



HAL
open science

Caractérisation et rôle dans l'interaction tripartite du microbiote d'hôtes intermédiaires Planorbidae des parasites trématodes *Schistosoma* spp. agent responsable de la bilharziose

Camille Huot

► **To cite this version:**

Camille Huot. Caractérisation et rôle dans l'interaction tripartite du microbiote d'hôtes intermédiaires Planorbidae des parasites trématodes *Schistosoma* spp. agent responsable de la bilharziose. Parasitologie. Université de Perpignan, 2019. Français. NNT: 2019PERP0041 . tel-03506228

HAL Id: tel-03506228

<https://theses.hal.science/tel-03506228>

Submitted on 2 Jan 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par
UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA

Préparée au sein de l'école doctorale
Energie Environnement ED305

Et de l'unité de recherche
**Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement (IHPE)
UMR5244**

Spécialité : Biologie

Présentée par
Camille Huot

Caractérisation et rôle, dans l'interaction tripartite,
du microbiote d'hôtes intermédiaires Planorbidae
des parasites trématodes *Schistosoma spp.*, agents
responsables de la bilharziose

Soutenue le 25 Octobre 2019 devant le jury composé de

Mme. Christine BRAQUART-VARNIER, PR, UMR 7267

Mme. Claire VALIENTE MORO, MCF, UMR 5557

Mme. Sophie GAUDRIault, CR, UMR INRA 1333

M. Yves DESDEVISES, PR, UMR 7232

M. Benjamin GOURBAL, MCF, 5244

M. Jérôme BOISSIER, PR, UMR 5244

M. David DUVAL, MCF, UMR 5244

Mme. Eve TOULZA, MCF, UMR 5244

M. Richard GALINIER, IR, UMR 5244

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

Invité

À Gaby

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury, en particulier mes deux rapporteurs, Christine Braquart-Varnier et Claire Valiente-Moro, qui ont gentiment accepté d'évaluer ce manuscrit qui retrace mes trois ans de travail au cours de cette thèse. Merci également à Sophie Gaudriault et Yves Desdevises, qui m'ont accompagnée depuis la première année et ont pu constater l'évolution de mon travail. Vos conseils m'ont toujours été précieux, m'ont permis d'avancer et d'approfondir ma réflexion et c'est un grand plaisir pour moi de vous présenter l'aboutissement de ces trois années.

Merci à Jérôme Boissier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je me souviens encore de toi me proposant de me joindre à vous pour le déjeuner, lors de ma venue pour préparer le concours de l'ED. Ce fut le premier de tous les repas partagés ensemble, moments de discussions intenses sur le monde de la recherche, la politique, ou encore des stratégies de tes filles pour te faire tourner en bourrique et de la pire méthode de rupture.

Merci Benjamin pour ta présence au cours de ces trois ans, ta patience infinie et ta diplomatie. Tu as fait partie des initiateurs de mon projet de thèse et as été présent du début à la fin, par tes conseils, tes réponses à mes questions, ton soutien moral mais également financier (mais chut, il ne faut pas le dire).

Je tiens à remercier Jocelyne Pla et Emilie Vegara, qui a pris sa suite, pour leur aide dans les démarches administratives liées à la préparation du doctorat. Merci également à Nicolas Inguibert, qui a commencé son mandat de directeur de l'école doctorale en même temps que j'ai commencé ma thèse. Vous avez toujours été à l'écoute et avez été d'un grand soutien dans les difficultés administratives que j'ai pu rencontrer et dans le bon fonctionnement de l'association UPVDoc.

Richard, c'est dur de trouver les mots. Tu m'as tout de suite mise en confiance, avec ton accueil chaleureux et tes blagues graveleuses. Tu as très vite saisi ma personnalité, identifié mes insécurités et trouvé les mots pour me rassurer. Tu es une très belle personne, toujours disponible, très humaine, tu as su me montrer ta confiance en moi et tu as été un véritable pilier au cours de ma thèse. Je trouve très dommage que le projet virus ne soit pas allé plus loin car ça aurait été vraiment chouette à développer. Merci pour tout, merci de toujours écouter et comprendre, d'être si rassurant. Je ne pense pas être la première à te le dire, tu as un cœur d'or.

Eve et David. David et Eve. Deux personnalités très différentes qui de prime abord peuvent sembler difficiles à concilier. Et puis finalement, qui se complètent à merveille.

La première impression que j'ai eu de David, le seul que je vouvoie de tout le labo, a été plutôt négative, je n'oublierai jamais ce skype au cours duquel, tel l'élève dissipé vous regardiez mon dossier puis faisiez du coude à Richard en ricanant... l'angoisse. J'étais alors très intimidée, lors de mon passage pour la préparation du concours. Et puis finalement, sous l'apparence du méchant flic, du prof sévère, c'est un esprit rêveur, philosophique, avec une vision très large des sciences, de la recherche, ce sont des idées qui fusent dans tous les sens, parfois difficiles à comprendre lorsqu'elles sont écrites au fil de votre pensée. Mais les discussions qui suivaient alors m'ont toujours énormément apportée, ont aiguisé mon esprit critique, m'ont beaucoup appris. Et malgré votre humour tranchant, vos blagues piquantes (qui reflétaient quand même parfois un petit fond de vérité), vous avez toujours été à l'écoute, mesuré avec prudence mon niveau de stress (attention, risque d'explosion) et su réagir en conséquences. Votre tuvoisement et voutoisement vont beaucoup me manquer. Merci de l'attention que vous m'avez portée et

de toujours m'avoir soutenue. Merci d'avoir encadré cette thèse, plutôt éloignée de vos sentiers battus mais à laquelle vous avez su apporter une vision différente.

Il peut être difficile de composer avec ma personnalité qui peut parfois donner une impression d'immaturation et de manque d'intérêt et d'implication. C'est malheureusement, je pense, l'impression que j'ai pu te donner, Eve, au début de cette thèse. Et puis nous avons finalement compris le fonctionnement l'une de l'autre et nous sommes adaptées l'une à l'autre, ce qui a permis une communication bien plus facile et agréable. A partir de là, ton approbation et tes encouragements ont eu un sens très fort pour moi et m'ont incitée à avancer, toujours plus loin. Cette fin de thèse a été un accomplissement pour plusieurs raisons, et notamment parce tu m'as vraiment fait sentir que j'avais évolué. Ton esprit pragmatique et ton organisation ont canalisé mon énergie et m'ont rendue plus productive. Pour tes réponses, toujours rapides, qu'il s'agisse d'une demande professionnelle ou d'un appel au secours personnel, qui m'ont toujours permise de me relever, et ce malgré ton implication dans un million de projets, d'écriture de papiers, de gestion de plateforme, de réunions (ça te tente des bras supplémentaires ?)... un immense, merci.

Merci à l'ensemble des membres du labo qui m'ont accueillie parmi eux, avec qui j'ai aimé échanger, mention particulière aux représentants de l'Amérique du Sud, Cristian et Ronaldo, dont les accents chantants ont toujours ajouté un petit quelque chose aux conversations. Merci à Guillaume pour son accueil chaleureux au sein de l'unité. Merci à Camille garçon, Camillou pour les super nanas, pour tous tes conseils et explications, notamment en stats, le long de ma thèse. J'adresse également une pensée très forte à Jeff, *el experimentator*, le roi de la paillasse, toujours à l'écoute et prêt à rendre service malgré sa check-list quotidienne de cinq mètres de long... Merci à toi et bon courage, n'hésite pas à mettre les nouveaux doctorants à contribution pour t'aider, parce que sans toi et ton savoir-faire, on est bien peu de choses. Merci également à Cindy et Nat, pour votre gentillesse, votre patience et pour toutes ces pauvres petites bêtes que j'ai sacrifiées.

Justement, un grand merci à ces souris et ces escargots qui se sont bravement sacrifiés pour la science, j'ai encore la sensation des coquilles qui s'écrasent sous un pilulier dans la main... Ce souvenir me hantera...

Diane et Sylvie, sans vous, c'est bien simple, le labo s'effondrerait. Merci de votre efficacité toute professionnelle. Anne R., épillette aux doigts de fée qui retire les échardes comme personne, merci de ta patience également, d'avoir accepté de partager tes connaissances, merci pour ton sourire le matin quand je passais dans la salle du vivant pour aller au bureau, un petit rayon de soleil sur ces débuts de journée. Merci à toutes les trois pour ces petites pauses discussions et ces petites pauses café qui font du bien à la tête.

Merci à Philippe Douchet, stagiaire de M1 que j'ai eu le plaisir de co-encadrer. Merci pour ton travail, ta rigueur, ton implication et ton efficacité qui ont permis à l'axe trois de ma thèse de se faire.

Je m'adresse maintenant aux doctorants que j'ai pu croiser aux détours d'un couloir du laboratoire IHPE pendant ces trois ans. C'est assez impressionnant d'arriver, petite nouvelle, dans un bureau rempli de gens présents depuis si longtemps. Et pourtant, Anaïs, Silvain et Julien (Kinky), m'ont accueillie parmi eux, et supportée dans mes moments de crises (désolée pour ça Julien). Merci Anaïs d'avoir ouvert l'horizon de ma thèse et d'avoir été là pour répondre à mes questions, de m'avoir donné l'opportunité de participer à ton projet MicroBiomph. Marta, Martatchi, ma petite espingouine aux allures de diva et à la classe d'un camionneur, tu me manques, tu manques à ce vieux bâtiment R qui est bien froid et sombre sans ta présence

ensoleillée. Maintenant que la thèse se termine, Valencia, me voilà ! Merci Kelly, pour ta bonne humeur contagieuse, chaque fois qu'on se revoit, c'est comme si on s'était vu la veille. Damien, malgré tout, bon courage pour la suite. Stephen, mon voisin de bureau, ce fut ensuite ton tour de subir nos moments de folie, mais tes compétences vampiriques m'ont quand même suffisamment intimidées pour que je ne t'embête pas trop. Cette incroyable aptitude à supporter le pire avec le sourire m'a toujours impressionnée ! Chrystelle, notre interaction durable ne le fut pas tant (en même temps, tu as préféré partir trois mois au Texas pour ta thèse plutôt que de coévoluer avec moi, il faut savoir faire les bons choix !) mais fut toujours agréable. Je n'oublie pas non plus les Montpelliérains, Max & Etienne, le duo à l'humour affûté, PL, ses cannellonis végé bien épicés et ses leffes de vigne (chut, c'est un secret), Jean le canard-et-fier-de-l'être avec qui les échanges peuvent aller du constructif au totalement perché, ceux que je n'ai pas eu l'occasion de bien connaître, Daniel, Maurine, Janan... et ceux que j'aurais oublié par mégarde, merci à tous pour le petit truc que vous avez chacun apporté à cette expérience commune de vie qu'est la thèse et surtout, bon courage pour la fin de la thèse et surtout la suite de la vie (hé oui, il semble qu'il y ait un après !!!).

