *w*VulC *Wolbachia* strain)

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	**SE**	***p-value***	**Hazard ratio**
1-year-old/ w^- females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.649	0.415	**.0002**	**0.13 CI: [0.06;0.27]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.34	0.423	**.004**	**0.19 CI: [0.09;0.42]**
LB-primed/ Non-primed	0.30	0.314	.586	0.65 CI: [0.39;1.08]
2-year-old/ w^- females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.174	0.413	**.012**	**0.47 CI: [0.24;0.95]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.288	0.438	**.009**	**0.43 CI: [0.21;0.9]**
LB-primed/ Non-primed	−0.114	0.378	.951	1.09 CI: [0.61;1.96]
1-year-old/ w^- males				
S. enterica-primed/ Non-primed	2.089	0.406	**<.001**	**0.16 CI: [0.07;0.34]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.821	0.410	**<.001**	**0.2 CI: [0.09;0.4]**
LB-primed/ Non-primed	0.267	0.314	.670	0.83 CI: [0.49;1.38]
2-year-old/ w^- males				
S. enterica-primed/ Non-primed	2.044	0.401	**<.001**	**0.24 CI: [0.12;0.49]**
S. enterica-primed/ LB-primed	1.717	0.415	**.0001**	**0.25 CI: [0.12;0.52]**
LB-primed/ Non-primed	0.327	0.331	.987	0.95 CI: [0.55;1.63]
1-year-old/ w^+ females				
S. enterica-primed/ Non-primed	0.335	0.379	.65	0.70 CI: [0.36;1.3]
S. enterica-primed/ LB-primed	0.587	0.373	.257	0.53 CI: [0.28;1.0]
LB-primed/ Non-primed	−0.252	0.356	.758	1.30 CI: [0.71;2.4]
2-year-old/ w^+ females				
S. enterica-primed/ Non-primed	1.679	0.452	**.0006**	**0.28 CI: [0.13;0.61]**
S. enterica-primed/ LB-primed	2.019	0.461	**<.001**	**0.24 CI: [0.11;0.54]**
LB-primed/ Non-primed	−0.340	0.388	.656	1.15 CI: [0.61;2.16]

Note: Values where $p \leq .05$ are given in bold. The referred treatments for the hazard ratio calculation are non-primed or LB-primed. When HR < 1 and the confident interval (CI 95%) does not overlap 1, a lower risk of death is observed for *S. enterica*-primed individuals.

($p < .05$ for all comparisons, with lower risks of death ranging from 2.7 to 5.6 time less, Table 3, Figure 1). By contrast, for the w^- males, no difference in survival rates was observed between the 1-year-old and 2-year-old individuals ($p > .05$, Table 3, Figure 1), even if the 1-year-old non-primed tended to better survive than 2-year-old non-primed ($p = .06$, Table 3, Figure 1). In w^+ females, non-primed aged of 1 year old tended to have higher survival rate than non-primed of 2 years old ($p = .06$; Table 3), with 2.9 less chance of dying. LB-primed w^+ females survived better at 1 year old than 2 years old ($p = .04$, with 2.8 times less chance of dying, Table 3). However, this is not the case for the *S. enterica*-primed w^+ females, which had same survival rate when aged of 1 year old or 2 years old ($p = .57$, Table 3, Figure 1).

When comparing w^- males, w^- females and w^+ females, we showed that 1-year-old *S. enterica*-primed survived as well for all the symbiotic states ($p > .05$ for all comparisons, Table 4), meaning the strength of protection conferred by the first infection is the same whatever the symbiotic state and gender. Focusing on non-primed and LB-primed, no significant differences were observed comparing w^- males and w^- females, although the instantaneous risk of death was significantly higher for non-primed and LB-primed w^- males (respectively 2.61 and 1.96 times more chance to die compared to w^- females, Table 4). Non-primed w^+ females survived better than non-primed w^- males ($p = .04$, Table 4), with a lower risk of death of 80%. Non-primed w^+ females had not higher survival rate than non-primed w^- females ($p = .47$, Table 4), but their instantaneous risk of death was significantly lower, with 48% less chance to die. Hence, the presence of *Wolbachia* improved the survival capacities of w^+ females that have not been primed. In addition, LB-primed w^+ females also had significantly lower risk of death compared to LB-primed w^- males (50% time less chance to die), but this was not the case compared to w^- females (Table 4).

For the 2-year-old individuals, non-primed w^+ females survived better than w^- males ($p = .01$, Table 4). Neither differences of survival abilities nor in the instantaneous risk of death were observed for all other symbiotic states' comparisons of this age ($p > .05$, see Table 4).

TABLE 3 Pairwise comparisons (Tukey adjustment) and hazard ratio of survival rates between 1-year-old and 2-year-old individuals, according to the symbiotic state (w^-: asymbiotic individuals, w^+: symbiotic individuals harbouring *w*VulC *Wolbachia* strain) and the priming treatments (non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during priming treatment)

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	**SE**	***p-value***	**Hazard ratio**
w^- females				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−1.698	0.645	**.008**	**4.6 CI: [1.9;11]**
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−1.646	0.572	**.004**	**5.6 CI: [3;11]**
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−1.001	0.550	*.068*	**2.7 CI: [1.6;4.7]**
w^- males				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−0.971	0.606	.109	1.8 CI: [0.76;4.2]
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−0.867	0.513	.090	1.6 CI: [0.93;2.8]
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−0.927	0.493	*.060*	**1.9 CI: [1.2;3.2]**
w^+ females				
S. enterica-primed – 1 versus 2-year-old	−0.342	0.614	.576	1 CI: [0.45;2.3]
LB-primed – 1 versus 2-year-old	−1.089	0.545	**.045**	**2.8 CI: [1.5;5.1]**
Non-primed – 1 versus 2-year-old	−1.001	0.550	*.068*	**2.9 CI: [1.6;5.5]**

Note: Values where $p \leq .05$ are given in bold and $.05 < p < .07$ with significant hazard ratio in italic. The referred age for the hazard ratio calculation is 1 year old. When hazard ratio > 1 and the confident interval (CI 95%) does not overlap 1, a higher risk of death is observed for 2-year-old individuals.

3.2 | Wolbachia titration

The *Wolbachia* loads of 1-year-old w^+ females (quantity of *wsp* copies/ng of DNA) was not statistically different from 2-year-old w^+ females (Wilcoxon rank sum test: W = 263, p-value = .80; Mean ± *SE*: 1-year-old: 913.24 ± 2,447.94; 2-year-old: 721.58 ± 1,050.03; see Fig. S1).

4 | DISCUSSION

4.1 | *Immune priming protection without* Wolbachia*: a similar expression regardless to gender, but different in the strength of protection with ageing*

In 2019, Prigot-Maurice et al. highlighted an immune priming protection in *A. vulgare* against two successive infections of *S. enterica* occurring 7 days apart. Because *S. enterica* was still detectable in the haemolymph of primed individuals at the time of the second sub-lethal infection, the underlying mechanism of immune priming against *S. enterica* is expected to be a sustained immune response, allowing the host to resist/tolerate a high amount of pathogens in contrast to non-primed individuals (Prigot-Maurice et al., 2019). In line with this previous study, we confirmed that immune priming was well expressed in w^- females *A. vulgare* (without *Wolbachia*) infected with *S. enterica* 7 days before. For the first time, we showed that males *A. vulgare* also improved their survival abilities when facing a second infection, as in previous studies using both sexes to investigate invertebrate immune priming (Khan et al., 2016; Moreno-Garcia et al., 2015). While basal immunity in *A. vulgare* differs by gender, with females having higher humoral activity whereas males have higher immune cell density (Sicard et al., 2010), we demonstrated that both sexes benefit from immune priming protection, highlighting a similar evolutionary pathway to fight subsequent pathogenic infections regardless to gender.

Additionally, we demonstrated that immune priming protection in *A. vulgare* is well maintained through ageing. Whatever their age (1 or 2 years old), *S. enterica*-primed individuals always displayed better survival abilities compared to non-primed and LB-primed ones of the same age and sex. To our knowledge, the only study that carried on ageing and immune priming did not observe similar results: old mealworm beetles did not display an immune priming protection by contrast to young individuals, probably because of immunosenescent process (Daukste et al., 2012). But in our case, *A. vulgare* lives up to two years, still reproduce until three years old (Al-Dabbagh & Block, 1981; Depeux et al., 2020; Pitelka & Paris, 1962; Warburg et al., 1984) and live in moist soil, an environment particularly rich in microbial density and diversity (Ranjard & Richaume, 2001; Torsvik et al., 1990), where the risks of infection are high. According to Best et al. (2013), long-lived species are more likely to encounter the same pathogen several times, which is most likely to be a selective force acting to select and maintain immune priming during ageing. Conversely, it cannot be excluded that the expression of immune priming to resist/tolerate subsequent infections is a biological mechanism partly responsible for the extension of the lifespan.

By comparing young and old w^- males—or young and old w^- females—we showed however a difference in the strength of protection according to the senescent pattern. Survival abilities to the

TABLE 4 Pairwise comparisons (Tukey adjustment) and hazard ratio of survival rates between the symbiotic state of individuals (w^-: asymbiotic individuals, w^+: symbiotic individuals harbouring *w*VulC *Wolbachia* strain) according to age (1 or 2 years old) and priming treatments (Non-primed: non-injected; LB-primed: injected with LB; *S. enterica*-primed: injected with 10^3 *S. enterica* during priming treatment)

SURVIVAL RATE (frequency of living individuals)				
	Estimate	**SE**	***p-value***	**Hazard ratio**
1-year-old/ Non-primed				
w^- females/ w^- males	−0.652	0.525	.421	**2.61 CI: [1.57;4.34]**
w^- females/ w^+ females	0.636	0.543	.470	**0.52 CI: [0.29;0.91]**
w^- males/ w^+ females	−1.288	0.545	**.04**	**0.20 [CI: 0.11;0.36]**
1-year-old/ LB-primed				
w^- females/ w^- males	−0.693	0.535	.397	**1.96 CI: [1.15;3.3]**
w^- females/ w^+ females	0.075	0.545	.989	0.98 CI: [0.56;1.7]
w^- males/ w^+ females	−0.768	0.544	.333	**0.50 CI: [0.29;0.88]**
1-year-old/ *S. enterica*-primed				
w^- females/ w^- males	−0.212	0.652	.943	1.3 CI: [0.53;3.2]
w^- females/ w^+ females	−0.677	0.623	.521	2.1 CI: [0.9;4.8]
w^- males/ w^+ females	0.465	0.615	.729	1.60 CI: [0.73;3.5]
2-year-old/ Non-primed				
w^- females/ w^- males	−0.355	0.509	.765	0.9 CI: [0.53;1.5]
w^- females/ w^+ females	0.858	0.547	.259	0.79 CI: [0.43;1.4]
w^- males/ w^+ females	−1.213	0.439	**.015**	0.87 CI: [0.49;1.5]
2-year-old/ LB-primed				
w^- females/ w^- males	0.085	0.549	.986	0.77 CI: [0.42;1.4]
w^- females/ w^+ females	0.632	0.571	.510	0.78 CI: [0.41;1.5]
w^- males/ w^+ females	−0.547	0.455	.451	1.0 CI: [0.55;1.9]
2-year-old/ *S. enterica*-primed				
w^- females/ w^- males	0.514	0.599	.666	0.48 CI: [0.21;1.1]
w^- females/ w^+ females	1.363	0.637	.08	0.44 CI: [0.18;1]
w^- males/ w^+ females	−0.848	0.551	.271	0.9 CI: [0.37;2.2]

Note: Values where $p \leq .05$ are given in bold. The referred symbiotic states for the hazard ratio calculation are w^- females and w^- males. When hazard ratio > 1 or <1 and the confident interval (CI 95%) does not overlap 1, a lower risk of death is observed for w^- males or w^+ females.

second infection decline in old w^- females compared to young ones of same priming treatment, but this decline was not observed for w^- males: old males survived as well as young males comparing the same priming treatment. In *A. vulgare*, we know that genders display same changes in phenoloxidase activity and haemocyte concentrations with ageing and are therefore both affected by cellular senescence (Depeux et al., 2020; Sicard et al., 2010). However, Depeux et al. (2020) showed that females have higher β-galactosidase activity and lower immune cell viability than males, suggesting that females are physiologically more senescent than males of the same age. The "accelerated" senescence of females could be the consequence of a reproductive evolutionary cost, females allocating more physiological resources in reproduction through ageing than males (Bonduriansky et al., 2008; Lawniczak et al., 2007; Sheldon & Verhulst, 1996; Thiel, 2003; Vinogradov, 1998). In terrestrial isopods, even unmated females produce a ventral pouch during parturial moult, where they lay unfertilized eggs (Appel et al., 2011; Hornung, 2011; Warburg, 2011). Thus, old w^- females achieved more parturial moults than young ones. As a result, old females have, at 2 years old, probably less energy to cope with pathogen infections. We support this hypothesis especially by the sustained immune response expected for immune priming in *A. vulgare* (Prigot-Maurice et al., 2019). As an approved mechanism of immune priming, the sustained immune response is a maintained up-regulation of immune effectors between infections. Old females maybe have a less effective immune response, reflecting a potential trade-off between reproduction and immunity in senescent females. By contrast, males performed only standard moults and thus invest physiologically less in reproduction than females through ageing. Regarding to males, keeping the same abilities of survival whatever their age would be a significant advantage. Males naturally have longer lifespan than females (Geiser, 1934; Pitelka & Paris, 1962) and in natural populations, they disperse more than females for several reproductive reasons (Durand et al., 2019). In addition to live for long time, dispersing in

several places for mating should also increase the risks to be infected by pathogens (Moret et al., 2019), that could have been a selective force for maintaining high survival abilities facing an infection with ageing in males (Best et al., 2013).