Une autre personne avec qui je ne m'attendais pas à m'entendre aussi bien c'est toi, Aude, qui, par ton arrivée impromptue à Perpignan, nous as offert l'opportunité de te connaître et de découvrir la belle personne que tu es. Merci pour tes conseils, de t'être toujours enquis de comment j'allais, de m'avoir toujours soutenue dans les différentes difficultés rencontrées. Ton oreille attentive et ton coaching sportif me manquent, vivement que la cheville se remette ! Merci pour la relecture et merci pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces deux ans de cohabitation.

Tout au long de ces trois années intenses, j'ai également eu la chance de rencontrer des personnes qui m'ont beaucoup apporté, qu'ils soient ou non dans la même galère. Je pense à la team Port-Aventura/JDR/LesGrandsBuffets/Barbecue/Bataille de bouffe/Jacuzzi/EtJ'enPasse, Nélia et Sylvain (à laquelle s'est rajouté Benjamin qui a su se faire adopter avec ses airs de nounours) : vous êtes des personnes vraiment super, j'adore passer du temps avec vous, ces moments de pause m'ont toujours fait du bien, et j'espère que vous saurez passer sur mes absences (maintenant c'est fini) et qu'on remettra ça !! La team UPVDoc, Margot, Minou, Sarah, J-R, Mathieu, cette collaboration, bien que parsemée d'obstacles, a été vraiment fructueuse, formatrice et très sympas, on en a vraiment fait quelque chose de cette asso (heureusement que Ramcène était là) ! La team soirées/Dub, Antoine, Noémie, Clément, Marie, Ariadna, Antho, ce fut un régal de vous rencontrer et de passer du temps avec vous, j'espère que nos routes continueront de se croiser de temps en temps, après la tempête.

Merci à toi, Marguerite, que j'ai re-découverte depuis ton arrivée à Perpignan, avec qui j'ai beaucoup partagé, et qui m'a aussi beaucoup soutenue. Tu es une personne généreuse et enthousiaste, mais également mordante et pragmatique, qui m'a apporté de la raison, de l'objectivisme et de la relativisation dans les moments difficiles, à présent il n'est pas rare que je me demande "à qui appartient le problème ?". Merci à toi aussi David, qui nous supportent, mes plaintes et moi, quand je viens chez vous, et dont la franchise permet aussi de relativiser sur ses malheurs.

J'adresse une pensée toute particulière aux Compagnons, toujours là même quand ils sont loin, Morgane en particulier, la fédératrice comme toujours. Pour ceux qui sont en thèse, Arthur, Adélie, Damien, Mathieu, courage à vous ! I'm back, les événements Compagnons se verront de nouveau honorés de ma présence, j'ai bien hâte !

Et une autre à Célia et Marlène, toujours là après toutes ces années... J'ai hâte de vous revoir.

Je me tourne à présent vers l'Est, Montpellier, ma future terre d'accueil, qui m'a déjà bien accueillie, et les personnes que j'ai rencontrées là-bas. Rémy et son Bagou (Bakou, haha, jeu de mots drôle), avec toi les discussions sont toujours intenses, mais pas toujours censées, heureusement ! Mary, Alexis, c'est un bonheur de vous connaître, les petits breaks de la thèse avec vous m'ont toujours fait du bien, vivement la Corse (et vivement le Insane 2020, qui ne sera pas ce qu'il a été si Maroane n'est pas là).

J'ai des remerciements tout particuliers à adresser à une personne qui, à mon grand regret, n'est pas consciente de sa valeur. Nous nous sommes connues au même moment critique, et nous avons vécu chaque étape de la thèse ensemble : Manon, jamais cette expérience n'aurait pu être la même sans toi. Au début, on s'est serré les coudes, plus par solidarité, puis on s'est découvertes, et maintenant, dans les esprits, on est les sœurs siamoises, les indissociables du labo. Elle est où Manon ? Elle est où Millou ? Ces questions innocentes qui ont martelé l'esprit de nos co-bureaux lorsque l'une manquait à l'appel... Je ne vais pas rentrer dans le détail ici, ce n'est pas le lieu, sache seulement, et sois en sûre, que si la thèse nous a réunies, la fin de cette expérience ne nous séparera pas. Tu as énormément contribué à faire ces trois ans ce qu'ils ont été : une belle expérience, notamment humaine. Et je serai toujours là pour te faire un p'tit signe pendant que tu es en train de Pourquoi Te Vas !

C'est ton tour Charlotte, ma belle Anne, belle âme, qui as allégé mon cœur dans les moments douloureux, qui m'as fait prendre conscience que je n'étais pas la seule maladroite maladive, qui as rendu (encore plus) agréable la vie au labo, mais aussi à l'extérieur. Tu m'as énormément appris, sur moi-même, sur les autres, sur les interactions durables entre organismes, ici du genre *Homo*. Merci de ton soutien, depuis l'expérience de Ma Thèse en 180 secondes, j'ai appris à mieux te connaître et depuis, chaque moment passé avec toi m'a apporté. Grâce à toi j'en sais plus sur les coulisses de la recherche et de la vie de labo, mais c'est ton énergie et ton enthousiasme contagieux qui font de toi la personne que tu es et que j'adore. Queen Riri's on fire et j'espère qu'elle restera sur le ring, car tu mérites d'être heureuse et de t'épanouir comme tu le fais, tant professionnellement que personnellement. Merci ma Charlotte, je serai toujours ta Carlotta.

Je m'adresse maintenant à ceux qui sont dans ma vie depuis toujours, ma famille qui ne m'a jamais lâchée. Je vous en ai fait voir de toutes les couleurs, avec ces choix d'études, cette obstination qui semblait ne conduire nulle part. Mais vous avez su me donner le coup de fouet et surtout vous avez su croire en moi aux bons moments. Bien que je pense à tout le monde à ce moment, je suis fière aujourd'hui de vous dédier cette thèse à vous en particulier, Maman, Papa, Deb, Elo, Corentin, Maë, mais aussi Sylvain, Cloé et maintenant, Charlie, vous tous qui m'avez donné la force d'arriver là où j'en suis, surtout dans la dernière ligne droite, qui n'ont jamais arrêté de me soutenir, qui avez participé à construire la personne que je suis aujourd'hui et que je serai demain. Merci d'être là, d'avoir compris mes silences parfois longs, d'avoir répondu à mes appels parfois pressants et désespérés, de faire partie de ma vie. J'adresse aussi une pensée à mamie Jo' et à Sophie qui m'ont épaulée dès mon arrivée dans cette contrée lointaine, et qui ont toujours répondu présentes pour m'aider. J'ai la chance d'avoir une famille en or qui a rendu cette expérience possible, et m'a encouragée jusqu'au bout pour la mener à bien.

Il me reste quelqu'un à remercier, une personne toute particulière dans ma vie, qui en fait partie depuis pas si longtemps, mais qui occupe déjà une place immense. Merci à toi, à ta patience sans limite, à ta compréhension de mes hauts et mes bas (surtout mes bas), à ta présence quotidienne, pour ces moments de partage, de découverte, pour ton attention, pour l'avenir qui s'ouvre désormais à moi, à nous. Ça y est, on y est !

Je souhaite terminer par remercier toutes les personnes qui ont ponctué ma vie, qui ont contribué à faire moi qui je suis et à me conduire jusqu'ici. Il s'agit notamment d'enseignants, depuis l'école primaire jusqu'à l'université, en passant par le collège et lycée, mais aussi et surtout de personnes lambda, pas dans le sens où elles n'avaient pas d'importance, mais à qui je ne peux pas attribuer de titre particulier. Merci.

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
A. LES MALADIES A TRANSMISSION VECTORIELLE	2
1. QU'EST-CE QU'UNE MALADIE A TRANSMISSION VECTORIELLE ?	2
2. QUELLES SOLUTIONS POUR LA LUTTE CONTRE CES MALADIES ?	3
B. LE MODELE PLANORBIDAE - SCHISTOSOMA	4
C. LES INTERACTIONS IMMUNITAIRES ENTRE PLANORBIDAE ET SCHISTOSOMA	10
1. CONNAITRE SON ENNEMI ET SONNER L'ALARME : LA RECONNAISSANCE DES PATHOGENES	12
2. ORGANISER LES TROUPES : LES VOIES DE SIGNALISATION	16
3. LANCER L'OFFENSIVE : LES EFFECTEURS IMMUNITAIRES	17
4. UN SYSTEME IMMUNITAIRE SOUS INFLUENCE...	22
D. INTERACTIONS, MICROBIOTE ET HOLOBIONTE	26
1. LES DIFFERENTES TYPES D'INTERACTIONS ENTRE ORGANISMES	26
2. MICROBIOTE ET HOLOBIONTE : L'HISTOIRE DES CONCEPTS	30
3. ACQUISITION ET COMPOSITION DU MICROBIOTE	32
E. LE TRIPTYQUE MICROBIOTE - IMMUNITE - HOTE	34
1. IMMUNITE DE L'HOTE ET STRUCTURATION DU MICROBIOTE	34
2. ROLE DU MICROBIOTE DANS LA DEFENSE DE L'HOTE	36
F. LE MICROBIOTE DANS LE CONTEXTE D'UNE MALADIE A TRANSMISSION VECTORIELLE : LA BILHARZIOSE	41
1. MICROBIOTE DE <i>BIOMPHALARIA</i> : ETAT DE L'ART	41
II. CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DU MICROBIOTE	49
A. ANALYSES DU MICROBIOTE VIRAL	49
B. ANALYSES DU MICROBIOTE PROTISTE	50
C. ANALYSES DU MICROBIOTE BACTERIEN	73
1. CARACTERISATION ET DYNAMIQUE DU MICROBIOTE D'UNE SOUCHE DE <i>B. GLABRATA</i>	75
2. COMPOSITION DU MICROBIOTE BACTERIEN DE DIFFERENTES SOUCHES DE PLANORBIDAE	103
III. CHAPITRE 2 : DYNAMIQUE DU MICROBIOTE AU COURS D'UNE CINETIQUE D'INFESTATION	123
A. PRIMO-INFECTIION ET CHALLENGE IMMUNITAIRE EN INFESTATION SYMPATRIQUE/ALLOPATRIQUE : LA REPOSE DU MICROBIOTE	123
B. COMBINAISONS SYMPATRIQUE/ALLOPATRIQUES ET COMPATIBILITE : LES EFFETS SUR LE MICROBIOTE	125
1. PLAN D'EXPERIMENTATION	125
2. RESULTATS : PREVALENCES ET CHOIX DES COMBINAISONS	128
B. CONCLUSION	135
IV. CHAPITRE 3 : EXPLORATION DU LIEN DE CAUSE A EFFET ENTRE MICROBIOTE ET COMPATIBILITE	137

A. INTRODUCTION	137
B. PLAN EXPERIMENTAL	139
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	139
2. CONDITIONS D'ELEVAGE ET TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES	139
3. INFESTATION DES MOLLUSQUES PAR LES PARASITES	140
4. ECHANTILLONNAGE ET EXTRACTION	141
5. SUIVI DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE DE <i>B. GLABRATA</i> POST TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES PAR Q-RT-PCR	142
6. MESURES DES INDICES DE PREVALENCE ET D'INTENSITE	143
7. ANALYSES STATISTIQUES	144
C. RESULTATS	144
8. ANALYSE DE LA TOXICITE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES MOLLUSQUES ET LES PARASITES	144
9. EFFET DES ANTIBIOTIQUES SUR LES COMMUNAUTES BACTERIENNES	146
10. EFFET DES TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES SUR LA COMPATIBILITE	147
C. DISCUSSION	149
EFFET DES ANTIBIOTIQUES	149
EFFET DE LA DYSBIOSE SUR LES INFESTATIONS PARASITAIRES	150
1. 2. V. DISCUSSION GENERALE	154
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	166
VII. BIBLIOGRAPHIE	169

Glossaire :

Allopatrie : taxons qui n'entrent pas en contact l'un avec l'autre dans l'environnement.