4.2 | Wolbachia-*symbiotic females expressed differently immune priming protection depending on their age*

Wolbachia is a natural endocytobiont in woodlouse populations (Cordaux et al., 2012). Well known for its effect on reproduction (feminization of genetic males), *Wolbachia* also protects *A. vulgare* against some pathogens (Braquart-Varnier et al., 2015). Here, we tested the involvement of this symbiont in the immune priming protection. We showed that the presence of *Wolbachia* in w^+ females affected their survival abilities facing a second *S. enterica* infection differently according to their age. Young (1 year old) w^+ females did not benefit from increased protection of immune priming (*S. enterica*-primed did not survived better than non-primed and LB-primed ones) whereas the old w^+ females (2 years old) had an immune priming protection similar to asymbiotic individuals.

In the young w^+ females, non-primed females survived better than non-primed w^- males and had lower risk of death compared to non-primed w^- females. Their better survival capacities highlighted that the simple presence of *Wolbachia* already protects the host against *S. enterica* LD_{50} infection, limiting the distinction of the immune priming protection conferred by the first infection. We know that 24h post-infection, 1-year-old *A. vulgare* harbouring *Wolbachia* displayed less *S. enterica* in their haemolymph comparing to asymbiotic ones (Braquart-Varnier et al., 2015). Crossing this statement with our results, we hypothesized two potential explanations: (1) non-primed and LB-primed w^+ females had an "already primed" immune system because of the constant presence of *Wolbachia* (Kambris et al., 2009; Pan et al., 2018; Rancès et al., 2012), or (2) there was a direct competition between *Wolbachia* and *S. enterica*, as these two gram-negative bacteria share the same intracellular niche in the host (Caragata et al., 2013; Chiu et al., 2017; Pan et al., 2018). However, because young non-primed and LB-primed w^+ females survived as well as young *S. enterica*-primed w^+ females, we cannot determine whether the first infection induces an immune priming response in young w^+ females. Nevertheless, young *S. enterica*-primed w^+ females survived as well as young *S. enterica*-primed asymbiotic individuals and old *S. enterica*-primed w^+ females (which all expressed an immune priming protection), probably indicating its expression through ageing.

In old w^+ females, we observed an immune priming protection may be due to the senescent process. *Wolbachia* reduces the haemocyte densities and phenoloxidase activity in 2-year-old w^+ *A. vulgare* (Sicard et al., 2010). The immunodepression of old w^+ females could explain the survival decline of non-primed and LB-primed of this group (comparing to young w^+ females of same priming treatment), revealing higher survival rates in old *S. enterica*-primed w^+ females which express immune priming. Another explanation could be the variation of *Wolbachia* load according to age. In some species, the high density of *Wolbachia* is correlated with higher level of protection against pathogens (López-Madrigal & Duarte, 2019; Lu et al., 2012; Osborne et al., 2012) and older individuals have lower *Wolbachia* density (Binnington & Hoffman, 1989; Breeuwer & Werren, 1993; Ikeda et al., 2003). Here, young w^+ females had as much *Wolbachia* as old ones, which did not confirm this hypothesis. However, we performed the *Wolbachia* titration in entire animal, which do not exclude that some specific tissues or organs may have different loads according to age. To better understand the specific effect of *Wolbachia* load on immune priming, further analyses are required, by measuring the *Wolbachia* load in immune tissue, or correlating it with survival rates for example.

4.3 | Evolutionary pathways of immune priming, what perspectives considering the influence of these factors on its expression?

Tate and Rudolf (2012) stated that little is known about the variation of immune priming among individuals and that further works should quantify various parameters, as they have the potential to influence population dynamics. We demonstrated that the strength of immune priming protection in *A. vulgare* was variable with gender-related ageing and the presence of the natural symbiont *Wolbachia*. From this statement, our results give a first step in the determination of individual intrinsic factors influencing immune priming and its evolution, especially in a symbiotic context.

To be selected, immune priming should have fitness advantages (Moret et al., 2019). As the presence of *Wolbachia* is enough to protect *A. vulgare* against potential pathogenic infections, populations naturally displaying *Wolbachia* for several generations should not have the same selection constraint on immune priming compared to asymbiotic populations. In young w^+ individuals, being primed did not increase the protection against *S. enterica*, that may reduce the immune priming benefits and its selective pressures. By contrast, we observed a benefit to be primed with *S. enterica* in old w^+ individuals, in which the protection by *Wolbachia* seems not efficient. The evolution of immune priming in a symbiotic context should thus be closely linked to the age structure of the population. However, the presence of *Wolbachia* in natural populations is not exclusive. Despite that *Wolbachia* in *A. vulgare* induces strongly female-biased sex-ratio (10%–20% of males on average; Rigaud et al., 1992; Rigaud et al., 1997; Bouchon et al., 2008), its prevalence varies between 6% and 60% (Juchault et al., 1992). In addition, harbouring *Wolbachia* can induce some costs for the host, such as a reduced fertility and lifespan (Braquart-Varnier et al., 2008; Lachat, 2009), an immune weakening (Braquart-Varnier et al., 2008; Chevalier et al., 2012; Sicard et al., 2010) or metabolism interference (Caragata et al., 2013; Kremer et al., 2009; Molloy et al., 2016), that could reduce fitness traits of symbiotic individuals. The global expression and selection of immune priming in *A. vulgare* should be highly heterogeneous,

according to the number of symbiotic individuals, their age and the proportion of asymbiotic males and females. In addition, immune priming could also depend on the susceptibility to be primed, the level of protection, the type of pathogens, their virulence and many other parameters (Best et al., 2013; Tidbury et al., 2012). These statements demonstrate that the involvement of *Wolbachia* in the protection against pathogens—through the immune priming or not—is an intricate evolutionary process, which could influence the dynamic of infections and the selective pressures exerted on the host immune system.

4.4 | Concluding remarks

By proving that the protective strength conferred by immune priming depends strongly on the ageing of individuals but also on the presence of *Wolbachia* for different ages, our results highlighted the importance of considering this immune process in the light of individual physiological and symbiotic states. To join Daukste et al. (2012) opinions, more attentions concerning these factors must be paid in future research, in order to better understand the invertebrate immune system. Considering these factors on epidemiological models of immune priming should improve the comprehension of these interactions between host fitness, beneficial symbionts, and pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Alexandra Laffite for the technical support of *A. vulgare* breeding, Carine Delaunay for her help concerning the *Wolbachia* quantification and Romain Pigeault for correcting the manuscript and his constructive comments on the present article.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Cybèle Prigot-Maurice wrote the whole article, carried out the dosage of *Wolbachia* and the additional survival experiments requested during the article revision, and performed all statistical analyses. Alexandra Cerqueira De Araujo performed the initial survival experiments. Christine Braquart-Varnier and Sophie Beltran-Bech supervised the project and made corrections to the manuscript.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at https://publons.com/publon/10.1111/jeb.13721.

ORCID

Cybèle Prigot-Maurice https://orcid.org/0000-0002-5636-8299
Sophie Beltran-Bech https://orcid.org/0000-0003-4379-0463
Christine Braquart-Varnier https://orcid.org/0000-0001-6398-7832

REFERENCES

Aballay, A., Yorgey, P., & Ausubel, F. M. (2000). *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, *10*(23), 1539–1542. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00830-7

Adamo, S. A., Jensen, M., & Younger, M. (2001). Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): Trade-offs between immunity and reproduction. *Animal Behaviour*, *62*(3), 417–425. https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1786

Al-Dabbagh, K. Y., & Block, W. (1981). Population ecology of a terrestrial isopod in two Breckland grass heaths. *British Ecological Society*, *50*(1), 61–77. https://doi.org/10.2307/4031

Appel, C., Quadros, A. F., & Araujo, P. B. (2011). Marsupial extension in terrestrial isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). *Nauplius*, *19*(2), 123–128. https://doi.org/10.1590/S0104-64972011000200003

Arizza, V., Vazzana, M., Schillaci, D., Russo, D., Giaramita, F. T., & Parrinello, N. (2013). Gender differences in the immune system activities of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *164*(3), 447–455. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.021

Bateman, A. J. (1948). Intra-sexual selection in Drosophila. *Heredity*, *2*(3), 349–368. https://doi.org/10.1038/hdy.1948.21

Beck, G., & Habicht, G. S. (1996). Immunity and the Invertebrates. *Scientific American*, *275*, 60–66. https://doi.org/10.1038/scientificamerican1196-60

Ben-ami, F. (2019). Host age effects in invertebrates: epidemiological, ecological, and evolutionary implications. *Trends in Parasitology*, *35*(6), 466–480. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.008

Best, A., Tidbury, H., White, A., & Boots, M. (2013). The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in invertebrate hosts. *Journal of the Royal Society Interface*, *10*, 20120887. https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0887

Binnington, K. C., & Hoffmann, A. A. (1989). Wolbachia-like organisms and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *54*(3), 344–352. https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90118-3

Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F., & Brooks, R. (2008). Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology*, *22*(3), 443–453. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01417.x

Bouchon, D., Rigaud, T., & Juchault, P. (1998). Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: Molecular identi ® cation and host feminization. *The Royal Society*, *265*(March), 1081–1090.

Bouchon, D., Cordaux, R., & Grève, P. (2008). Feminizing Wolbachia and the evolution of sex determination in isopods. *Insect Symbiosis*, *K. Bourtzis and T. Miller (Ed)*, 273–294.

Braak, B., Laughton, A. M., Altincicek, B., Parker, B. J., & Gerardo, N. M. (2013). Exposure to bacterial signals does not alter pea aphids' survival upon a second challenge or investment in production of winged offspring. *PLoS One*, *8*(8), e73600. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073600

Braquart-Varnier, C., Altinli, M., Pigeault, R., Chevalier, F. D., Grève, P., Bouchon, D., & Sicard, M. (2015). The mutualistic side of *Wolbachia*-isopod interactions: Wolbachia mediated protection against pathogenic intracellular bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *6*(DEC), 1–15. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01388

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003286

Braquart-Varnier, C., Raimond, M., Mappa, G., Chevalier, F. D., Le Clec'h, W., & Sicard, M. (2015). The hematopoietic organ: A cornerstone for *Wolbachia* propagation between and within hosts. *Frontiers in Microbiology*, *6*(DEC), 1–8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01424

Breeuwer, J. A. J., & Werren, J. H. (1993). Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics*, *135*(2), 565–574.

Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*, *5*(September), 1–8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00459

Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by *Wolbachia*. *PLoS Path*, *9*(6), e1003459. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459

Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S3–S23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980

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*(4), e18531. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018531

Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Charif, D., Mitta, G., Gavory, F., Wincker, P., Grève, P., Braquart-Varnier, C., & Bouchon, D. (2012). Feminizing *Wolbachia*: A transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiology*, *12*(SUPPL. 1), S1. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-S1-S1

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaeverbeke, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective microbiota: From localized to long-reaching co-Immunity. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1–19. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678

Clay, K. (2014). Defensive symbiosis: A microbial perspective. *Functional Ecology*, *28*(2), 293–298. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12258

Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Moreno-García, M., Velazquez-Meza, M. E., Valverde, V., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2015). *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection. *Developmental and Comparative Immunology*, *52*(2), 172–181. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.05.004

Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. *Frontiers in Immunology*, *8*, 539. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539

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. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800482

Cordaux, R., Pichon, S., Ben Afia Hatira, H., 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*(SPECIAL ISSUE), 123–131. https://doi.org/10.3897/zookeys.176.2284

Coustau, C., Kurtz, J., & Moret, Y. (2016). A Novel Mechanism of Immune Memory Unveiled at the Invertebrate-Parasite Interface. *Trends in Parasitology*, *32*(5), 353–355. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.005

Daukste, J., Kivleniece, I., Krama, T., Rantala, M. J., & Krams, I. (2012). Senescence in immune priming and attractiveness in a beetle. *Journal of Evolutionary Biology*, *25*(7), 1298–1304. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02516.x

Depeux C., Lemaître J.-F., Moreau J., Dechaume-Moncharmont F.-X., Laverre T., Pauhlac H., Gaillard J.-M., Beltran-Bech S. (2020). Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *Journal of Evolutionary Biology*, *33*(9), 1256–1264. http://dx.doi.org/10.1111/jeb.13667.