Axénique : individu stérile, sans flore microbienne colonisatrice.

Commensalisme : interaction entre organismes dont l'un des protagonistes tire parti sans causer de dommage à l'autre.

Ectothermes : organisme vivant incapable de réguler sa température corporelle, qui est alors régulée par l'environnement extérieur.

Endotherme : organisme vivant capable de réguler et de maintenir sa température corporelle grâce à son métabolisme.

Gnotobiotique : individu à qui l'on a associé expérimentalement des microorganismes afin de contrôler la composition du microbiote.

Hématopoïèse : production de cellules sanguines, ou en l'occurrence, hémolymphatiques.

Hémocyte : cellule immunitaire circulante des invertébrés.

Holobionte : ensemble formé par un organisme et son microbiote.

Hôte intermédiaire : organisme dans lequel un parasite ou un pathogène doit effectuer une part de son développement avant de pouvoir infester son hôte définitif. La transmission entre les deux hôtes, dans ce cas, ne se fait pas de manière active.

Immunité mémoire : réponse immunitaire plus rapide et plus efficace après une seconde exposition à un pathogène, chez les invertébrés.

Microbiome : ensemble des microorganismes et de leur génome, associés à un système, qu'il s'agisse d'un organisme ou d'une niche écologique.

Microbiote : ensemble des microorganismes (bactéries, virus, eucaryotes uni- ou pluricellulaires appartenant aux protistes, aux champignons, aux plathelminthes...) interagissant avec un organisme à un temps t, quelle que soit la nature de ces interactions (négatives, neutres ou positives) à ce temps t.

Mutualisme : interaction entre organismes dont chaque protagoniste tire un bénéfice.

Niche écologique : ensemble constitué par la place qu'occupe un organisme dans un écosystème, la somme des conditions physico-chimiques et biologiques nécessaires à sa survie mais aussi, et surtout le rôle de cet organisme dans le fonctionnement de l'écosystème (prédateur, parasite...).

Oponisation : processus biochimique favorisant la phagocytose ou autres mécanismes de destruction cellulaire, en tapissant la membrane externe de ces cellules avec une molécule de marquage appelée opsonine.

Parasitisme : interaction entre organismes dont l'un tire parti au détriment de l'autre, lui causant des effets délétères pouvant le conduire jusqu'à la mort.

Phylosymbiose : corrélation entre la composition d'un symbiote ou du microbiote d'un hôte et sa phylogénie.

Symbiose : association durable entre deux organismes hétérospécifiques **sans présupposition de la nature de l'interaction**. Ce terme est souvent utilisé dans le cadre d'une interaction

positive mais il s'agit d'un abus de langage lié à la confusion avec le terme anglais « *symbiosis* », spécifique des interactions positives. Ainsi, en français, le parasitisme, le commensalisme et le mutualisme sont tous des symbioses.

Sympatrie : taxons qui partagent le même environnement et peuvent donc être en contact l'un avec l'autre.

Vecteur : organisme dispersant une infection en transportant des agents pathogènes d'un hôte à l'autre.

Liste des acronymes :

C1qDC : C1q Domain Containing protein

CREP : C-type lectin-Related Protein

DAMP : Damage Associated Molecular Patterns

DSCAM : Down Syndrom Cell Adhesion Molecules

FREPs : Fibrinogen RElated Proteins

GNBP : Gram Negative Binding Protein

GREP : Galectin-Related Protein

HMP : Human Microbiome Project

HSP : Heat-Shock Protein

LBP/BPI : Lipopolysaccharides Binding Proteins/Bactericidal Permeability Increasing

MACPF : Membrane-Attack Complex/Perforin

MEB : Microscope Électronique à Balayage

MIF : Macrophage Migration Inhibitory Factor

MPEG1 : MacroPhage Expressed Gene-1

NIH : National Institute in Health

NOS : Reactive nitrogen species

OMS : Organisme Mondial pour la Santé (en anglais, WHO : World Health Organisation)

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PGRP : PeptidoGlycan Recognition Protein

PO : Phénol-Oxydase

PRR : Pattern Recognition Receptor

ROS : Reactive oxygen species

SmPoMucs : Schistosoma mansoni Polymorphic Mucins

SRCR : Scavengers Receptor Cystein-Rich

TEP : Thioester Containing Protein

TLR : Toll-*like* Receptor

β -PFT : β Pore-Forming Toxins

Sommaire des tableaux

TABLEAU 1 : LES DIFFERENTS TYPES D'INTERACTIONS BIOTIQUES	P. 26
TABLEAU 2 : PRESENCE/ABSENCE DES SOUCHES VIRALES AVANT ET APRES RENOUVELLEMENT DE L'ELEVAGE	P. 43
TABLEAU 3 : COMPARAISON DES PREVALENCES ATTENDUES ET OBSERVEES DANS DES COMBINAISONS HOTE/PARASITE DIFFERENTES	P. 128
TABLEAU 4 : AMORCES SPECIFIQUES DE TAXA BACTERIENS ANALYSES DANS LE CAS DE L'ETUDE DE LA DYSBIOSE SUITE AUX TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES	P. 143

Sommaire des figures

FIGURE 1 : VER ADULTE <i>S. HAEMATOBIMUM</i> DANS LES VISCERES MOMIFIES DE SAINT LOUIS	P. 1
FIGURE 2 : POSITION PHYLOGENETIQUE DE LA CLASSE DES TREMATODES AU SEIN DES NEODERMATA	P. 5
FIGURE 3 : CYCLE DE VIE COMPLEXE DU PARASITE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	P. 6
FIGURE 4 : PHOTOGRAPHIE D'UN COUPLE DE <i>SCHISTOSOMA BOVIS</i>	P. 7
FIGURE 5 : PHOTOGRAPHIE D'UN INDIVIDU <i>BIOMPHALARIA GLABRATA</i> ORIGINAIRE DE GUADELOUPE	P. 8
FIGURE 6 : ORIGINE GEOGRAPHIQUE DES SOUCHES DE LABORATOIRES ETUDIEES DANS LE CADRE DE MA THESE	P. 8
FIGURE 7 : RADARS DE COMPATIBILITE DE DIFFERENTES COMBINAISONS HOTES-PARASITES	P. 9
FIGURE 8 : RECONNAISSANCE DES SMPoMUCS PAR LES FREPS	P. 15
FIGURE 9 : SCHEMA D'ENCAPSULATION ET DE PHAGOCYTOSE	P. 19
FIGURE 10 : INTERACTION ENTRE ROS DES MOLLUSQUES ET ROS-SCAVENGERS DES PARASITES	P. 21
FIGURE 11 : FONCTIONNEMENT THEORIQUE DES AMORCES BLOQUANTES ET AMORCES SPECIFIQUES	P. 51
FIGURE 12 : PCoA DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE DES INDIVIDUS NAÏFS DES SOUCHES BgBAR, BgBRE ET BgBS90	P. 129
FIGURE 13 : PCoA DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE BACTERIEN AU COURS D'UNE DYNAMIQUE D'INFESTATION CHEZ BgBAR ET BgBRE	P. 130
FIGURE 14 : PCoA DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE BACTERIEN AU COURS D'UNE DYNAMIQUE D'INFESTATION CHEZ BgBS90	P. 131
FIGURE 15 : COMPOSITION RELATIVE DES HUIT PHYLA DOMINANTS DE BgBAR, BgBRE ET BgBS90	P. 132
FIGURE 16 : CLUSTERING HIERARCHIQUE DE LA SOUCHE BgBAR ET DES POPULATIONS SENSIBLES ET RESISTANTES SELON LA COMPOSITION DE LEUR MICROBIOTE A L'ETAT NAÏF	P. 134
FIGURE 17 : CLUSTERING HIERARCHIQUE DES POPULATIONS SENSIBLES ET RESISTANTES SELON LA COMPOSITION DE LEUR MICROBIOTE A L'ETAT NAÏF ET INFESTE	P. 135
FIGURE 18 : PLAN EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DU LIEN DE CAUSE A EFFET DU MICROBIOTE SUR LA COMPATIBILITE DES MOLLUSQUES AUX PARASITES.	P. 141

FIGURE 19 : SURVIE DES MOLLUSQUES TRAITES AUX ANTIBIOTIQUES.	P. 145
FIGURE 20 : EFFETS DES TRAITEMENTS ANTIBIOTIQUES SUR LES CAPACITES D'INFESTATION DE LA SOUCHE SMLE	P. 145
FIGURE 21 : ABONDANCE DES DIFFERENTS GROUPES BACTERIENS PAR CONDITION	P. 146
FIGURE 22 : COMPATIBILITE BGBAR/SMLE EN CONDITIONS ANTIBIOTIQUES ET CONTROLE	P. 147
FIGURE 23 : COMPATIBILITE BGBAR/SMBRE EN CONDITIONS ANTIBIOTIQUES ET CONTROLE	P. 148
FIGURE 24 : COMPATIBILITE BGBAR/SMGH2 EN CONDITIONS ANTIBIOTIQUES ET CONTROLE	P. 148

I. Introduction

Le 8 Juin 2019, un article de Philippe Charlier et collaborateurs est publié, révélant, grâce à l'examen de ses restes, que la cause de la mort de Saint Louis, le seul roi français jamais canonisé, n'était pas due à la peste, mais au scorbut (Charlier *et al.*, 2019). Deux ans plus tôt, un premier article a fait état de la présence d'un parasite dans les viscères momifiés de ce même roi : un ver trématode connu pour causer la bilharziose à l'Homme, le schistosome, et plus précisément, l'espèce *Schistosoma haematobium* (Charlier *et al.*, 2016). Huit cents ans après la mort de Saint Louis et l'embaumement de ses viscères, les parasites étaient toujours bien conservés et identifiables au microscope électronique à balayage (Figure 1).