Depeux, C., Samba-Louaka, A., Becking, T., Braquart-Varnier, C., Moreau, J., Lemaître, J.-F., Laverre, T., Paulhac, H., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Gaillard, J.-M., & Beltran-Bech, S. (2020). The crustacean *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Oniscoidea), a new promising model for the study of cellular senescence. *Journal of Crustacean Biology*, *40*(2), 194–199. https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruaa004

Doums, C., Moret, Y., Benelli, E., & Schmid-Hempel, P. (2002). Senescence of immune defence in Bombus workers. *The Royal Entomological Society*, *27*, 138–144.

Durand, S., Grandjean, F., Giraud, I., Cordaux, R., Beltran-Bech, S., & Bech, N. (2019). Fine-scale population structure analysis in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea) reveals strong female philopatry. *Acta Oecologica*, *101*(April), 103478. https://doi.org/10.1016/j.actao.2019.103478

Futo, M., Armitage, S. A. O., & Kurtz, J. (2016). Microbiota plays a role in oral immune priming in *Tribolium castaneum*. *Frontiers in Microbiology*, *6*(JAN), 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01383

Geiser, S.W. (1934). Further observations on the sexratios of terrestrial isopods. *Field & Lab*, (3), 7–10.

Gourbal, B., Pinaud, S., Beckers, G. J. M., Van Der Meer, J. W. M., Conrath, U., & Netea, M. G. (2018). Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunological Reviews*, *283*(1), 21–40. https://doi.org/10.1111/imr.12647

Gross, R., Vavre, F., Heddi, A., Hurst, G. D. D., Zchori-Fein, E., & Bourtzis, K. (2009). Immunity and symbiosis. *Molecular Microbiology*, *73*(5), 751–759. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06820.x

Harrison, X. A., Donaldson, L., Correa-Cano, M. E., Evans, J., Fisher, D. N., Goodwin, C. E. D., Robinson, B. S., Hodgson, D. J., & Inger, R. (2018). A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ*, *6*, e4794. https://doi.org/10.7717/peerj.4794

Heddi, A., & Zaidman-Rémy, A. (2018). Endosymbiosis as a source of immune innovation. *Comptes Rendus - Biologies*, *341*(5), 290–296. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2018.03.005

Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., & Johnson, K. N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, *322*(5902), 702. https://doi.org/10.1126/science.1162418

Hornung, E. (2011). Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: Structure, physiology and behavior. *Terrestrial Arthropod Reviews*, *4*(2), 95–130. https://doi.org/10.1163/187498311X576262

Ikeda, T., Ishikawa, H., & Sasaki, T. (2003). Infection density of *Wolbachia* and level of cytoplasmic incompatibility in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *84*(1), 1–5. https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00106-X

Jacobsen, C. S., & Bech, T. B. (2012). Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food Research International*, *45*, 557–566.

Juchault P., Rigaud T., Mocquard J. (1992). Evolution of sex-determining mechanisms in a wild population of Armadillidium vulgare Latr. (Crustacea, Isopoda): competition between two feminizing parasitic sex factors. *Heredity*, *69*(4), 382–390. https://doi.org/10.1038/hdy.1992.138

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. https://doi.org/10.1126/science.1177531

Kassambara, A. (2020). Package ' rstatix'.

Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2016). Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. *Ecology and Evolution*, *6*(21), 7847–7855. https://doi.org/10.1002/ece3.2532

Kim, J. K., Lee, J. B., Huh, Y. R., Jang, H. A., Kim, C., Yoo, J. W., & Lee, B. L. (2015). *Burkholderia* gut symbionts enhance the innate immunity of host *Riptortus pedestris*. *Developmental & Comparative Immunology*, *53*(1), 265–269. https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.07.006

Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 626–638. https://doi.org/10.1038/nri.2016.90

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(16), 6196–6200. https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196

Kremer, N., Voronin, D., Charif, D., Mavingui, P., Mollereau, B., & Vavre, F. (2009). *Wolbachia* Interferes with Ferritin Expression and Iron Metabolism in Insects. *PLoS Path*, *5*(10), e1000630. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000630

Kurtz, J. (2002). Phagocytosis by invertebrate hemocytes: Causes of individual variation in *Panorpa vulgaris* scorpionflies. *Microscopy Research and Technique*, *57*(6), 456–468. https://doi.org/10.1023/B:COAP.0000018877.86161.8b

Kurtz, J. (2005). Specific memory within innate immune systems. *Trends in Immunology*, *26*(4), 186–192. https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001

Kurz C. Leopold, Tan Man-Wah (2004). Regulation of aging and innate immunity in C. elegans. *Aging Cell*, *3*, (4), 185–193. http://dx.doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00108.x.

Kurtz, J., Wiesner, A., Götz, P., & Sauer, K. P. (2000). Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Developmental and Comparative Immunology*, *24*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00057-9

Lachat, M. (2009). *Impact de deux souches de* Wolbachia *sur les traits d'histoire de vie de leurs hôtes* Armadillidium vulgare. Thèse de doctorat d'Etat, Université de Poitiers, 167 pages.

Lanz-Mendoza, H., & Garduño, J. C. (2018). Insect Innate Immune Memory. In E. L. Cooper (Ed.), *Advances in comparative immunology* (pp. 193–211). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76768-0_9

Lawniczak, M., Barnes, A., Linklater, J., Boone, J., Wigby, S., & Chapman, T. (2007). Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, *22*(1), 48–55. https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.09.012

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 Path*, *8*(8), e1002844. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002844

Lenth, R. V. (2016). Least-squares means: The R package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, *69*(1), 1–33. https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01.

Little, T. J., & Kraaijeveld, A. R. (2004). Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, *19*(2), 58–60. https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.011

López-Madrigal, S., & Duarte, E. H. (2019). Titer regulation in arthropod-*Wolbachia* symbioses. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(23), 1–30. https://doi.org/10.1093/femsle/fnz232

Lu, P., Bian, G., Pan, X., & Xi, Z. (2012). *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(7), e1754. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754

Mackenzie, D. K., Bussière, L. F., & Tinsley, M. C. (2011). Senescence of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, *46*(11), 853–859. https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.07.004

Martin, G., Juchault, R., & Legrand, J. 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. *Comptes Rendus De L'académie Des Sciences - Series D*, *276*, 2313–2316.

May, R. C. (2007). Gender, immunity and the regulation of longevity. *BioEssays*, *29*(8), 795–802. https://doi.org/10.1002/bies.20614

McFall-Ngai, M. J. (2002). Unseen forces: The influence of bacteria on animal development. *Developmental Biology*, *242*(1), 1–14. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0522

Mikonranta, L., Mappes, J., Kaukoniitty, M., & Freitak, D. (2014). Insect immunity: Oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Frontiers in Zoology*, *11*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-23

Milutinović, B., & Kurtz, J. (2016). Immune memory in invertebrates. *Seminars in Immunology*, *28*(4), 328–342. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.004

Molloy, J. C., Sommer, U., Viant, M. R., & Sinkins, S. P. (2016). *Wolbachia* modulates lipid metabolism in *Aedes albopictus* mosquito cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(10), 3109–3120. https://doi.org/10.1128/AEM.00275-16

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 *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, *Chikungunya*, and *Plasmodium*. *Cell*, *139*(7), 1268–1278. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042

Moreno-García, M., Vargas, V., Ramírez-Bello, I., Hernández-Martínez, G., & Lanz-Mendoza, H. (2015). Bacterial exposure at the larval stage induced sexual immune dimorphism and priming in adult *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS One*, *10*(7), e0133240. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133240

Moret, Y., Coustau, C., Braquart-Varnier, C., & Gourbal, B. (2019). Immune priming and trans-generational protection from parasites. In *Encyclopedia of animal behavior* (pp. 764–774). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.90726-X.

Müller, U., Vogel, P., Alber, G., & Schaub, A. (2008). The innate immune system of mammals and insects. *Trends in Innate Immunity*, *15*, 21–44.

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in Biochemistry*, *60*(3), 275–301. https://doi.org/10.1042/EBC20160017

Oliver, K. M., & Moran, N. A. (2009). Defensive symbionts in aphids and other insects. (Eds.), *Defensive mutualism in microbial symbiosis*, *10*, (129–147). https://doi.org/10.1201/9781420069327

Oliver, K. M., Smith, A. H., & Russell, J. A. (2014). Defensive symbiosis in the real world - advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecology*, *28*(2), 341–355. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12133

Osborne, S. E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., & Johnson, K. N. (2012). Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(19), 6922–6929. https://doi.org/10.1128/AEM.01727-12

Pan, X., Pike, A., Joshi, D., Bian, G., McFadden, M. J., Lu, P., Liang, X., Zhang, F., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2018). The bacterium *Wolbachia* exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *The ISME Journal*, *12*(1), 277–288. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.174

Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2012). *Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(1), E23–E31. https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108

Park, Y., Kim, Y., & Stanley, D. (2011). Cellular immunosenescence in adult male crickets, *Gryllus assimilis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *76*(4), 185–194. https://doi.org/10.1002/arch.20394

Pigeault, R., Braquart-Varnier, C., Marcadé, I., Mappa, G., Mottin, E., & Sicard, M. (2014). Modulation of host immunity and reproduction by horizontally acquired *Wolbachia*. *Journal of Insect Physiology*, *70*, 125–133. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.07.005

Pigeault, R., Nicot, A., Gandon, S., & Rivero, A. (2015). Mosquito age and avian malaria infection. *Malaria Journal*, *14*, 383. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0912-z

Pinaud, S., Portela, J., Duval, D., Nowacki, F. C., Olive, M.-A., Allienne, J.-F., Galinier, R., Dheilly, N. M., Kieffer-Jaquinod, S., Mitta, G., Théron, A., & Gourbal, B. (2016). A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *PLoS Path*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361

Pitelka, F. A., & Paris, O. H. (1962). Population Characteristics Of The Terrestrial isopod *Armadillidium Vulgare* in California Grassland. *Ecological Society of America*, *43*(2), 229–248.

Pradeu, T., & Du Pasquier, L. (2018). Immunological memory: What's in a name? *Immunological Reviews*, *283*(1), 7–20. https://doi.org/10.1111/imr.12652

Prigot-Maurice, C., Cerqueira de Araujo, A., Durand, S., Laverré, T., Pigeault, R., Verdon, J., Bulet, P., Beltran-Bech, S., & Braquart-Varnier, C. (2019). Survival capacity of the common woodlouse *Armadillidium vulgare* is improved with a second infection of *Salmonella enterica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *168*(August), 107278. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107278

Prigot-Maurice, C., Cerqueira De Araujo, A., Noûs, C., Beltran-Bech, S., & Braquart-Varnier, C. (2020). Datasets of "Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between *Armadillidium vulgare* and *Salmonella*". Mendeley Data, V1, https://doi.org/10.17632/6myn7xp5d2.1. https://data.mendeley.com/datasets/6myn7xp5d2/draft?a=7ed556a6-6d5f-4130-875c-5391b92b947b

Rancès, E., Ye, Y. H., Woolfit, M., McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2012). The relative importance of innate immune priming in *Wolbachia*-mediated dengue interference. *PLoS Path*, *8*(2), e1002548. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548

Ranjard, L., & Richaume, A. (2001). Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Research in Microbiology*, *152*, 707–716. https://doi.org/10.1053/j.trap.2011.06.002

R Core Team, (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. *https://www.R-project.org/*,

Rheins, L. A., & Karp, R. D. (1985). Effect of gender on the inducible humoral immune response to honeybee venom in the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Developmental and Comparative Immunology*, *9*(c), 41–49. https://doi.org/10.1016/0145-305X(85)90058-8

Rigaud, T., & Juchault, P. (1993). Conflict Between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod. *Genetics*, *252*(i), 247–252.

Rigaud, T., Juchault, P., & Mocquard, J. (1997). The evolution of sex determination in isopod crustaceans. *BioEssays*, *19*(5), 409–416. https://doi.org/10.1002/bies.950190508

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. *Genetics Selection Evolution*, *BioMed Central*, *24*(1), 3–18. https://doi.org/10.1186/1297-9686-24-1-3

Roberts, K. E., & Hughes, W. O. H. (2014). Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Jounral of Invertebrate Pathology*, *121*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.06.004

Rolff, J. (2001). Effects of age and gender on immune function of dragonflies (Odonata, Lestidae) from a wild population. *Canadian Journal of Zoology*, *79*(12), 2176–2180. https://doi.org/10.1139/cjz-79-12-2176

Rolff, J. (2002). Bateman's principle and immunity. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *269*(1493), 867–872. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.1959

Rottschaefer, S. M., & Lazzaro, B. P. (2012). No effect of *Wolbachia* on resistance to intracellular infection by pathogenic bacteria in Drosophila melanogaster. *PLoS One*, *7*, e40500. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040500

Scarborough, C. L., Ferrari, J., & Godfray, H. C. J. (2005). Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science*, *310*(5755), 1781. https://doi.org/10.1126/science.1120180

Sheldon, B. C., & Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: Costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *11*(8), 317–321. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2

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. https://doi.org/10.1007/s00114-010-0699-2

Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect Immunity: An Evolutionary Ecology. *Perspective*, *32*, 1–48. https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7

Sompayrac, L. (2019). *How the immune system work*. John Wiley & Sons.

Stanley, D. (2012). Aging and immunosenescence in invertebrates. *Biological Control of Insects Research Laboratory*, *9*(1), 102–109.

Tate, A. T., & Rudolf, V. H. W. (2012). Impact of life stage specific immune priming on invertebrate disease dynamics. *Oikos*, *121*(7), 1083–1092. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19725.x

Taylor, K., & Kimbrell, D. (2007). Host Immune Response and Differential Survival of the Sexes in *Drosophila*. *Fly*, *1*(4), 197–204. https://doi.org/10.4161/fly.5082

Teixeira, L., Ferreira, Á., & Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, *6*(12), e1000002. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002

Therneau, T. M., Grambsch, P. M., & Pankratz, V. S. (2003). Penalized survival models and frailty. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, *12*(1), 156–175. https://doi.org/10.1198/1061860031365

Thiel, M. (2003). Extended parental care in crustaceans - An update. *Revista Chilena De Historia Natural*, *76*, 205–218. https://doi.org/10.4067/S0716-078X2003000200007

Tidbury, H. J., Best, A., & Boots, M. (2012). The epidemiological consequences of immune priming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1746), 4505–4512. https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1841

Torsvik, V., Goksøyr, J., & Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(3), 782–787. https://doi.org/10.1128/AEM.56.3.782-787.1990

Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M.-H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., La Camera, S., Moumen, B., Greve, P., Bouchon, D., Berjeaud, J.-M., & Braquart-Varnier, C. (2016). Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Frontiers in Microbiology*, *7*(SEP), 1484https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01484

Viegas, S. C., Mil-Homens, D., Fialho, A. M., & Arraiano, C. M. (2013). The virulence of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(19), 6124–6133. https://doi.org/10.1128/AEM.02044-13

Vinogradov, A. E. (1998). Male reproductive strategy and decreased longevity. *Acta Biotheoretica*, *46*(2), 157–160. https://doi.org/10.1023/A:1001181921303

Vogelweith, F., Körner, M., Foitzik, S., & Meunier, J. (2017). Age, pathogen exposure, but not maternal care shape offspring immunity in an insect with facultative family life. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12862-017-0926-y

Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., & Hoffmann, A. A. (2011). The *w*Mel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, *476*(7361), 450–453. https://doi.org/10.1038/nature10355

Warburg, M. R. (2011). Cost of breeding in oniscid isopods: A partial review. *Crustaceana*, *84*(12–13), 1561–1580. https://doi.org/10.1163/156854011X607006

Warburg, M. R., Llnsenmair, K. E., & Bercovitz, K. (1984). The effect of climate on the distribution and abundance of isopods. *Symposia of the Zoological Society of London*, *53*(53), 339–367. https://doi.org/10.1108/eb003826

Weiss, B. L., Maltz, M., & Aksoy, S. (2012). Obligate symbionts activate immune system development in the tsetse fly. *The Journal of Immunology*, *188*(7), 3395–3403. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103691

Werren, J., Baldo, L., & Clark, M. (2008). *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 741–751. https://doi.org/10.1038/nrmicro1969

Ye, Y., Woolfit, M., Rancès, E., O'Neill, S., & McGraw, E. (2013). *Wolbachia*-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(8), e2362. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002362

Yourth, C., Forbes, M., & Baker, R. (2002). Sex differences in melanotic encapsulation responses (immunocompetence) in the damselfly *Lestes forcipatus Rambur*. *Canadian Journal of Zoology*, *80*(9), 1578–1583. https://doi.org/10.1139/z02-159

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Cybèle P-M, de Araujo Alexandra C, Sophie B-B, Christine B-V. Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between *Armadillidium vulgare* and *Salmonella*. *J Evol Biol*. 2020;00:1–14. https://doi.org/10.1111/jeb.13721

DOCUMENTS SUPPLÉMENTAIRES

Curriculum Vitae



Cybèle Prigot-Maurice

2 mars 1994

CONTACT

Lieu dit La Bodineau
86300 PAIZAY-LE-SEC

06.61.47.88.66
cybele.prigot@univ-poitiers.fr

https://ebi.labo.univ-poitiers.fr/membres/cybele-prigot-maurice-ees/

https://www.researchgate.net/profile/Cybele-Prigot-Maurice

NIVEAU D'ANGLAIS

TOEIC (2018):

Listening : 390
Reading : 365
Score : 755

CERTIFICATS

Permis de conduire (2012)

BAFA (2012)

PSC1 (2016)

PARCOURS UNIVERSITAIRE

2021-2022 | Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche
Université de Poitiers (86) ; CNRS UMR 7267

2018-2021 | Doctorat – Priming immunitaire chez *A. vulgare*
Université de Poitiers (86) ; CNRS UMR 7267

2016-2018 | Master – Biologie, Écologie, Évolution
Université de Poitiers (86) – mention bien – rang : 1/42 (M1) et 1/13 (M2)

2015-2016 | Licence – Écologie et Biologie des Organismes
Université de Poitiers (86) – mention très bien – rang : 1/49 (L3)

2012-2015 | Licence – Biologie Générale, Science de la Terre et de l'Univers
Université de Poitiers (86) – mention bien – rang : 1/19 (L3)

STAGES DE FORMATION

Stage M2| Plasticité phénotypique et rayonnements gamma chez *C. elegans*
Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
Commissariat à l'Énergie Atomique – Cadarache (13) – 6 mois (2018)

Stage M1| Microbiote intestinal et immunité chez *F. auricularia*
Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte
Université de Tours (37) ; CNRS UMR 7261 – 2 mois (2017)

Stage L3| Relation hétérozygotie et fitness chez *A. vulgare*
Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions
Université de Poitiers (86) ; CNRS UMR 7267 – 2 mois (2016)

Stage L3| Médiation et protection de la petite faune sauvage
Ligue pour la Protection des Oiseaux
Centre de soins de Rosheim (67) – 1 mois (2015)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Prigot-Maurice, Depeux et al., 2021. Immune priming in *A. vulgare* against *Salmonella* : direct or indirect costs on life history traits?. Date de soumission : 28.10.21

Prigot-Maurice et al., 2021. Why and how do protective symbionts impact immune priming with pathogens in invertebrates? *Developmental and comparative immunology* -10.1016/j.dci.2021.104245

Prigot-Maurice et al., 2020. Immune priming depends on age, sex and *Wolbachia* in the interaction between *A. vulgare* and *Salmonella*. *Journal of evolutionary biology* - 10.1111/jeb.13721

Ronai et al., 2020. « Microbiota, symbiosis and individuality » summer school meeting report. *Microbiome* - 10.1186/s40168-020-00898-7

Prigot-Maurice et al., 2019. Survival capacity of the common woodlouse *A. vulgare* is improved with a second infection of *Salmonella enterica*. *Journal of Invertebrate Pathology* - 10.1016/j.jip.2019.107278

FORMATIONS

Dans le cadre de l'école doctorale :

- Histoire des sciences
- Éthique et intégrité scientifique
- Microscopie électronique
- Réalité virtuelle en enseignement
- La relation pédagogique
- Enseigner en jouant
- Utiliser les biomolécules en santé humaine

Plateforme Image UP:

- Analyse de données Cytométrie en flux

RESPONSABILITÉ

Représentante des doctorants au conseil scientifique du laboratoire
Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions
Université de Poitiers (86) ;
CNRS UMR 7267 – 2 ans
(2019-2021)

AUTRES

- Participation à la fête de la science 2018-2019 (École de l'ADN, Poitiers)
- Interview sur le doctorat par des lycéens
- Table ronde des métiers pour les étudiants de L3
- Journée porte ouverte Université de Poitiers (présentation des parcours)

ACTIVITÉ D'ENSEIGNEMENT

2019-2021 | DCACE
Département de Biologie des Organismes et des Populations (BOP)
Université de Poitiers (86)

Biologie évolutive – Master 1 – 4h – Cours Magistraux
Introduction à la biologie évolutive du développement (evo-devo)

Biostatistiques – Master 1 – 28h – Travaux pratiques
Statistiques inférentielles et manipulation de jeux de données sur R

Systèmes symbiotiques – Master 2 – 16h – Travaux pratiques
Effets de l'âge et du genre sur l'immunité de *A. vulgare*

Évolution des organismes – Licence 3 – 20h – Travaux pratiques
Dissection de la grenouille et corrections des copies

Organismes et milieux – Licence 1 – 48h – Travaux dirigés
Introduction au comportement animal et lutte biologique

Diversité du vivant – Licence 1 – 48h – Travaux pratiques
Adaptations des membres chiridiens à la locomotion

CONGRÉS & PRÉSENTATIONS

11th International Symposium on Terrestrial Isopod Biology – (2021)
Prix de la 4ème meilleure présentation de Poster (Poster 2, ci-après)
Réduction de 50% pour publication dans Zookeys (article soumis le 28.10.21)
Prix n°1 du concours photos
Université d'Iraklion, Grèce (visioconference)

53rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology
Présentation orale (2021) – Prix de la meilleure présentation de la division :
https://drive.google.com/file/d/1anSjuKZxd0e2ZMV75-YD6op2NYuQCt1X/view?usp=sharing
Courte biographie en cours d'édition dans la newletter du **SIP**
Université de Tours et Guanajuato, Mexico (visioconference)

Insects : Infection & Immunity – Présentation orale (2020)
Brève description dans le bulletin Atenna Vol. 44, 2020 :
https://drive.google.com/file/d/1adxT8H9r1fWwGnfzgj4kTKiRY_n1v1vZ/view?usp=sharing
Royal Entomological Society de Cambridge, Angleterre (visioconference)

Séminaire d'équipe – Présentations orales (2019, 2020)
Université de Poitiers ; Université de Tours, France

Summer School: Microbiota, Individuality and Symbiosis (2019)
Présentation orale, discussions et publication d'un article de synthèse (2020)
ERC IDEM – Immunology from Concept and Exeriments to Translation
Université de Bordeaux – CNRS UMR 5164, France

Microbiology and Immunology Meeting – Présentation orale (2019)
Université de Poitiers ; CNRS UMR 7267, France

REID + IMMUNINV – Présentation orale (2019)
Université de Montpellier, France

6th Young Natural History Scientist's Meeting – Poster 1 ci-après (2019)
Museum National d'Histoire Naturelle - Paris, France

Ronai *et al. Microbiome* (2020) 8:117
https://doi.org/10.1186/s40168-020-00898-7

Microbiome

MEETING REPORT Open Access

"Microbiota, symbiosis and individuality summer school" meeting report

Isobel Ronai[1†], Gregor P. Greslehner[2*†], Federico Boem[3†], Judith Carlisle[4†], Adrian Stencel[5†], Javier Suárez[6†], Saliha Bayir[7], Wiebke Bretting[2], Joana Formosinho[8], Anna C. Guerrero[9], William H. Morgan[10], Cybèle Prigot-Maurice[11], Salome Rodeck[12], Marie Vasse[13], Jacqueline M. Wallis[14] and Oryan Zacks[15]

Abstract

How does microbiota research impact our understanding of biological individuality? We summarize the interdisciplinary summer school on "Microbiota, symbiosis and individuality: conceptual and philosophical issues" (July 2019), which was supported by a European Research Council starting grant project "Immunity, DEvelopment, and the Microbiota" (IDEM). The summer school centered around interdisciplinary group work on four facets of microbiota research: holobionts, individuality, causation, and human health. The conceptual discussion of cutting-edge empirical research provided new insights into microbiota and highlights the value of incorporating into meetings experts from other disciplines, such as philosophy and history of science.

Keywords: Microbiome, Holobiont, Hologenome, Philosophy of biology, History of biology, Downward causation, Ecology, Conceptual analysis, Holistic, Physiological individuals

Introduction

The "Microbiota, symbiosis and individuality: conceptual and philosophical issues" interdisciplinary summer school (1–5 July 2019) in Biarritz (France) explored how microbiota research impacts our conception of biological individuality. The summer school brought together twenty early career researchers and six world-leading experts, across multiple disciplines (biology, philosophy of science, and history of science), with an interest in microbiota and individuality (Fig. 1). This gathering was funded by the European Research Council through a Starting Grant to Thomas Pradeu for the project "Immunity, DEvelopment and the Microbiota—Understanding the Continuous Construction of Biological Identity" (IDEM).