Figure 1 : Ver adulte *S. haematobium* dans les viscères momifiés de Saint Louis (MEB x 1700) (d'après Charlier *et al.*, 2016)

Après plusieurs siècles, les secrets cachés d'un organisme peuvent donc être révélés, tels que des occupants microscopiques ayant vécu en interaction avec lui.

Ce sont justement ces microorganismes, qui ont été au cœur de ma thèse, plus précisément les communautés vivant en interaction avec un macroorganisme. Celui-ci

n'est autre que l'hôte intermédiaire mollusque du parasite susmentionné, *Schistosoma* spp.. L'objectif de mes trois ans de travaux a été d'identifier les microorganismes, bactéries, virus et protistes, de plusieurs espèces de mollusques, dans le contexte de l'interaction tripartite avec les parasites trématodes. J'ai également cherché à établir si un lien existait entre la présence de certains microorganismes et les capacités immunitaires antiparasitaires des mollusques.

A. Les maladies à transmission vectorielle

Les maladies à transmission vectorielle sont, d'après l'OMS (Organisation Mondiale pour la Santé), une menace croissante pour l'humanité. D'après un rapport de cet organisme (WHO, 2017), elles représentent 17 % des maladies infectieuses et causent la mort de plus d'un million de personnes par an. Par exemple, 40% de la population mondiale est exposée au risque de transmission de la dengue, chaque minute un enfant meurt du paludisme en Afrique et plus d'un million de nouveau cas de leishmaniose sont déclarés chaque année. En outre, le réchauffement climatique, l'augmentation de la pauvreté conduisant à une réduction à l'accès aux soins et à une hygiène minimum, la mondialisation des voyages et du commerce, sont autant de facteurs qui augmentent le risque de propagation de ce type de maladies.

1. Qu'est-ce qu'une maladie à transmission vectorielle ?

Il s'agit d'une maladie transmise activement par un organisme vivant (vecteur) à un autre organisme. Les vecteurs peuvent être notamment des insectes hématophages qui, lors d'un repas de sang, transmettent des microorganismes tels que des bactéries, des virus ou des parasites. Les moustiques sont les vecteurs les plus connus et répandus. Ils peuvent, notamment, transmettre un grand nombre de maladies selon leur espèce, telles que la dengue et le Chikungunya (causés par des virus), tous deux transmis par le genre *Aedes*, ou le paludisme (dont l'agent est un parasite protozoaire du genre *Plasmodium*) transmis par le genre *Anopheles*. Il existe également d'autres vecteurs qui transmettent des maladies comme la Leishmaniose, dont l'agent infectieux est un parasite eucaryote unicellulaire flagellé du genre *Leishmania*, transmis par différentes espèces de phlébotomes comme le genre *Lutzomyia*, la maladie de Lyme (bactéries du genre *Borrelia*) transmise par les tiques dures appartenant au genre *Ixodes*, ou encore la trypanosomiase africaine (protozoaire *Trypanosoma*), mieux connue sous le nom de maladie du sommeil, dont la mouche tsé-tsé (*Glossina* sp.) est le vecteur. La bilharziose ou schistosomiase dont l'agent infectieux est le parasite trématode *Schistosoma* sp. Est une maladie "transmise" non pas par un insecte mais par des escargots d'eau douce. Le terme

de vecteur concernant cette dernière maladie est sujet à controverse, car beaucoup considèrent qu'un vecteur transmet activement l'agent infectieux, par piqûre, ou morsure. Ici, les larves de parasite sont libérées de façon passive et le mollusque n'interagit pas directement avec l'hôte définitif, il est donc communément considéré comme un **hôte intermédiaire**.

Bien que la bilharziose ne rentre pas exactement dans la définition de parasitologie d'une maladie à transmission vectorielle, le parasite étant transmis passivement, il est quand même admis de la classer dans cette catégorie, notamment à cause des taux de transmission et de mortalité très élevés qui la caractérisent.

2. Quelles solutions pour la lutte contre ces maladies ?

Différents moyens de lutte existent et sont mis en place afin de réduire la propagation et les risques de transmission de ces maladies. Un pan de ce travail consiste à informer les populations locales sur les zones à risques, les moyens de transmission, tout en leur offrant des solutions comme un meilleur accès à l'eau et aux systèmes d'assainissement.

Une action directe contre ces maladies est également possible, notamment par le développement de vaccins, dont le mode d'action consiste à « *exposer un organisme à un pathogène vivant atténué, un pathogène inactivé ou à des particules de pathogènes, afin de lui apprendre à le reconnaître plus vite et à se défendre plus efficacement* » (Vetter et al. 2018). Le développement de ce type de traitement est long et complexe et ne s'adapte pas à tous les types de pathogènes. D'autres formes de médication ont donc un mode d'action curatif et non préventif, n'empêchant pas la réinfection. Cependant, des résistances à certains médicaments sont souvent observées, notamment dans le cas de traitements de masse.

Le Praziquantel est le principal remède utilisé pour soigner la bilharziose, causée par le ver trématode du genre *Schistosoma*. Il est efficace contre la plupart des formes de la maladie mais a été démontré comme moins actif contre les formes juvéniles des vers que contre les formes matures (Pica-Mattoccia & Cioli, 2004; Xiao et al., 1985). Les traitements de masse, notamment des populations d'Afrique sub-saharienne pourraient conduire à la sélection de formes résistantes au médicament chez les parasites.

Ce phénomène de résistance au Praziquantel est fortement étudié depuis plusieurs années mais les résultats sont controversés (Cioli, 2000; Doenhoff et al., 2008; Doenhoff et al., 2002; Fallon, 1998; Greenberg, 2013; Wang et al., 2012).

Certaines études ont porté sur l'apparition de résistance sur le terrain ou l'échec de la thérapie (lié par exemple à de très forts taux de transmission ou une forte présence de vers juvéniles, contre lesquels le Praziquantel est inefficace). Des résistances ont été reportées notamment chez *S. mansoni* (Botros *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 1976; Couto *et al.*, 2011; De Souza Dias & Olivier, 1986; De Vlas *et al.*, 1996; Fallon & Doenhoff, 1994; Ismail *et al.*, 1996; Stelma *et al.*, 1995), d'autres chez *S. japonicum* (Seto *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012) et d'autres encore chez *S. haematobium* (Alonso *et al.*, 2006; Herwaldt *et al.*, 1995). Ces études ne démontrent pas l'émergence de résistance à large échelle, mais plutôt des cas d'individus isolés de parasites présentant une sensibilité réduite au traitement.

L'action du Praziquantel restant mal connue, la compréhension des mécanismes de résistance le sont d'autant moins (Cupit & Cunningham, 2015), rendant difficile la mise en place de solutions alternatives. C'est pour cette raison que d'autres possibilités doivent être envisagées, comme celles qui consistent en l'élimination des « vecteurs » de ces maladies, afin de maîtriser leur propagation et de casser le cycle de développement des parasites. En ce qui concerne les schistosomes, Pointier et Giboda (1999) ont résumé les efforts de contrôle des populations d'hôtes intermédiaires des parasites, par des traitements chimiques ou par de la mise en compétition entre différentes espèces de mollusques. Un questionnement bioéthique se pose alors : l'introduction d'agents chimiques, d'une espèce plus compétitive d'un autre milieu, ou la suppression d'une espèce ne risqueraient-elles pas de déséquilibrer un écosystème entier ?

Une meilleure compréhension du système hôte/parasite et de la physiologie du vecteur ou de l'hôte intermédiaire est, quoi qu'il en soit, essentielle à la mise en place de moyens efficaces de lutte contre ces maladies vectorielles.

B. Le modèle Planorbidae - *Schistosoma*

Le laboratoire Interactions Hôtes-Pathogènes-Environnement axe une partie de ses recherches sur le modèle de l'interaction entre le parasite du genre *Schistosoma* et ses hôtes intermédiaires mollusques, appartenant à la famille des Planorbidae.

Les schistosomes sont des vers parasites plats font partie des trématodes digènes, ou en termes phylogénétiques, appartiennent à la sous-classe Digenea des Trematoda, groupe frère des Cestoda et Monogenea, ces trois classes appartenant aux Plathelminthes Neodermata. (Figure 2).

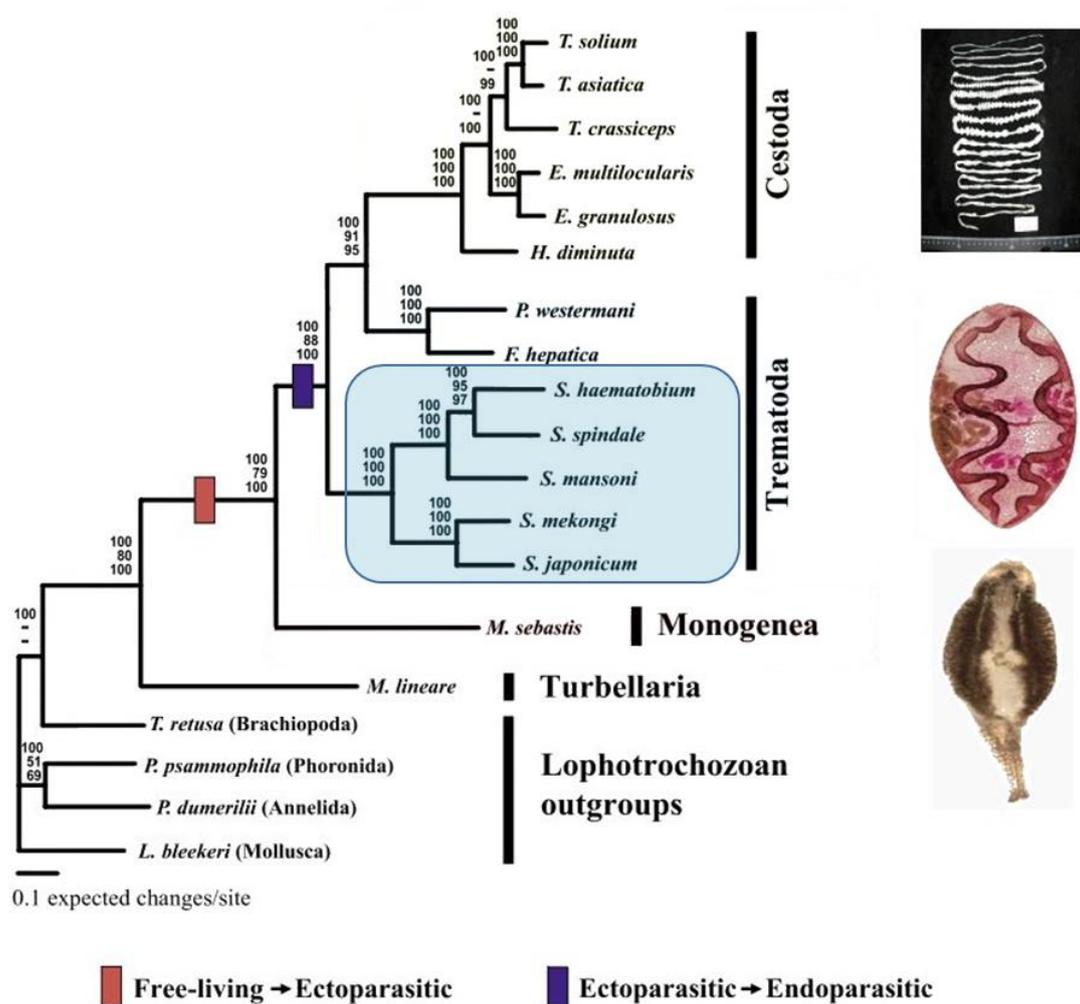


Figure 2 : Position phylogénétique de la classe des trématodes au sein des Neodermata, super-classe appartenant aux Plathelminthes, d'après l'analyse de la séquence d'acides aminés de 12 gènes codant pour des protéines mitochondriales (modifié d'après (Park et al., 2007).