In light of the microbiota "revolution," there is increasing recognition that the construction of biological identity includes a dynamic dialog with an organism's microbiota and is dependent on environmental factors [1–5]. A re-examination of biological identity and individuality is therefore needed. How are biological identity and individuality constructed, what kind of phenomena are they, and what are the implications for science and biomedicine [6–8]? A fruitful way to inform biological and biomedical discourse is to engage philosophers and historians of science with the empirical research [9, 10]. Philosophers and historians of science can act as "productive disrupters," by embedding scientific research in its socio-historical context, offering conceptual analysis of ongoing research, bridging between different knowledge domains, tracing and revealing underlying ontological commitments, and articulating the consequences of alternative epistemologies.

The goals of the summer school were to (i) examine working definitions of the terms used in microbiota

*Correspondence: gregor.greslehner@gmail.com
†Isobel Ronai, Gregor P. Greslehner, Federico Boem, Judith Carlisle, Adrian Stencel and Javier Suárez contributed equally to this work.
[2]ImmunoConcept, UMR5164, CNRS & University of Bordeaux, 146 Rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

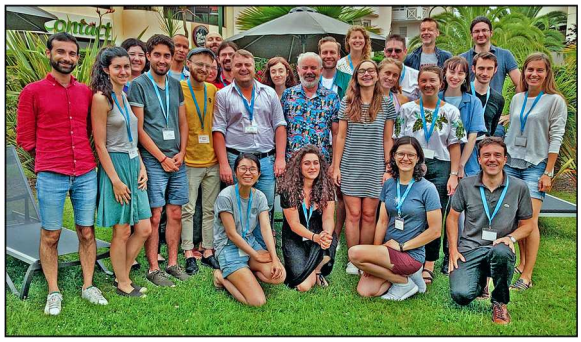


Fig. 1 All participants of the summer school. Front row (*from left to right*): Linh-Phuong Nguyen, Cybèle Prigot-Maurice, Jacqueline M. Wallis, Thomas Pradeu. Back (*from left to right*): Guglielmo Militello, Marie Vasse, Isobel Ronai, Javier Suárez, Matt Sims, William H. Morgan, Joana Formosinho, Federico Boem, Gregor P. Greslehner, Adrian Stencel, Saliha Bayir, Scott Gilbert, Malthe Kouassi Bjerregaard, Oryan Zacks, Judith Carlisle, Anna C. Guerrero, Rob Knight, Jan Pieter Konsman, Alice Beck, Salome Rodeck, Quentin Hiernaux, Johannes Martens, Wiebke Bretting

research; (ii) clarify the exact sense of the terms "individuality" and "identity," including how they are impacted by microbiota research; (iii) clarify which domains of the biological sciences, medical sciences, and humanities can be combined to catalyze exploration of connections between microbiota and individuality questions; and (iv) generate future interdisciplinary collaborations on the topic of microbiota.

The potential disciplinary barriers among participants from different academic backgrounds required the summer school to be carefully structured. The meeting consisted of an interdisciplinary reading list, plenary lectures by the six course leaders (summarized in Table 1) and participant-driven interdisciplinary group work. Each group explored a particular facet of microbiota research: holobionts, individuality, causation, and human health. Our meeting report focuses on the open questions that arose for each of these four topics, as well as the tentative answers offered in response to these questions. We showcase interdisciplinary movements of thinking, which we believe will be helpful for advancing microbiota research.

Microbiota and the holobiont: can we understand the holobiont in isolation from its ecological boundaries?

"Holobiont" is a biological concept that has received considerable attention. However, its definition is highly contested and somewhat convoluted, casting doubt on its theoretical or practical usefulness. The concept can be defined as "an association comprised of the macroscopic host and synergistic interdependence with bacteria, archaea, fungi, and numerous other microbial and eukaryotic species" (Table 1 Bosch's lecture; [11]). The holobiont concept aims at emphasizing the importance of symbiotic relationships for an organism. Being more than the sum of its parts, as one participant group argued, the holobiont is a totality of complex relationships between different biological entities [8].

A major problem with the concept of the holobiont is how to determine its ecological boundaries: should the holobiont encompass the host plus the totality of its microbes, or are the microbes part of the environment of the host? To answer this question, one participant group examined different case studies from research into symbioses. For example, the symbiosis of the Hawaiian bobtail squid (*Euprymna scolopes*) and bacteria *Vibrio fischeri* enable the holobiont to have a light organ [12]. Another example comes from coral holobionts [13, 14]. Soft corals, such as *Leptogorgia alba*, rely on bacterial symbionts as a defense against pathogenic fungi [15]. When *L. alba* feeds at night, it is susceptible to pathogenic fungi and the bacterial symbiont *Pseudoalteromonas* sp. produce antimycotic molecules that protect the holobiont, but only under low-light conditions [16]. These examples suggest that the holobiont's microbiota can be seen as adapted to the environment along with the host, and the holobiont concept opens up new ways of thinking about the nature of organisms and their boundaries.

There is a complex relationship between the microbial cells that compose the microbiome, and their host cells, from which they diverge genetically [1, 11]. The emerging consensus is that symbiotic microbes function in a similar way to host cells rather than as an aspect of the external environment, because they perform functions that were previously ascribed only to host cells. For example, microbiota allowed the evolution of herbivory through specialized digestion (Table 1 Gilbert's lecture; see also [4, 22]) and microbiota facilitate functionality of the immune system (Table 1 Pradeu's lecture; see also [17]). Importantly, this happens regardless of the genetic difference between host cells and microbial cells. Both examples, therefore, underscore the importance of the holobiont concept as a guiding research tool in contemporary biology.

Thus, using the holobiont concept as only a shorthand for a "multicellular host plus its microbes" limits its potential, if the interactions between these elements are not taken into account too. The most important features of the concept are its power to render tangible the fundamental interdependence of all living beings and complexity of organismic life. The history of science teaches us that some biological concepts might be distorted or misunderstood but still have a positive impact on research by generating progressive research methods [34, 35]. The emerging field of holobiont research highlights the benefits of a holistic understanding of life and its research methods study the holobiont in its entirety.

Table 1 Plenary lectures from course leaders

Presenter, affiliation	Lecture title	Description	Associated references
Thomas Pradeu, The French National Center for Scientific Research and University of Bordeaux (France)	Microbiota and microbiome: a conceptual analysis	Pradeu asked "what do we mean by microbiota?" and pointed out there is no single answer. He also argued that our understanding of microbiota impacts our conception of individuality. Examining the history, meaning, and impact of the microbiota is important when making ontological and epistemological claims concerning individuality.	[2, 17]
	Interactions between the microbiota and the immune system: an immunological point of view on biological individuality	Pradeu highlighted how the function of the immune system has been reconsidered in light of microbiota research. The immune response should be thought of as a dynamic equilibrium, regulated by activating and inhibitory signals as a function of the ecological context and the encountered microbes. Pradeu proposed a physiological individual as a unit of functioning, composed of the host and its microbiota, where the immune system plays a crucial role in the unification of this plurality.	[5, 18–20]
Scott Gilbert, Swarthmore College (USA) and University of Helsinki (Finland)	Developmental symbiosis and the mapping of novel evolutionary trajectories	Gilbert argued that all metazoans have microbial symbionts and these are important, sometimes essential, for normal animal development and organ generation. For example, the gut of cows has been transformed by symbionts and led to the emergence of their herbivory diet. The close association of organisms and their microbiota therefore opens novel evolutionary trajectories. Organisms have been formed by symbiotic interactions and these close associations open novel evolutionary trajectories.	[4, 21, 22]
Johannes Martens, University Catholique of Louvain (Belgium)	Biological individuality: a conceptual analysis	Martens provided philosophical context for the concept of biological individuality. He distinguished it from other concepts, such as unity, and argued that questions of individuality primarily involve singling out the properties that make an individual distinct. Productive theorizing about individuality does, of course, require considering individuals themselves, but it also involves considering their parts, as well as the collectives they form.	[23, 24]
	Fraternal vs. egalitarian transitions in individuality: two processes, one concept?	Martens argued that there are two concepts associated with transitions in biological individuality. First, fraternal transitions involve a transition in Darwinian individuality (e.g., multicellularity and insect colonies). Second, egalitarian transitions involve a transition in organismality, where the entities share a dependence and mutual benefit (e.g., the eukaryotic cell). The identification of two concepts for major transitions is helpful for exploring the influence of holobionts on evolution at multiple levels of biological organization.	

Table 1 Plenary lectures from course leaders. *(Continued)*

Jan Pieter Konsman, The French National Center for Scientific Research and University of Bordeaux (France)	Barriers and obstacles in relation to microbiota's host effects	Konsman argued that we ought not confuse the existence of a functional "axis" between the microbiota, host gut, and host brain with the presence of precise mechanistic interactions between the organisms involved in this axis (which remain largely unconfirmed). The biological barriers have a dynamic nature and act more like borders, localized areas over which complex regulation and interaction occurs. Konsman concluded that methodologies and explanations must consider host organization and other higher-level features which can both inform and structure the reductionistic methodologies present in biology.	[25, 26]
Thomas Bosch, University of Kiel (Germany)	The holobiont imperative: towards a holistic understanding of complex life processes	Bosch argued that biology and medicine have historically focused on the host, missing the important role of the microbiota. Using his experimental work on the Hydra metaorganism as a model system for the evolution of biological complexity, Bosch concluded that the metaorganism perspective invites a more holistic and integrative account of an organism.	[11, 27, 28]
Rob Knight, University of California, San Diego (USA)	Beyond the tip of the iceberg: discovering millions more "human" genes in our microbiomes and their links to phenotype	Using his research investigating the impact of microbiota on human health, Knight argued that microbiota research needs to focus more on determining causal pathways, examining the transgenerational effects of microbiota and intervening on the microbiota. On the other hand, even without these possible advances, current microbiota research is already challenging classical philosophy of biology debates—including debates about phenotypes and evolution, as well as what counts as a unit of selection.	[29–33]

Microbiota and individuality: does microbiota research affect our understanding and definition of a physiological individual?

What counts as an individual is question-dependent as different research contexts have different ways of characterizing individuality (Table 1 Pradeu's lecture; Gilbert's lecture; [4, 17, 36]). Some of the suggested conceptions of biological individuality have been evolutionary, ecological, immunological, and developmental [9, 17, 37, 38]. Holobiont research presents a unique challenge to the traditional evolutionary conceptions of biological individuals. These traditional conceptions used a set of criteria based on biological terms such as heritability and selection [2], which seems to exclude holobionts. For example, Godfrey-Smith's oft-cited evolutionary account defines Darwinian individuals in terms of variation in heritable traits resulting in different reproductive advantages across generations [39]. There is a debate whether symbiotic relationships between organisms and their microbiota satisfy the evolutionary criteria for individuality because they often fail to collectively show variation, heritability, and differences in reproductive success [40–43].

Holobionts appear intuitively "individualistic" because its constituent organisms often cannot survive without one another, and they are structurally, metabolically, developmentally, and immunologically integrated. Thus, holobionts may constitute a new conception of biological individuality. The need for a functionally relevant term to capture the holobiont as a well-delineated and cohesive unit led a participant group to propose that holobionts are physiological individuals (Table 1 Martens' lecture). A physiological individual is characterized by the functional integration of metabolism and immune activities.

It is difficult to successfully characterize what entities are "physiological individuals." Some definitions seem to either exclude entities that should be physiological individuals (for example, plants) or include entities that are not physiological individuals (for example, biochemical

processes in a lab setting) [9, 17]. The participant group defined the most basic form of physiological individuality in order to relate other biological entities to this basic form in a scalar fashion. A minimal model has only the essential ingredients of a living organism, while it maintains separateness and coherence within its environment. An example of the most basic form of physiological individuality is Gánti's chemoton [44], his criteria include:

1. A semi-permeable barrier in the form of a membrane, which acts as a minimal form of an interface with the environment and defense (filtering over entry);
2. A self-sustaining metabolic cycle; and
3. Heredity of information with the potential for variation in the form of genes.

The chemoton is meant to describe a hypothetical minimal form of life, and because the description of physiological individuality is scalar, the minimal model can be used in a variety of biological contexts and applied to a wide variety of organisms.