Il en existe sept espèces, ainsi que plusieurs hybrides, même entre des espèces phylogénétiquement éloignées (Lockyer et al., 2003), comme *S. haematobium* et *S. mansoni* (Depaquit et al., 2019; Huyse et al., 2013; Le Govic et al., 2019). Il n'est pas non plus rare de trouver des personnes infestées par les deux espèces en même temps (Gouvras et al., 2013; Koukounari et al., 2010; Meurs et al., 2012).

Le schistosome est responsable de la bilharziose chez l'Homme, infestant environ 240 millions de personnes dans le monde entier (toutes espèces confondues). Plus de 200 000 personnes succombent à la maladie, rien qu'en Afrique sub-saharienne, chaque année (WHO, 2016). Son cycle de vie est complexe, il nécessite en effet deux hôtes pour achever son développement (Figure 3).

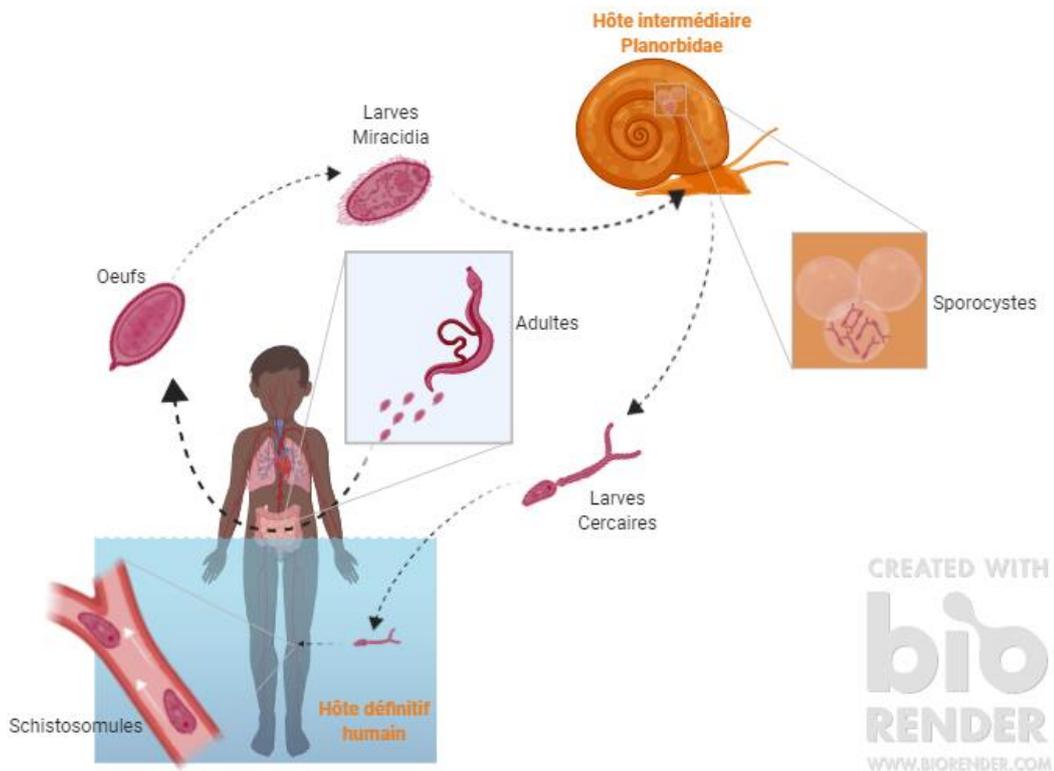


Figure 3 : Cycle de vie complexe du parasite *Schistosoma mansoni*.

Les couples d'adultes mâles et femelles vivent dans les veines mésentériques ou dans le plexus veineux uro-génital de l'hôte définitif selon l'espèce. Les femelles sont très petites, trop faibles pour se nourrir et se déplacer seules, c'est pourquoi les mâles les gardent au sein de leur canal gynécophore (Figure 4).



Figure 4 : Photographie d'un couple de *Schistosoma bovis* au microscope optique, le mâle (translucide) est bien plus gros que la femelle (noire) et la tient dans son canal gynécophore.

Les femelles relâchent des centaines de milliers d'œufs fécondés par jour. Certains de ces œufs n'éclosent jamais et sont retenus dans les tissus de l'hôte dans lesquels ils peuvent induire notamment des inflammations, tandis que les autres sont évacués par les voies urinaires (*S. haematobium*) ou fécales (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum*, *S. guineensis*, *S. bovis*), en traversant la paroi de la vessie ou de l'intestin. Lorsque les œufs atteignent un milieu aquatique, des larves nageuses libres ciliées, appelées miracidia, émergent puis nagent jusqu'à rencontrer leur hôte intermédiaire mollusque. C'est au sein de cet hôte que la phase de reproduction asexuée a lieu. Les larves pénètrent activement dans les tissus de son hôte puis s'enkystent en sporocystes primaires, aboutissant à la formation de sporocystes secondaires. Au bout de quatre à six semaines, ces derniers ont le potentiel de produire, par multiplication asexuée, des milliers de larves nageuses : les cercaires. Celles-ci correspondent au stade infectieux du parasite, et émergent du mollusque pour rencontrer leur hôte définitif vertébré, dans lequel elles pénètrent par effraction de la peau. Elles perdent alors leur queue bifide pour devenir des larves schistosomulae, qui migrent alors via le système circulatoire dans les poumons, le foie puis le système veineux porte ou le système veineux drainant les organes pelviens. Là, les parasites mûrissent jusqu'au stade adulte sexué, puis migrent dans les veines mésentériques supérieures ou inférieures ou dans le plexus veineux uro-génital, selon l'espèce. Les adultes s'accouplent ensuite, produisent des œufs, pour commencer un nouveau cycle.

Ces parasites et leurs hôtes se retrouvent dans les zones tropicales et sub-tropicales. De nombreuses espèces de mollusques de la famille des Planorbidae servent d'hôtes intermédiaires à ces parasites, divisées en deux sous-familles, les Planorbinae et les Bulinae

(Morgan *et al.*, 2002). Parmi les Planorbinae, on trouve notamment l'espèce *Biomphalaria glabrata* (Figure 5), l'un des principaux modèles d'étude du laboratoire IHPE et hôte intermédiaire de l'espèce *S. mansoni*.

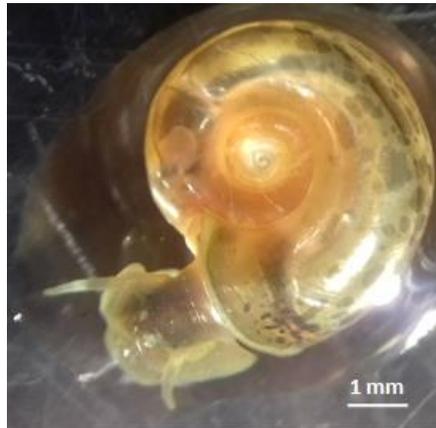


Figure 5 : Photographie d'un individu *Biomphalaria glabrata* originaire de Guadeloupe (souche GUA) à la loupe binoculaire.

Ces mollusques pulmonés d'eau douce viennent de différentes localités géographiques, notamment du Brésil et de Guadeloupe (Figure 6), et sont maintenus depuis de nombreuses générations au laboratoire. Ils sont maintenus à température constante, de 26°C (température approximative des cours d'eau de leur milieu naturel), selon un cycle jour/nuit de 12h, et nourris *ad libitum* avec de la salade.

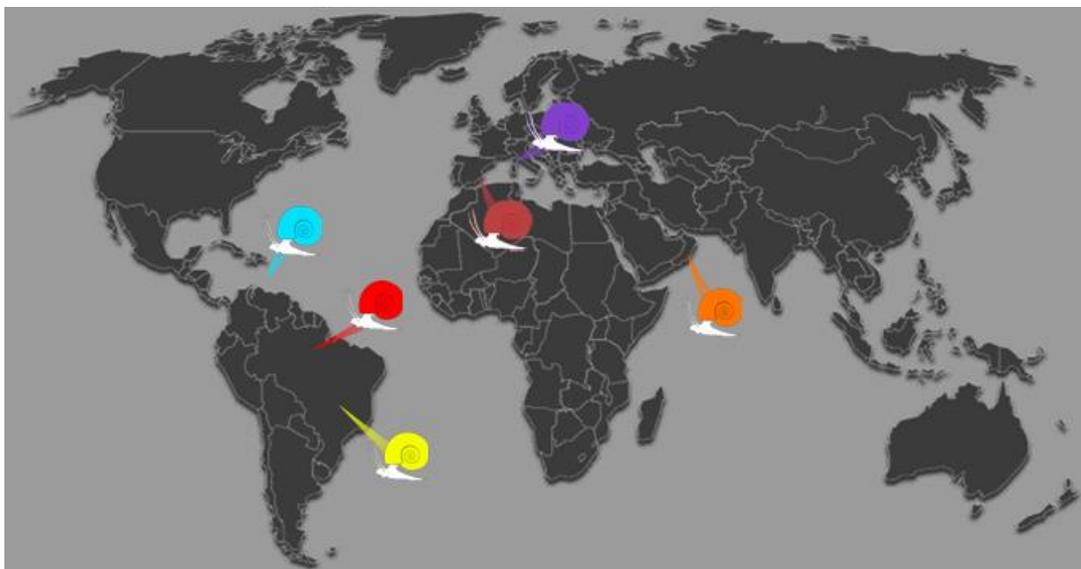


Figure 6 : Origine géographique des souches de laboratoires étudiées dans le cadre de ma thèse. En bleu, rouge et jaune, trois souches de *B. glabrata*, respectivement BgGUA, BgBRE et BgBAR. En orange, la souche de *B. pfeifferi* originaire d'Oman. En parme, la souche espagnole de *P. metidjensis*. En violet, la souche corse de *B. truncatus*.