The chemoton can be placed at the center of a "physiological individuality spectrum," as an ideal but theoretical model of coherence and functional unity. The organisms that most closely show this coherence are single-celled organisms, although they are still highly interconnected with other entities in their environments. The more complex organisms become, the more they tend to "outsource" or engage in relationships of interdependence with other organisms (outside of their own membrane). If Gánti's model is taken as a paradigm, holobionts no longer meet the minimal criteria for physiological individuality because their barriers become more diffuse, and they interact with other species for metabolism and heredity. In addition, biofilms and symbionts are not counted as physiological individuals due to increasingly "open" barriers. At the other end of the continuum are entities such as viruses, which are highly dependent on other organisms for both metabolic and hereditary processes. The multi-cellular world can therefore be understood as a continuum of interacting organisms displaying different degrees of separateness and interdependence (Fig. 2). A minimal model approach avoids worries about both anthropocentrism and disciplinary isolationism [17, 45].

It is important to note that individuality can be conceived at multiple scales of the biological hierarchy. For example, in a holobiont the relationship between a host and its microbes is intimate, but in an organism the relationship of a cell and its mitochondria can be considered more intimate still. The placement of an entity on the hierarchy of life can help predict consequences of an unraveling of relationships, such as the degree of interdependence we expect to find between its component parts.

Microbiota and causation: should microbiota research consider downward causation?

Contemporary research suggests that the microbiota have a substantial influence on their multicellular hosts, including host physiology and host immunology (Table 1 Pradeu's lecture; Bosch's lecture; [46]). These findings have led biologists to attribute to the microbiota an important causal role in host health, host development, and host evolution (Table 1 Knight's lecture; Gilbert's lecture; [47]). However, some biologists and philosophers of biology have persuasively argued that while certain findings show interesting correlations between the microbiota and certain host states, it is not clear that a causal relationship from the microbiota to the host exists [48–51]. Do causal claims in microbiota research require a healthy dose of skepticism?

The methods of microbiota research are usually coarse-grained. These methods are therefore not comparable to the traditional and standardized methods employed to establish causation in other research areas, such as biomedical research. Traditional methods to establish causation are grounded in designing interventions that show a direct connection between an entity and a phenomenon. For instance, one can experimentally show how a pathogen causes a disease using Koch's postulates [52, 53] or how microbiota affects the physiological functions of their host. While some microbiota therapies cure disease through the inoculation of "healthy" microbiota into "unhealthy" patients (for example, fecal transplantation; see "Microbiota and health" section), the level of analysis for microbiota research is not precise enough to establish a causal pathway as the agents (microbial taxa) that bring about the cure are never identified. Thus, the gold standard of establishing causation is not often met by microbiota research methods.

Given this issue of causation in microbiota research, one participant group discussed whether the tools of metaphysics might be useful. Metaphysics is the branch of philosophy dedicated to the study of the first principles of reality, including the study of the concept of "causation" and the different forms of causation that may exist in the world [54]. A metaphysical study of "causation" in microbiota research helped identify the type of causal relationships that exist.

One can distinguish two types of causation: downward (top-down) and upward (bottom-up). Biomedical research usually appeals to upward causation, referring to situations where a certain entity (for example, a molecule, a bacterium, a virus) is deemed responsible for provoking a phenomenon or activity at the systemic level of the organism (for example, a disease, a physiological process). Downward causation, on the other hand, refers to situations in which the activities at the systemic level of the organism are responsible for changes in the entities at

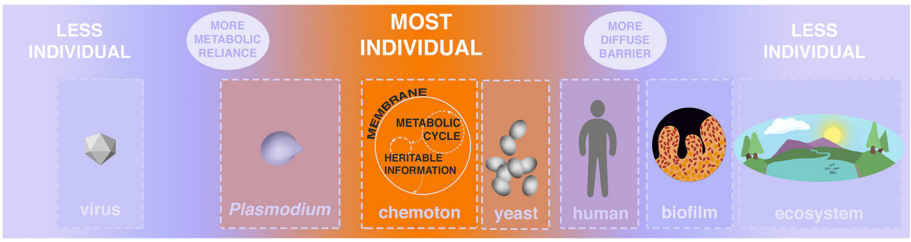


Fig. 2 The physiological individuality continuum. The center of the spectrum represents the theoretical paradigm individual, the "chemoton." Biological entities at the center are maximally individualistic in that they are less metabolically (or genetically) reliant on other organisms, and their barriers are minimally diffuse. As you move out from the center, biological entities become less individualistic, but for different reasons: biological entities on the left side of the spectrum lack individuality due to their metabolic (and/or genetic) reliance on other organisms. Biological entities on the right side of the spectrum lack individuality due to their diffuse barriers

lower levels of organization [55]. Some metaphysicians have claimed that downward causation occurs in scenarios where the system level generates physico-chemical constraints that significantly decrease the degree of freedom of their component parts [56–59]. A representative case of downward causation in biology is meiotic drive. In a normal process of cell division, it is expected that each allele will be transmitted in a 1:1 proportion. Meiotic drive, however, creates a constraint on cellular division by reducing the degree of freedom of certain alleles, so that the final distribution favors some alleles over others, and the proportion differs from 1:1. Therefore, certain situations in nature can be defined as cases of downward causation.

Microbiota research can be thought of in terms of downward causation. The system (holobiont) generates some constraints that reduce the degree of freedom of its components (microbiota). In this sense, a "healthy" holobiont (see "Microbiota and health" Section) would be one that generates constraints that reduce the exponential growth of the potential pathogens contained in it and, consequently, avoids their pathogenicity. Conversely, an "unhealthy" holobiont is one that fails to constrain pathogens. A more nuanced understanding of causation in microbiota research also shows that studying how the growth of a microbial taxon is constrained by its interactions within a holobiont is more helpful than studying the specific effect of a microbial taxon on a healthy holobiont (i.e., using Koch's postulates). Therefore, the tools of metaphysics provide an understanding of causation in microbiota research and are even helpful for designing new forms of intervention (see the "Future directions" section). A "healthy" holobiont and the development of microbiota-based therapeutics is feasible if the combinations of microbial taxa that constrain the growth of the pathogen are identified.

Microbiota and health: is human health a systemic property of the holobiont and does it matter for medical practice?

Human health is intimately intertwined with the ecology of a human's microbiota. One participant group proposed human health should be conceptualized as a property of the holobiont not just the human. A holobiont is a functional whole whose features are constituted by the relations that occur between its component parts (see "Microbiota and the holobiont" Section). Therefore, the human health needs to address both the systemic-ecological interactions (also known as "emergence", see "Microbiota and causation" Section) and individual component parts.

If the concept of the holobiont is transferred to a medical context, the current World Health Organization definition of health, as "a state of physical, mental, and social well-being and not merely the absence of disease or infirmity" [60] would therefore be better conceived of as a plural and systemic concept. Health factors are social, biological, cultural, and environmental factors, along with their dynamic interactions. These factors do not belong to a human individual, rather they arise from interactions. These interactions are systemic and ecological, since perturbing them will provoke systemic modifications, adjustments, or disruptions. The altered dynamics of the holobiont system are what, macroscopically, we call "health" and determines the pathological condition. Thus, a holobiontic perspective views human health as arising from complex, locally interactive human, and non-human systems, with multiple balance points occurring over time. Under this perspective, health and illness are not binaries but instead result from potentially overlapping properties of a locally dynamic system. The concept of the holobiont also leads us to modify our understanding of individuality (see "Microbiota and individuality" section). Clinical practice should not neglect the fact that "a

single individual" is actually a functional whole of different biomes.

If the holobiont is considered the therapeutic unit this would mean it is the privileged target of therapeutic actions. The manipulation of microbiota will require a serious reflection on manipulation criteria in experimental practice (see "Microbiota and causation" section) and perhaps should be more grounded in ecological knowledge principles [61, 62]. Ecological manipulation of the microbiota is likely to be totally different from traditional, mechanistic interventions and thus requires new theoretical and experimental accounts in order to be successfully employed.

The best case study of a therapeutic approach transitioning to a holobiont perspective is gastrointestinal disease, an infection with the bacteria *Clostridium difficile*. Traditionally, *C. difficile* infections were treated with antibiotics, whose non-discriminatory nature meant that the entire gut microbiota was broadly weakened, and this treatment had a low success rate in curing the disease [63, 64]. A more successful intervention is fecal microbiota transplantation, where fecal matter is taken from a healthy donor and transplanted into the patient [65–67]. This treatment is successful in curing *C. difficile* infections because it is a holobiont-based therapeutic intervention on the systemic-ecological interactions. A diverse gut microbiota can prohibit the invasion of particular (potentially pathogenic) microbial species under colonization resistance theory [68–70]. However, the causal pathways underlying the success of fecal microbiota transplantation are not yet well understood (see "Microbiota and causation" section). Additionally, large inter- and intra-patient variability means that a "healthy microbiota" for one individual is unlikely to be healthy for another [71–73]. A personalized medicine approach to the human microbiota is perhaps needed.

A holobiontic perspective has potential implications on the healthcare structures and practices that impact the systemic-ecological balance of patients. Hygiene practices in modern Western medicine have been based on the idea of an autonomous, delocalized human individual, which appears no longer adequate in light of the holobiont. A holobiontic perspective recognizes that a "sterile environment" is unsafe and ripe for colonization by microbial newcomers. So all microbes should not be removed, rather a protective balance of healthy microbiota ecology should be preserved [61]. The barriers to implementing a holobiont perspective are not just scientific and technological but also societal and cultural. For example, the public perception of microbes needs to be changed and conventional public expectations about sterile environments overturned. The frequently used war-like, host-centered language in medicine, such as "microbes as enemies," "war on X," and "fighting disease" (Table 1 Pradeu's lectures), should either be highly revised or abandoned.

Future directions

Microbiota research is changing our understanding of the ecological boundaries of holobionts and what it means to be an individual in terms of causation, physiology, and health. The cross-talk between biology and the philosophy/history of science will continue. We speculate about some of the future impacts on microbiota research here.

Microbiota research raises important questions concerning which species count as part of the holobiont (see "Microbiota and the holobiont" section). Should we consider the host and its microbiota to be a kind of whole, as some suggest [1, 11, 74], and commit ourselves to holistic thinking about holobionts? In this way, we would have to accept that holobionts constitute a genuine kind of biological unit and that they are non-reducible to the mere sum of their parts, insofar as they include the synergies between their components. Talking about the holobiont redirects biology's focus towards an understanding of nature as being fundamentally symbiotic.

We proposed a physiological individuality spectrum for biological entities, which relies primarily on Gánti's chemoton as an ideal model of coherence and functional unity (see "Microbiota and individuality" section). This spectrum allows us to highlight the ways that the holobiont is individualistic (e.g., structurally, metabolically, developmentally, and immunologically integrated) while recognizing that some holobionts may not be what has traditionally been called evolutionary individuals [75, 76]. We hope that placing holobionts on this spectrum will provide novel and testable hypotheses. For example, it could be that the degree of interdependence we find between a host and its component parts may be an indicator of the importance of this relationship to the survival of the holobiont as a whole. If so, we may be able to use this spectrum to predict and/or intervene on the consequences of unraveling relationships within a physiological individual or community. We believe that our notion of "physiological individuality" is best understood as one among many helpful theoretical conceptions of individuality. There are evolutionary individuals, physiological individuals, developmentally unified individuals, immunological individuals, and perhaps others. By identifying individuality as a pluralistic concept, we can describe the many varieties of individuality, we see in the biological hierarchy.

Our proposal of downward causation being important for microbiota research (see "Microbiota and causation" section) hopefully inspires new research questions. For example, does a healthy vaginal microbial community influence introduced microbes? The vagina is an acidic environment [77] due to bacteria such as *Lactobacillus sp.*

[78]. We hypothesize that if a random bacteria is introduced into a healthy vagina, they will either alter their gene expression to produce an acidifying compound or horizontally acquire a genetic component for the production of acids from the resident bacterial species. These types of experiments would provide substantial evidence for the existence of downward causation from the vaginal microbiota to some of the species of microorganisms that compose it.

A holobiont perspective entails re-conceptualizing the "therapeutic individual" as a more-than-human integrated unit, whose clinical identity is continuously constructed in dialog with its microbiota and environment, in contingent, localized dynamics (see "Microbiota and health" section). A better understanding of these dynamics is required and goes beyond the current mechanistic accounts used in biomedicine. Because ecologists study how perturbations reverberate unpredictably through dynamic ecosystems leading to unexpected outcomes, we propose that the hospitals of the future could include ecologists to use their expertise in designing system-level therapeutic interventions, as it has been argued that holobionts have some properties of ecosystems (e.g., [41, 79]). Therefore, as the holobiont is an object of inquiry that challenges current categories of scientific investigations and methodologies, we need new research areas aimed at investigating holobionts.

Conclusions

The summer school provided a productive platform for collaboration between researchers from different disciplinary backgrounds, all of whom shared an interest in the complex problems of microbiota. An interdisciplinary endeavor faces many challenges. For example, researchers from different disciplines do not have the same knowledge about a subject, which can make it difficult to find a common language and starting point. In addition, researchers have particular methodologies and ways of investigation, and working with someone from another discipline can be tricky. As a result, people tend to interact more with participants from the same disciplinary background. To promote interdisciplinary collaboration, the organizers of the summer school carefully selected participants: biologists with an interest in philosophy/history of science as well as philosophers/historians of science with an interest in biology.