Les cycles de différentes souches de parasites sont également maintenus au laboratoire. Nous disposons donc de plusieurs combinaisons hôtes-parasites, sympatriques (provenant de la même origine géographique, et ayant donc eu l'opportunité de se rencontrer à

l'état naturel) et allopatriques (provenant d'une origine géographique différente, et donc n'ayant pas eu l'opportunité de se rencontrer à l'état naturel). En conditions sympatriques, les systèmes de défense des mollusques et les stratégies d'infestation des parasites ont donc coévolué, alors que dans le cas d'organismes allopatriques, le système immunitaire de l'un peut reconnaître moins efficacement le parasite tandis que les capacités d'infestation de ce dernier peuvent ne pas être optimales.

Selon les combinaisons sympatriques, la capacité des parasites à se développer dans les mollusques varie, traduisant une virulence différente selon la souche. Cette aptitude à établir une infection et achever sa transmission donne ce qu'on appelle le phénotype de compatibilité entre l'hôte et le parasite (Coustau & Théron, 2004). Ce phénotype est également influencé par les capacités immunitaires de l'hôte mollusque. Des combinaisons croisées ont été menées expérimentalement, en associant des souches sympatriques et allopatriques, de sorte à tester la compatibilité de ces croisements (Galinier *et al.*, 2017a; Theron *et al.*, 2014) (Figure 7).

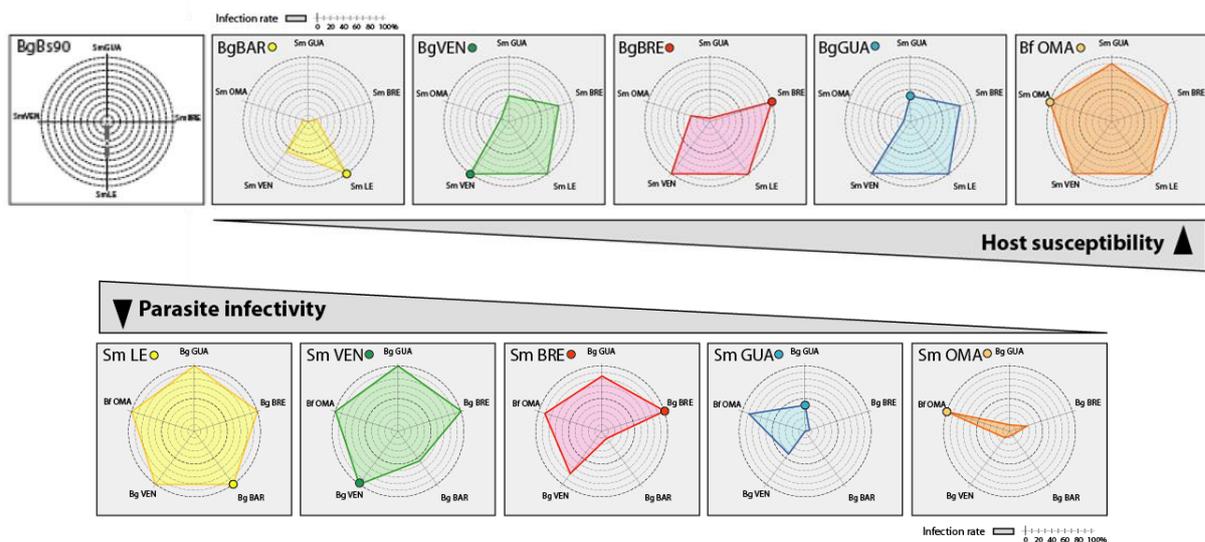


Figure 7 : Radars de compatibilité de différentes combinaisons hôtes-parasites. En haut, sensibilité de chaque souche de *Biomphalaria* vis-à-vis de sa souche sympatrique (cercle coloré) et de souches allopatriques de parasites, à part BgBS90, car nous ne disposons pas de sa souche sympatrique au laboratoire. En bas, infectivité de chaque souche de *S. mansoni* vis-à-vis de sa souche sympatrique (cercle coloré) et de souches allopatriques. Chaque cercle pointillé représente 10% des individus mis au contact des parasites, chez qui ceux-ci parviennent à se développer. (d'après Théron *et al.*, 2014 et Galinier *et al.*, 2017a)

Cette expérience a révélé un haut niveau de polymorphisme de compatibilité selon les combinaisons maintenues en laboratoire depuis plusieurs générations, ce qui peut s'expliquer par différentes stratégies d'évitement des défenses des mollusques par les parasites, ainsi que les différentes stratégies immunitaires des escargots, qui seront développées plus loin (voir I. C.) (Galinier *et al.*, 2017; Portet *et al.*, 2018, 2019; Sapp & Loker,

2000b, 2000a; Van Der Knaap & Loker, 1990). L'ensemble de ces stratégies adoptées par l'hôte et le parasite correspondent à un parfait exemple de course aux armements.

Le polymorphisme de compatibilité traduit donc de capacités d'infestation et de capacités immunitaires variables selon les souches de parasites et de mollusques. Ce phénotype est étudié de longtemps mais est très complexe (Mitta *et al.*, 2017). La compréhension de ces interactions immunitaires est une étape clef pour appréhender tous les mécanismes mis en jeu dans le contexte de ce phénotype.

C. Les interactions immunitaires entre Planorbidae et *Schistosoma*

L'immunité correspond à la capacité d'un organisme à reconnaître le non soi et à le maintenir à un niveau non délétère pour l'organisme ou à l'éliminer (Hooper *et al.*, 2012; Pradeu & Vivier, 2014). Des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, champignons...) peuvent être à l'origine d'une réaction immunitaire et/ou entraîner un affaiblissement pouvant éventuellement conduire jusqu'à la mort de l'hôte si l'infection n'est pas contrôlée. Un microorganisme neutre ou bénéfique peut également devenir pathogène pour l'organisme hôte dans certaines conditions, notamment en cas de prolifération. Le terme de pathogénicité correspond donc plutôt à un état au cours d'une interaction entre un hôte et des microorganismes (Méthot & Alizon, 2014). Outre les microorganismes, le système immunitaire d'un organisme peut également être altéré ou stimulé par des molécules étrangères (polluants, métaux lourds, toxines...) (de Carvalho Augusto *et al.*, 2019).

Dans le monde animal, il existe plusieurs types d'immunité. Chez les vertébrés, elle se décline en immunité innée et immunité adaptative ou acquise (mémorisation d'un contact précédent avec un pathogène pour une réponse spécifique plus rapide et efficace lors du second contact). L'immunité des invertébrés, quant à elle, a longtemps été considérée comme uniquement innée, sans spécificité et sans mémorisation des infections. Torre et ses collaborateurs (2017) ont, cependant, démontré la fragilité de ce constat, bien que l'immunité adaptative ait longtemps été considérée comme spécifique des vertébrés et son équivalent chez les invertébrés étant très controversé (Arala-Chaves & Sequeira, 2000; Klein, 1997; Kurtz, 2005; Rinkevich, 1999). En effet, la capacité de mémorisation immunitaire a longtemps été négligée chez ces organismes, en partie à cause de la vision de l'immunologie centrée sur celle des vertébrés, puisque les mécanismes liés au processus de mémorisation décrits chez ces derniers, sont absents ou

encore non décrits jusqu'à présent (notamment la présence de lymphocytes, d'anticorps et de molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH)) (Kurtz, 2005).

Pourtant, une réponse immunitaire, plus rapide et plus efficace après une seconde mise en contact, a été caractérisée chez des invertébrés, dès les années 70, notamment chez des Cnidaires comme *Montipora verruosa* en réponse à des greffes avec d'autres coraux (Hildemann *et al.*, 1977). La résistance de *B. glabrata*, acquise après une première infestation par des échinostomes a également été démontrée dans ces années (Lie & Heyneman, 1975; Lie & Heyneman, 1979; Lie *et al.*, 1975). Une meilleure défense des mollusques suite à une réinfestation par *Schistosoma* a été mise en évidence plus tardivement. Une étude histologique a notamment comparé le succès d'implantation de parasites dans des mollusques ayant déjà été mis en présence de parasites homologues (Sire *et al.*, 1998). Cet échec du challenge immunitaire pourrait notamment être lié à la présence simultanée des parasites des deux infestations, conduisant à une compétition entre les parasites.

Sadd et Schmid-Hempel ont appelé ce phénomène *Specific Immune Priming* ou immunité mémoire en démontrant qu'une première exposition à un pathogène peut améliorer la réponse immunitaire du bourdon *Bombus terrestris* en cas de deuxième rencontre, et ce, sur une longue échelle de temps (trois semaines entre les deux expositions dans cette étude) (Sadd & Schmid-Hempel, 2006). Ce type de réponse a été décrit dans de nombreux modèles d'étude invertébrés comme des crustacés avec *Porcellio scaber* contre des souches de *Bacillus thuringiensis* et de *Escherichia coli* (Roth & Kurtz, 2009), ou encore des insectes comme *Drosophila melanogaster* exposées à *Streptococcus pneumoniae* (Pham *et al.*, 2007). Milutinović et Kurtz (2016) ont défini ce phénomène comme "la capacité d'un système immunitaire à stocker ou simplement utiliser l'information d'un antigène ou parasite précédemment rencontré, au moment d'une seconde exposition". Dans cette revue, ils discutent le fait que cette immunité mémoire inclut la réponse qui se dissipe après la première exposition, pour à nouveau augmenter à la seconde, ainsi que la réponse maintenue entre la primo exposition et le challenge immunitaire (seconde exposition). Avant de comprendre quels facteurs influencent l'immunité, et de quelle manière ils l'influencent, il est important de connaître les mécanismes qui composent cette immunité.

Le polymorphisme de compatibilité entre les parasites schistosomes et leurs hôtes intermédiaires Planorbidae repose en grande partie sur l'équilibre entre les mécanismes immunitaires mis en œuvre par l'hôte et les mécanismes de virulence du parasite. En effet, les variabilités de capacité immunitaire des uns et de capacité d'infestation des autres

expliquent notamment les échelles de compatibilité entre les différentes combinaisons de mollusques et de parasites. Une des premières étapes de la réponse immunitaire est la reconnaissance des parasites par des molécules spécialisées dans cette fonction, solubles ou portées à la surface des cellules immunitaires. La seconde étape consiste en l'élimination du pathogène par les systèmes effecteurs, activés par des voies de signalisation. Des stratégies de contournement des défenses immunitaires de l'hôte peuvent également être développées par les parasites, notamment en diversifiant les molécules reconnues par les récepteurs de l'hôte pour tromper ces dernières, ou en développant des anti-effecteurs pour contrer les molécules effectrices.

1. Connaître son ennemi et sonner l'alarme : la reconnaissance des pathogènes

Une réponse immunitaire ne peut être activée que si les pathogènes et molécules étrangères sont reconnus comme du non soi : c'est la fonction des récepteurs immunitaires. Ces molécules peuvent être de surface ou solubles. Les récepteurs de surface, appelés PRRs pour "*Pattern Recognition Receptors*", reconnaissent les ligands que l'on retrouve chez les microorganismes, qu'ils soient ou non pathogènes (Chu & Mazmanian, 2013). Certains identifient des motifs moléculaires précis des parasites et pathogènes, appelés PAMPs pour "*Pathogen Associated Molecular Patterns*" (Janeway Jr, 1989), d'autres peuvent reconnaître des molécules de signalisation de dommages cellulaires appelées DAMPs (*Damage Associated Molecular Patterns*) ou Alarmines (Matzinger, 1994).

Parmi les récepteurs membranaires impliqués dans la reconnaissance, on peut trouver des récepteurs de type Toll capables de reconnaître des pathogènes (Nakamoto *et al.*, 2012). Chez *B. glabrata*, la première description de récepteurs de type Toll, appelés BgTLR et leur rôle important dans sa réponse cellulaire anti-schistosomes est récente (Humphries & Deneckere, 2018; Pila *et al.*, 2016). Ces récepteurs varient en abondance selon le phénotype de compatibilité de la souche de *B. glabrata* étudiée. Par exemple, les auteurs ont démontré que la souche BgBS90, très résistante à *S. mansoni*, présente un nombre très élevé de BgTLRs, en comparaison avec une souche sensible aux parasites. De la même manière, l'expression des transcrits de BgTLRs de BgBS90 a été mesurée comme 27 fois plus forte après un challenge avec le parasite en comparaison aux naïfs, tandis qu'elle n'était pas modifiée chez la souche sensible (Pila *et al.*, 2016). Ces différents résultats démontrent l'implication de ces récepteurs dans l'efficacité de la réponse immunitaire des mollusques, ce qui a été confirmé par une expérience de *knockdown* des BgTLRs ayant induit une altération de la résistance des individus BgBS90.

Outre les récepteurs membranaires, d'autres sont solubles dans l'hémolymphe. C'est le cas notamment des *Peptidoglycan Recognition Proteins* (PGRPs) et des *Gram Negative Binding Proteins* (GNBPs), porteuses d'un domaine conservé permettant la reconnaissance de protéines de surface des pathogènes. Ces molécules, appartenant aux PRRs, sont connues pour jouer un rôle essentiel dans les voies immunitaires Toll et Imd (Hoffmann & Reichhart, 2002). Chez *B. glabrata*, plusieurs PGRPs et GNBPs ont été identifiés (Adema *et al.*, 2017; Deleury *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2007), et l'expression des gènes codant pour ces récepteurs a été démontrée comme sous-réglée suite à l'infection par divers microbes. En revanche, suite à une infestation par *S. mansoni*, aucun changement de leur expression n'a été reporté. La fonction de ces récepteurs dans le phénotype de compatibilité entre mollusques et trématodes n'a donc pas encore pu être clairement établie.

De nombreuses lectines ont été identifiées dans l'hémolymphe des mollusques. Il s'agit de protéines produites par les hémocytes (Ottaviani, 1988; Van Der Knaap *et al.*, 1981) et capables de se fixer spécifiquement et réversiblement à des carbohydrates de surfaces, leur permettant ainsi de reconnaître une particule. Elles sont relarguées dans le plasma où elles immobilisent les molécules étrangères en s'agglutinant autour d'elles. Les lectines peuvent également fonctionner comme des opsonines en favorisant la phagocytose par les hémocytes (Mullainadhan & Renwranz, 1986).

Parmi ces lectines, certaines contenant un domaine C1q (C1qDC) ont été décrites comme ayant un potentiel de reconnaissance de pathogènes chez plusieurs espèces de mollusques et l'augmentation rapide des transcrits de ces protéines, suite à une injection de bactéries ou à une infestation par *S. mansoni* confirme l'hypothèse d'un rôle important dans la reconnaissance du non soi (Adema *et al.*, 2010; Deleury *et al.*, 2012).

L'implication d'un système de lectines spécialisé dans la reconnaissance immunitaire de déterminants glycanes associés au non-soi dans l'activation des réponses immunitaires des pathogènes chez *B. glabrata*, notamment des trématodes, a été suggérée (Dunn & Yoshino, 1988; Loker, 2010; Martins-Souza *et al.*, 2011; Mitta *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2014). Or, Yoshino et ses collaborateurs ont démontré que les glycotopes (épitopes des glycoprotéines, autrement dit, molécules reconnues par les antigènes) étaient abondants et très divers structurellement et que certains d'entre eux étaient exprimés de manière variable entre les individus miracidia, ce qui suggère leur implication dans l'efficacité d'infestation, et ainsi, dans la compatibilité escargot-schistosome (Dunn & Yoshino, 1988; Martins-Souza *et al.*, 2011; Peterson *et al.*, 2009; Yoshino *et al.*, 2012).

Les *Fibrinogens-Related Proteins* (FREPs), sont des lectines solubles dans le plasma qui peuvent à la fois reconnaître des molécules membranaires mais aussi des produits d'excrétion. Cette classe de récepteurs a été identifiée pour la première fois chez les mollusques *B. glabrata* (Adema *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001). Ces molécules FREPS sont très diversifiées ((Pila *et al.*, 2017) et participent activement à la réponse immunitaire, en se liant spécifiquement à la surface de pathogènes (Gordy *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008), jouant ainsi un rôle essentiel dans la résistance aux trématodes digènes, comme les schistosomes (Coustau *et al.*, 2015; Hanington *et al.*, 2010; Mitta *et al.*, 2012; Moné *et al.*, 2010a; Pila *et al.*, 2017). En effet, leur niveau d'expression augmente en réponse à un challenge immunitaire avec ces parasites (Adema *et al.*, 1997; Hanington *et al.*, 2010). Elles ont un très haut niveau de polymorphisme et un répertoire très varié (Dheilly *et al.*, 2015; Galinier *et al.*, 2017a; Gordy *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004), ce qui pourrait notamment expliquer les différences de résistance entre les populations de mollusques. Les FREPs sont connues pour se lier à des produits d'excrétion ou de sécrétion des parasites pour former des complexes moléculaires, notamment avec des glycoprotéines de types mucines (Moné *et al.*, 2010a). Parmi ces FREPS, la FREP3 semble être essentielle au maintien du phénotype de résistance des escargots, son niveau d'expression après infestation étant beaucoup plus élevé chez les individus résistants que chez les sensibles (Lockyer *et al.*, 2012). Dans un contexte de course aux armements et pour pallier à la variabilité des FREPs des mollusques, les mucines des parasites présentent également un fort polymorphisme, avec de nombreux variants basés sur un nombre relativement faible de gènes (Roger *et al.*, 2008a). Cette propriété a conduit les auteurs ayant découvert ces protéines à les nommer les *Schistosoma mansoni Polymorphic Mucins*, ou *SmPoMucs* (Roger *et al.*, 2008b). Les mucines de surface des parasites très compatibles sont peu nombreuses mais leur répertoire est très varié (Galinier *et al.*, 2017a; Roger *et al.*, 2008b). Une stratégie d'évitement de la reconnaissance par le système immunitaire pourrait être la suppression totale de ces mucines, cependant elles sont essentielles au succès d'infestation des parasites. En effet, ces protéines ne sont exprimées qu'aux stades œufs, larves miracidia et sporocystes, avec un niveau maximal d'expression à l'état larvaire (Roger *et al.*, 2008b). De plus, elles sont localisées au niveau de la glande apicale, impliquée dans la sécrétion de produits nécessaires à la pénétration des larves dans le manteau des mollusques (Roger *et al.*, 2008; Yoshino *et al.*, 1993). Ces données démontrent leur implication dans le processus d'infestation.

L'une des hypothèses proposées est que les schistosomes utilisent le mimétisme moléculaire pour éviter la reconnaissance immunitaire (Abu-Shakra *et al.*, 1999; Damian, 1997). En effet, l'expression d'antigènes ou de molécules ressemblant à celles de l'hôte diminue la probabilité de reconnaissance des parasites par le système immunitaire de l'hôte (Yoshino *et al.*, 2013). De la même manière, augmenter la diversité des antigènes reconnus par l'hôte réduit le risque de reconnaissance, ainsi, les *SmPoMucs* pourraient être utilisées comme écran de fumée pour éviter la reconnaissance et permettre de passer au stade sporocyste (Mitta *et al.*, 2012). Il s'agit d'un bel exemple de course aux armements entre les parasites et leurs hôtes intermédiaires (Moné, 2011; Moné *et al.*, 2010a). En effet, la diversification des récepteurs impliqués dans la reconnaissance du non soi par les mollusques leur assure une identification précoce d'une grande variété d'invasif, conduisant les parasites, pour améliorer leur probabilité d'infestation, à diversifier leurs antigènes reconnus par les mollusques, ou inversement (Figure 8).

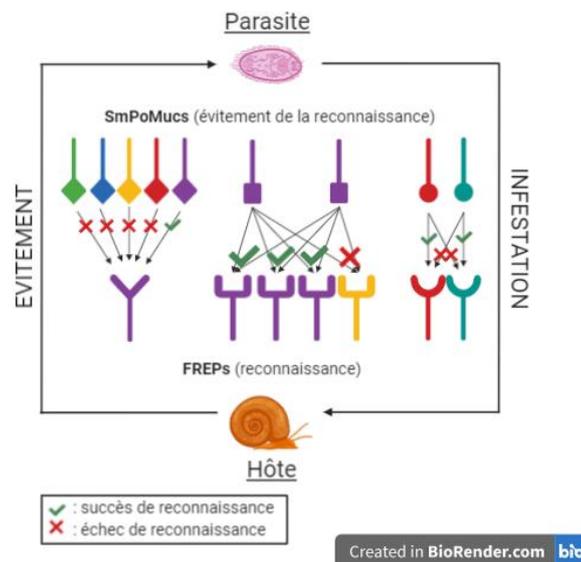


Figure 8 : Reconnaissance des *SmPoMucs* par les FREPs. A chaque type de récepteur correspond un antigène (même forme, même couleur). La diversification des premiers permet l'amélioration de l'efficacité de la reconnaissance, tandis que la diversification des antigènes augmente leur probabilité de ne pas être reconnu par leur hôte.

Un troisième protagoniste a été mis en évidence dans l'interaction entre FREPs et *SmPoMucs* : des protéines contenant des domaines Thioester, ou TEP (*ThioEster Containing Proteins*). Ces TEP jouent un rôle dans l'opsonisation, processus biochimique favorisant la phagocytose, chez *B. glabrata* (Moné *et al.*, 2010a; Wu *et al.*, 2017). Une étude a démontré l'interaction directe ou indirecte de ces TEPs avec les *SmPoMucs* et les FREPs, confirmant leur implication dans la reconnaissance et l'élimination des parasites (Moné *et al.*, 2010a).

D'autres lectines similaires au FREPs mais associées à un domaine type C ou galectine ont été identifiées et respectivement nommées *C-type lectin-RElated Protein* (CREP) ou *Galectin-RElated Protein* (GREP) (Dheilly *et al.*, 2015). Elles pourraient jouer un rôle potentiel dans la reconnaissance immunitaire. En effet, des galectines peuvent être impliquées dans la reconnaissance de virus, bactéries, champignons et protozoaires (Vasta *et al.*, 2012). La galectine identifiée chez *B. glabrata* (BgGAL) jouerait un rôle potentiel dans la reconnaissance de certains pathogènes (Dheilly *et al.*, 2015; Yoshino *et al.*, 2008).