The integration of science, philosophy of science and history of science is beneficial. Philosophy of biology can help biology [10, 80], and biological case studies are a great source of inspiration for philosophical and historical work. The products of the interdisciplinary participant group work were generally wider in scope and more appealing to a broad audience than the outcomes generated by a single discipline.

The novelty, complexity, and potency of microbiota research requires a global, interdisciplinary perspective when moving forward. To keep this flow of mutual inspiration, we need contexts and practices that link the scattered communities of the natural sciences and humanities. This summer school showed us one successful way to do so, and we hope that this "experiment" will be replicated in the future. There is great scope for productive cooperation, but it takes people equipped with the right tools and enthusiasm to open the door and invite researchers from disparate disciplines into the same room.

Acknowledgements
The authors wish to thank Thomas Pradeu, Wiebke Bretting, and William H. Morgan for organizing the conference and for their feedback on the manuscript. Thank you also to the course leaders (Thomas Pradeu, Scott Gilbert, Johannes Martens, Jan Pieter Konsman, Thomas Bosch, and Rob Knight), and all the participants of the summer school for their contributions. We also wish to thank two anonymous reviewers for their helpful comments and suggestions.

Authors' contributions
IR, GPG, FB, JC, AS, and JS were the major contributors in writing and revising this manuscript. SB, JF, ACG, CPM, SR, MV, JMW, and OZ helped draft the manuscript. WB and WHM were greatly involved in the creative process of designing the summer school and its topics, as well as coordination of writing efforts. Figure 2 by ACG, with input from OZ and JC. All authors read and approved the final manuscript. The authors' names are listed alphabetically with the exception of the first authors.

Authors' information
IR has a PhD in Biology and Philosophy of Biology. GPG has a PhD in Philosophy and a MSc in Molecular Biology. FB has a PhD in Foundations of the Life Sciences and their ethical consequences. JC is a current PhD student in Philosophy, Neuroscience, and Psychology and has a MA in Philosophy. AS is a current PhD student in Philosophy and has a MA in Biology. JS has a PhD in Philosophy of Biology. SB is a PhD student in Philosophy and has a MA in Philosophy and a BSc in Molecular Biology and Genetics. WB is a project manager and science communicator with a PhD in Genetics. JF has a MSc in Holistic Science and is currently a PhD Fellow at University of Copenhagen. ACG is a current PhD student in History of Biology and has a MS in Biology. WHM is currently a PhD student in Philosophy and has a MA in Philosophy. CPM is a current PhD student in Evolutionary Biology of Organisms and Populations (Invertebrate Immunology) and has a MA in Evolutionary Biology. SR is a current PhD Student in European Ethnology and holds a MA in Cultural Analysis. MV has a PhD in Evolutionary Biology. JMW has a MA in Philosophy of Biological and Cognitive Sciences and a BS in Cell and Molecular Biology. OZ is a current PhD student in Philosophy of Biology and has a MA in Neuroscience.

Funding
This project has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme – grant agreement no. 637647 – IDEM (P.I.: T. Pradeu).

Availability of data and materials
Not applicable.

Ethics approval and consent to participate
Not applicable.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Author details
[1] Columbia University, 1200 Amsterdam Ave, 10027 New York, NY, USA. [2] ImmunoConcept, UMR5164, CNRS & University of Bordeaux, 146 Rue Léo

Saignat, 33076 Bordeaux, France. [3]Dipartimento di Filosofia e Scienze dell'Educazione, Università degli Studi di Torino, Palazzo Nuovo, Via Sant'Ottavio, 20, 10124 Torino, Italy. [4]Washington University in St. Louis, Department of Philosophy, One Brookings Drive, 63130-4899 St. Louis, MO, USA. [5]Institute of Philosophy, Jagiellonian University, Grodzka 52, 33-332 Kraków, Poland. [6]Abteilung Philosophie, Universität Bielefeld, Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld, Germany. [7]Institut für Philosophie,Universität Kassel, Henschelstr. 2, 34127 Kassel, Germany. [8]Medical Museion, Department of Public Health, University of Copenhagen, Fredericiagade 18, 1310 Copenhagen, Denmark. [9]Arizona State University, Center for Biology and Society, 427 E Tyler Mall, 85281 Tempe, AZ, USA. [10]The University of Sheffield, Department of Philosophy, 45 Victoria Street, S3 7QB Sheffield, UK. [11]Université de Poitiers, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Bâtiment B35, 5 rue Albert Turpain, TSA 51106, 86073 Poitiers Cedex 9, France. [12]Leibniz Center for Literary and Cultural Research, Schützenstr. 18, 10117 Berlin, Germany. [13]Institute for Integrative Biology, ETH Zürich, Universitätstrasse 16, 8092 Zürich, Switzerland. [14]University of Bristol, Department of Philosophy, Cotham House, BS6 6JL Bristol, UK. [15]Sagol School of Neuroscience, Tel Aviv University, 6997801 Tel Aviv, Israel.

Received: 23 April 2020 Accepted: 24 July 2020
Published online: 14 August 2020

References

1. Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI. A symbiotic view of life: we have never been individuals. Q Rev Biol. 2012;87(4):325–41. https://doi.org/10.1086/668166.
2. Pradeu T. Organisms or biological individuals? Combining physiological and evolutionary individuality. Biol Philos. 2016;31(6):797–817. https://doi.org/10.1007/s10539-016-9551-1.
3. Doolittle WF, Booth A. It's the song, not the singer: an exploration of holobiosis and evolutionary theory. Biol Philos. 2017;32(1):5–24. https://doi.org/10.1007/s10539-016-9542-2.
4. Gilbert SF. Evolutionary transitions revisited: holobiont evo-devo. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2019;332(8):307–14. https://doi.org/10.1002/jez.b.22903.
5. Pradeu T. Philosophy of biology: immunology and individuality. eLife. 2019;8:47384. https://doi.org/10.7554/eLife.47384.
6. McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG, Carey HV, Domazet-Lošo T, Douglas AE, Dubilier N, Eberl G, Fukami T, Gilbert SF, Hentschel U, King N, Kjelleberg S, Knoll AH, Kremer N, Mazmanian SK, Metcalf JL, Nealson K, Pierce NE, Rawls JF, Reid A, Ruby EG, Rumpho M, Sanders JG, Tautz D, Wernegreen JJ. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. Proc Natl Acad Sci. 2013;110(9):3229–36. https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110.
7. Rees T, Bosch T, Douglas AE. How the microbiome challenges our concept of self. PLOS Biol. 2018;16(2):1–7. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005358.
8. Suárez J, Triviño V. What is a hologenomic adaptation? Emergent individuality and inter-identity in multispecies systems. Front Psychol. 2020;11:187. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00187.
9. Lidgard S, Nyhart LK. Biological individuality: integrating biological, historical, and philosophical perspectives. Chicago and London: The University of Chicago Press; 2017.
10. Laplane L, Mantovani P, Adolphs R, Chang H, Mantovani A, McFall-Ngai M, Rovelli C, Sober E, Pradeu T. Opinion: why science needs philosophy. Proc Natl Acad Sci. 2019;116(10):3948–52. https://doi.org/10.1073/pnas.1900357116.
11. Bosch TCG, Miller DJ. The holobiont imperative. Wien: Springer; 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1896-2.
12. Nyholm SV, McFall-Ngai M. The winnowing: establishing the squid–*vibrio* symbiosis. Nat Rev Microbiol. 2004;2(8):632–42. https://doi.org/10.1038/nrmicro957.
13. Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. The coral probiotic hypothesis. Environ Microbiol. 2006;8(12):2068–73. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01148.x.
14. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. Nat Rev Microbiol. 2007;5(5):355–62. https://doi.org/10.1038/nrmicro1635.
15. Moree WJ, McConnell OJ, Nguyen DD, Sanchez LM, Yang Y-L, Zhao X, Liu W-T, Boudreau PD, Srinivasan J, Atencio L, Ballesteros J, Gavilán RG, Torres-Mendoza D, Guzmán HM, Gerwick WH, Gutiérrez M, Dorrestein PC. Microbiota of healthy corals are active against fungi in a light-dependent manner. ACS Chem Biol. 2014;9(10):2300–8. https://doi.org/10.1021/cb500432j.
16. Carrier TJ, Reitzel AM. The hologenome across environments and the implications of a host-associated microbial repertoire. Front Microbiol. 2017;8:802. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00802.
17. Pradeu T. The many faces of biological individuality. Biol Philos. 2016;31(6):761–73. https://doi.org/10.1007/s10539-016-9553-z.
18. Pradeu T. Philosophy of immunology. Elements in the Philosophy of Biology. Cambridge: Cambridge University Press; 2020. https://doi.org/10.1017/9781108616706.
19. Pradeu T. The limits of the self: immunology and biological identity. Oxford; New York: Oxford University Press; 2012. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199775286.001.0001.
20. Pradeu T. What is an organism? An immunological answer. Hist Philos Life Sci. 2010;32(2-3):247–67.
21. Gilbert SF. Developmental symbiosis facilitates the multiple origins of herbivory. Evol Dev. 2020;22(1-2):154–64. https://doi.org/10.1111/ede.12291.
22. Chiu L, Gilbert SF. The birth of the holobiont: multi-species birthing through mutual scaffolding and niche construction. Biosemiotics. 2015;8(2):191–210. https://doi.org/10.1007/s12304-015-9232-5.
23. Martens J. L'évolution des organismes: Une perspective épistémologique. Paris: éditions MATERIOLOGIQUES; 2018.
24. Martens J. Organisms in evolution. Hist Philos Life Sci. 2010;32(2/3):373–400.
25. Hooks KB, Konsman JP, O'Malley MA. Microbiota-gut-brain research: a critical analysis. Behav Brain Sci. 2019;42:60. https://doi.org/10.1017/S0140525X18002133.
26. Hooks KB, Konsman JP, O'Malley MA. Causal clarity and deeper dimensions in microbiota-gut-brain research. Behav Brain Sci. 2019;42:80. https://doi.org/10.1017/S0140525X19000050.
27. Finlay BB, Pettersson S, Melby MK, Bosch TCG. The microbiome mediates environmental effects on aging. BioEssays. 2019;41(10):1800257. https://doi.org/10.1002/bies.201800257.
28. Deines P, Lachnit T, Bosch TCG. Competing forces maintain the *Hydra* metaorganism. Immunol Rev. 2017;279(1):123–36. https://doi.org/10.1111/imr.12564.
29. Cekanaviciute E, Yoo BB, Runia TF, Debelius JW, Singh S, Nelson CA, Kanner R, Bencosme Y, Lee YK, Hauser SL, Crabtree-Hartman E, Sand IK, Gacias M, Zhu Y, Casaccia P, Cree BAC, Knight R, Mazmanian SK, Baranzini SE. Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. Proc Natl Acad Sci. 2017;114(40):10713–8. https://doi.org/10.1073/pnas.1711235114.
30. Parks BW, Nam E, Org E, Kostem E, Norheim F, Hui ST, Pan C, Civelek M, Rau CD, Bennett BJ, Mehrabian M, Ursell LK, He A, Castellani LW, Zinker B, Kirby M, Drake TA, Drevon CA, Knight R, Gargalovic P, Kirchgessner T, Eskin E, Lusis AJ. Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. Cell Metab. 2013;17(1):141–52. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.007.
31. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet M-F, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. Cell. 2016;167(6):1469–8012. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018.
32. Sharon G, Cruz NJ, Kang D-W, Gandal MJ, Wang B, Kim Y-M, Zink EM, Casey CP, Taylor BC, Lane CJ, Bramer LM, Isern NG, Hoyt DW, Noecker C, Sweredoski MJ, Moradian A, Borenstein E, Jansson JK, Knight R, Metz TO, Lois C, Geschwind DH, Krajmalnik-Brown R, Mazmanian SK. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice. Cell. 2019;177(6):1600–817. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.004.
33. Vijay-Kumar M, Aitken JD, Carvalho FA, Cullender TC, Mwangi S, Srinivasan S, Sitaraman SV, Knight R, Ley RE, Gewirtz AT. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. Science. 2010;328(5975):228–31. https://doi.org/10.1126/science.1179721.
34. Laudan L. A confutation of convergent realism. Philos Sci. 1981;48(1):19–49. https://doi.org/10.1086/288975.

35. Griffiths P, Stotz K. Genetics and philosophy: an introduction. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. https://doi.org/10.1017/CBO9780511744082.
36. Lloyd EA. Adaptationism and the logic of research questions: how to think clearly about evolutionary causes. Biol Theory. 2015;10(4):343–62. https://doi.org/10.1007/s13752-015-0214-2.
37. Clarke E. The problem of biological individuality. Biol Theory. 2010;5(4):312–25. https://doi.org/10.1162/BIOT_a_00068.
38. DiFrisco J. Kinds of biological individuals: sortals, projectibility, and selection. Br J Philos Sci. 2019;70(3):845–75. https://doi.org/10.1093/bjps/axy006.
39. Godfrey-Smith P. In: Bouchard F, Huneman P, editors. From groups to individuals: evolution and emerging individuality. Cambridge, MA: MIT Press; 2013, pp. 17–36.
40. Moran NA, Sloan DB. The hologenome concept: helpful or hollow? PLOS Biol. 2015;13(12):1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311.
41. Douglas AE, Werren JH. Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. mBio. 2016;7(2):02099–15. https://doi.org/10.1128/mBio.02099-15.
42. Theis KR, Dheilly NM, Klassen JL, Brucker RM, Baines JF, Bosch TCG, Cryan JF, Gilbert SF, Goodnight CJ, Lloyd EA, Sapp J, Vandenkoornhuyse P, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, Bordenstein SR. Getting the hologenome concept right: an eco-evolutionary framework for hosts and their microbiomes. mSystems. 2016;1(2):00028–16. https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16.
43. Lloyd EA, Wade MJ. Criteria for holobionts from community genetics. Biol Theory. 2019;14(3):151–70. https://doi.org/10.1007/s13752-019-00322-w.
44. Gánti T. Chemoton theory: theoretical foundations of fluid machineries. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
45. Kaiser MI. Reductive explanation in the biological sciences. Cham: Springer; 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25310-7.
46. Kopac SM, Klassen JL. Can they make it on their own? Hosts, microbes, and the holobiont niche. Front Microbiol. 2016;7:1647. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01647.
47. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012;486:207–14. https://doi.org/10.1038/nature11234.
48. Hanage WP. Microbiology: microbiome science needs a healthy dose of scepticism. Nature. 2014;412(7514):247–8. https://doi.org/10.1038/512247a.
49. Fischbach MA. Microbiome: focus on causation and mechanism. Cell. 2018;174(4):785–90. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.038.
50. Lynch KE, Parke EC, O'Malley MA. How causal are microbiomes? A comparison with the *Helicobacter pylori* explanation of ulcers. Biol Philos. 2019;34(6):62. https://doi.org/10.1007/s10539-019-9702-2.
51. Bourrat P, Griffiths PE. Multispecies individuals. Hist Philos Life Sci. 2018;40(2):33. https://doi.org/10.1007/s40656-018-0194-1.
52. Neville BA, Forster SC, Lawley TD. Commensal koch's postulates: establishing causation in human microbiota research. Curr Opin Microbiol. 2018;42:47–52. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.001.
53. Ross LN, Woodward JF. Koch's postulates: an interventionist perspective. Stud Hist Phil Sci Part C Stud Hist Phil Biol Biomed Sci. 2016;59:35–46. https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2016.06.001.
54. van Inwagen P, Sullivan M Zalta EN, (ed). Metaphysics. Metaphysics Research Lab, Stanford University; 2018. https://plato.stanford.edu/archives/spr2018/entries/metaphysics/.
55. O'Connor T, Wong HY. The metaphysics of emergence. Noûs. 2005;39(4):658–78. https://doi.org/10.1111/j.0029-4624.2005.00543.x.
56. El-Hani CN, Emmeche C. On some theoretical grounds for an organism-centered biology: property emergence, supervenience, and downward causation. Theory Biosci. 2000;119(3):234–75. https://doi.org/10.1007/s12064-000-0018-0.
57. Malaterre C. Making sense of downward causation in manipulationism: illustrations from cancer research. Hist Philos Life Sci. 2011;33(4):537–61.
58. Mossio M, Bich L, Moreno A. Emergence, closure and inter-level causation in biological systems. Erkenntnis. 2013;78(2):153–78. https://doi.org/10.1007/s10670-013-9507-7.
59. Green S. Cancer beyond genetics: on the practical implications of downward causation. In: Brooks DS, DiFrisco J, Wimsatt WC, editors. Levels of Organization in the Biological Sciences. Cambridge, MA: MIT Press; 2020.
60. WHO Constitution. https://www.who.int/about/who-we-are/constitution. Accessed 07 Apr 2020.
61. Lemon KP, Armitage GC, Relman DA, Fischbach MA. Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. Sci Transl Med. 2012;4(137):137–51375. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004183.
62. Inkpen SA. Philosophy of biology: health, ecology and the microbiome. eLife. 2019;8:47626. https://doi.org/10.7554/eLife.47626.
63. Kouhsari E, Abbasian S, Sedighi M, Yaseri HF, Nazari S, Bialvaei AZ, Dahim P, Mirzaei EZ, Rahbar M. *Clostridium difficile* infection: a review. Rev Med Microbiol. 2018;29(3):103–9. https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000135.
64. Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. Nat Rev Microbiol. 2016;14(10):609–20. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108.
65. andCho Young-Seok CHH. Fecal microbiota transplantation: current applications, effectiveness, and future perspectives. Clin Endosc. 2016;49(3):257–65. https://doi.org/10.5946/ce.2015.117.
66. de Groot PF, Frissen MN, de Clercq NC, Nieuwdorp M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: history, present and future. Gut Microbes. 2017;8(3):253–67. https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1293224.
67. Wilson BC, Vatanen T, Cutfield WS, O'Sullivan JM. The super-donor phenomenon in fecal microbiota transplantation. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:2. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00002.
68. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. Immunology. 2013;138(1):1–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03616.x.
69. Litvak Y, Bäumler AJ. The founder hypothesis: a basis for microbiota resistance, diversity in taxa carriage, and colonization resistance against pathogens. PLOS Pathog. 2019;15(2):1–6. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007563.
70. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. Nat Rev Immunol. 2013;13(11):790–801. https://doi.org/10.1038/nri3535.
71. Borody TJ, Khoruts A. Fecal microbiota transplantation and emerging applications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2012;9(2):88–96. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244.
72. Wang S, Xu M, Wang W, Cao X, Piao M, Khan S, Yan F, Cao H, Wang B. Systematic review: adverse events of fecal microbiota transplantation. PLOS ONE. 2016;11(8):1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161174.
73. Zhang Z, Tang H, Chen P, Xie H, Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. Sig Transduct Target Ther. 2019;4(1):41. https://doi.org/10.1038/s41392-019-0074-5.
74. Suárez J, Triviño V. A metaphysical approach to holobiont individuality: holobionts as emergent individuals. Quaderns Filos. 2019;VI(1):59–76. https://doi.org/10.7203/qfia.6.1.14825.
75. Hull D. In: Keller EF, Lloyd EA, editors. Keywords in evolutionary biology. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1992, pp. 180–7.
76. Lloyd E Zalta EN, (ed). Units and levels of selection. Metaphysics Research Lab, Stanford University; 2020. https://plato.stanford.edu/archives/spr2020/entries/selectionunits/.
77. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology. 2004;150(Pt 8):2565–73. https://doi.org/10.1099/mic.0.26905-0.
78. Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, Foster JA, Forney LJ. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. ISME J. 2007;1(2):121–33. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.12.
79. Skillings D. Holobionts and the ecology of organisms: multi-species communities or integrated individuals? Biol Philos. 2016;31(6):875–92. https://doi.org/10.1007/s10539-016-9544-0.
80. Meincke AS, Dupré J, (eds.) Biological identity. Perspectives from Metaphysics and the Philosophy of Biology. London: Routledge; 2020.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

BILAN PERSONNEL



Lorsque j'ai commencé mon doctorat, il m'est souvent arrivé d'entendre mes interlocuteurs dire « tu fais un doctorat ? dis donc, quel courage ! », ce à quoi j'ai souvent répondu « ce n'est pas une question de courage, tout le monde serait capable de faire un doctorat, à partir du moment où les personnes sont passionnées par leur sujet ».

Aujourd'hui, je considère que ma réponse était erronée. Au-delà de ma passion pour la biologie, je me suis occupée de mes élevages de cloportes et j'ai préparé le matériel nécessaire à mes expériences. J'ai calculé mes plans expérimentaux et justifié toutes les techniques que j'ai utilisées. J'ai essayé de comprendre au mieux les analyses statistiques pour choisir celles que j'utiliserai pour mes résultats. Une fois les résultats obtenus, j'ai intégré une quantité phénoménale d'informations issues de la littérature pour comprendre mes propres résultats. J'ai accepté l'échec, car les expériences fonctionnent rarement dès la première tentative. Alors j'ai recommencé, et j'ai donc choisi de sacrifier des soirées, des week-end et parfois même des vacances pour mon doctorat. Une fois toutes ces tâches accomplies, j'ai proposé mes résultats pour publication dans des journaux scientifiques. J'ai donc rédigé, en anglais, toute la démarche scientifique que j'ai utilisée. J'ai fait la mise en page de l'article, les figures, les tableaux et les schémas explicatifs. Plusieurs fois, le journal a refusé mon article / demandé des résultats plus précis et des corrections. Alors j'ai recommencé les expériences, les analyses statistiques et j'ai amélioré la rédaction. J'ai aussi présenté oralement mes travaux durant des congrès, dont 1 en français et 4 en anglais. Mon doctorat ne s'est pas restreint à la recherche. Au début de ma deuxième année, j'ai accepté un contrat d'enseignement pour 2 ans de service. J'ai donc enseigné aux étudiants de licence et de master, des cours de biologie qui ne concernait pas mon sujet de thèse. J'ai appris et maîtrisé des domaines autres que le mien, et j'ai évalué les étudiants (rapports et oraux). En tant que doctorante, j'ai également effectué 90 heures de formations sur divers domaines pour valider mon diplôme.

Durant ma deuxième année de doctorat, la pandémie du covid-19 a commencée. Pendant le premier confinement, l'accès au laboratoire nous a été interdit pendant environ 2 mois. Les expériences qui étaient en cours à cette période ont été stoppées. Parmi elles, certaines ont été recommencées, d'autres abandonnées. À cause des restrictions sanitaires, les expériences ont pris du retard durant les semaines suivant le déconfinement. Le temps accordé pour venir au laboratoire était de quelques demi-journées par semaine. Certaines analyses normalement réalisables en 2 jours ont donc été donc effectuées sur 5 jours. Même si ce discours est dressé à la première personne, tous les devoirs et tous les obstacles d'un

doctorat sont les mêmes, voire pires encore, pour l'ensemble des doctorants en sciences expérimentales.

Alors oui, aujourd'hui je rectifierais ma réponse et je dirai « le doctorat m'a demandé beaucoup de courage et de persévérance, et même si j'adore la science, ce n'était pas qu'une question de passion ». Néanmoins, si tous les efforts fournis pour un doctorat ne sont pas seulement une question de passion, de quoi s'agit-il alors ?

Faire un doctorat, c'est apprendre l'ensemble des métiers de la recherche et comprendre comment la recherche fonctionne, en passant par toutes les étapes que j'ai citées précédemment. Le doctorat nous apprend la recherche par la recherche, et cette méthode est la plus formatrice qu'il puisse exister. Durant ces trois dernières années, j'ai appris des méthodes expérimentales de techniciens, d'ingénieurs d'études et de biostatisticiens. J'ai appris à enseigner et à développer des compétences de chercheur en biologie. J'ai compris que la recherche est un domaine difficile d'accès, qu'on se doit d'être des spécialistes. J'ai aussi compris que la recherche porte un rôle important dans la société et que sans recherches fondamentales, nous pouvons difficilement mener des recherches appliquées. Grâce au soutien de mes encadrantes, Christine et Sophie, j'ai développé mon esprit critique, ma rigueur et j'ai beaucoup appris de mes erreurs pour être plus performante les fois suivantes. J'ai donc appris à anticiper, à m'organiser, à porter les responsabilités de ce projet et le défendre tel qu'il est, en considérant ses forces, mais aussi ses faiblesses. Au-delà des compétences professionnelles que le doctorat m'a apportées, je sors personnellement grandie de cette expérience. J'ai appris à connaître mes propres défauts, mes qualités, la manière dont je surmonte les épreuves, mais aussi les limites de mes capacités. J'ai aussi pris conscience de l'immensité des connaissances acquises, et à quel point l'Homme est capable de décrypter des processus qui pourtant paraissaient inconcevables quelques dizaines d'années auparavant. Le doctorat n'a donc pas seulement forgé ma future carrière professionnelle, il a aussi forgé ma personnalité et surtout, ma vision du monde qui nous entoure.

Je terminerai ce manuscrit par une réflexion personnelle que je me suis souvent faite : dans la vie, tout est contexte dépendant. Les processus biologiques sont tellement variables que finalement, plus nous découvrons de nouvelles choses à leur sujet, plus nous mesurons leur complexité.