2. Organiser les troupes : les voies de signalisation

Une fois les pathogènes identifiés, la réponse immunitaire est activée par des voies de signalisation. Celles-ci produisent des molécules qui enclenchent la production d'effecteurs immunitaires, et de cellules de communication, ou encore l'inflammation.

Lors de l'analyse des transcrits exprimés par les hémocytes circulants de *B. glabrata*, Mitta et ses collaborateurs ont mis en évidence des transcrits aux séquences similaires à des cytokines MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*) (Mitta *et al.*, 2005). La localisation de leur expression, dans les cellules immunitaires que sont les hémocytes, suggère un rôle de ces molécules dans l'immunité des mollusques (Garcia *et al.*, 2010). En effet, un *knockdown* des gènes codant pour ces protéines a impacté l'encapsulation des sporocystes de *S. mansoni in vitro*. Cette même expérience *in vivo* a empêché les modifications de populations d'hémocytes circulants en réponse à une infestation par le parasite, conduisant à une augmentation du succès d'infestation (Garcia *et al.*, 2010). Ces résultats ont permis de caractériser le rôle des BgMIF dans les processus de signalisation immunitaire chez *B. glabrata*.

Une étude a analysé les profils d'expression de différents gènes après exposition à des bactéries et a ainsi pu identifier les transcrits impliqués notamment dans les voies de signalisation (Deleury *et al.*, 2012). Parmi eux, les auteurs ont identifié de nombreuses protéases à sérines et inhibiteurs de protéases, potentiellement associés à des cascades enzymatiques régulant des voies de signalisation telle que la voie Toll (El Chamy *et al.*, 2008). La voie Toll est une voie de signalisation connue chez de nombreux invertébrés. La présence de molécules homologues à celles impliquées dans sa régulation, comme des récepteurs types Toll (voir I. C. 1.) laisse penser que cette voie est bel et bien présente chez *Biomphalaria glabrata*, bien qu'elle n'ait, à ma connaissance, pas encore été clairement identifiée.

Des transcrits codant pour des calmodulines, protéines connues chez les vertébrés pour jouer un rôle dans l'activation de nombreuses protéines, notamment d'enzymes majeures

de la réponse immunitaire (Hoeflich & Ikura, 2002; Racioppi & Means, 2008; Smallwood *et al.*, 2006), ont également été identifiés chez *B. glabrata* (Deleury *et al.*, 2012). Les interactions entre ces calmodulines et *B. glabrata* ont été étudiées par reconstruction phylogénétique : en effet, ces molécules sont hautement conservées, avec seuls quelques acides aminés différents entre celles des vertébrés et celles des invertébrés (Simpson *et al.* 2005). Les séquences des calmodulines identifiées chez *B. glabrata* formaient un cluster très clair avec celles des vertébrés et des plantes, suggérant une homologie fonctionnelle entre ces molécules. De plus, leur différentiel d'expression après l'injection de bactéries renforce l'hypothèse de l'implication des calmodulines dans les mécanismes immunitaires (Deleury *et al.*, 2012).

Des études menées sur la réponse immunitaire de *Drosophila* ont démontré que les récepteurs PGRP et GGBP jouaient un rôle essentiel dans l'activation et le contrôle en amont des voies de signalisation Toll/Imd (Gobert *et al.*, 2003; Hoffmann, 2003; Lemaitre & Hoffmann, 2007). Plus précisément, les formes courtes de PGRP associées aux GGBP étaient impliquées dans l'activation de la voie Toll (Gobert *et al.*, 2003; Lemaitre & Hoffmann, 2007) et les formes longues, dans la régulation de la voie Imd (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Zaidman-Rémy *et al.*, 2006). La voie *Immune Deficiency* (IMD) est impliquée dans la régulation de l'immunité de plusieurs espèces d'invertébrés (Cirimotich *et al.*, 2010; De Gregorio *et al.*, 2002). Elle joue également un rôle dans le contrôle de la charge bactérienne du microbiote, par le biais de régulateurs de type PGRP qui améliorent la tolérance de l'hôte au microbiote (Clayton *et al.*, 2014; Gendrin *et al.*, 2017). La présence de formes courtes et longues de PGRP et de GGBP chez *B. glabrata* suggère une potentielle implication de ces molécules dans ces voies de signalisation.

De nombreuses molécules ont donc été caractérisées chez *B. glabrata* comme homologues de molécules connues impliquées dans les voies de signalisation de l'immunité des invertébrés. Cette implication dans notre modèle reste hypothétique, les voies de signalisation étant encore mal caractérisées, cependant, les hauts niveaux d'homologie et les dynamiques d'expression de transcrits de ces molécules lors d'un challenge immunitaire suggère tout de même fortement leur rôle dans l'immunité.

3. Lancer l'offensive : les effecteurs immunitaires

L'activation de ces différentes voies de signalisation engage l'initialisation de mécanismes et la production d'effecteurs immunitaires. Comme leur nom l'indique, les effecteurs sont des cellules et molécules qui vont répondre aux stimuli envoyés par les voies de signalisation suite à la reconnaissance de pathogènes, et agir sur ces derniers.

Ces mécanismes peuvent être distingués selon s'ils appartiennent à la composante cellulaire ou à la composante humorale de l'immunité. La première correspond à la barrière physique, soit le mucus et l'épithélium qui isolent l'organisme des pathogènes, ou les cellules immunitaires que sont les hémocytes chez les invertébrés. Au sein de ces cellules, plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réponse immunitaire, comme la phagocytose (ingestion de particules par une cellule), l'encapsulation (ingestion de plus grosses particules par plusieurs cellules immunitaires) ou la mélanisation (prolifération de pigments de mélanine sur le site d'une plaie ou d'une infection, réponse spécifique des arthropodes). La réponse humorale, quant à elle, oppose des barrières moléculaires telles que la production de peptides antimicrobiens (AMP) (Lowenberger, 2001; Meister *et al.*, 2000; Zhang & Gallo, 2016), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (NOS) (Bogdan *et al.*, 2000; Sadekuzzaman *et al.*, 2017) ainsi que la régulation de processus tels que la coagulation (Muta & Iwanaga, 1996).

Ces deux réponses peuvent cependant être interconnectées, des processus humoraux étant à l'origine de mécanismes cellulaires. De plus, la réponse cellulaire et la réponse humorale peuvent agir de concert ou de manière différée, et peuvent être spécifiques ou non selon le type de stress immunitaire.

a) La réponse cellulaire

Les premiers effecteurs de la réponse cellulaire sont les hémocytes. Ils jouent un rôle dans plusieurs processus immunitaires nécessaires à l'élimination de parasites et pathogènes. Van der Knaap & Loker ont été parmi les premiers à décrire les interactions immunitaires entre les mollusques et les parasites et à mettre en évidence que le système immunitaire des mollusques était capable de reconnaître le non soi et d'éliminer efficacement même des doses massives de bactéries vivantes injectées (Van Der Knaap & Loker, 1990). Ils ont notamment bien étudié les cellules immunitaires que sont les hémocytes. Il s'agit de cellules circulantes de l'hémolymphe, cette dernière équivalente, chez les invertébrés, du sang des vertébrés. Le système circulatoire des escargots étant ouvert, l'hémolymphe et les hémocytes circulent librement entre les tissus. Les hémocytes sont produits notamment par la glande hématopoïétique (Lie *et al.*, 1975; Rondelaud & Barthe, 1981). Des expériences de transplantation de cet organe d'individus *B. glabrata* résistants à l'infestation par *S. mansoni* sur des individus sensibles ont montré une amélioration de la résistance de ces derniers (Sullivan *et al.*, 1995; Vasquez & Sullivan, 2001). De plus, l'hématopoïèse semble être stimulée par la présence de particules de parasites tels que *E. paraensi* et *S. mansoni* (Noda, 1992; Salamat & Sullivan, 2009). L'activité intracellulaire des hémocytes, à travers l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de protéines,

le trafic membranaire et la respiration mitochondriale, augmente chez les mollusques résistants, après exposition à des miracidia (Lockyer et al., 2012; Raghavan et al., 2003), ce qui est cohérent avec la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

Plusieurs types d'hémocytes ont été décrits : les hyalinocytes se reconnaissant par leur forme arrondie alors que les granulocytes sont reconnaissables par la présence de pseudopodes autour de la cellule, leur permettant la phagocytose. La phagocytose consiste en l'ingestion des particules étrangères par des hémocytes spécialisés, et a notamment été démontrée chez le gastéropode *B. glabrata* (Cheng, 1975; Pila et al., 2017). Dans ce modèle, la phagocytose sert à détruire les particules restantes des larves de schistosome, comme certaines molécules relarguées lorsque les miracidia se développent en sporocystes (Hanington et al., 2010; Pila et al., 2017). Une fois les particules enfermées dans les phagosomes, ceux-ci fusionnent avec des lysosomes dont les produits lytiques éliminent le contenu (Figure 9).

L'encapsulation suit le même principe, mais cette fois, ce sont plusieurs hémocytes qui vont s'agglomérer autour du pathogène (Figure 9). Ce type de réponse est essentielle à *B. glabrata* pour lutter contre des parasites et pathogènes (Harris, 1975; Harris & Cheng, 1975; Loker et al., 1982). Les individus les plus résistants aux schistosomes présentent un plus grand nombre de granulocytes (Larson et al., 2014), suggérant que ce type cellulaire est particulièrement impliqué dans la défense contre les envahisseurs.

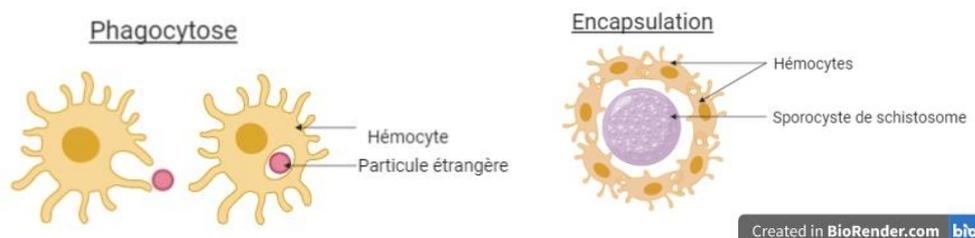


Figure 9 : Phagocytose de particule étrangère et encapsulation de sporocyste de schistosome par les hémocytes de Planorbidae.

Un autre processus de la réponse cellulaire est appelé mélanisation et intervient notamment suite à une plaie. De la mélanine est alors rapidement synthétisée sur la zone de la blessure, afin de contenir l'infection et faciliter la cicatrisation (Cerenius & Söderhäll, 2004; Volz et al., 2006). Ce processus est un exemple type de l'interconnexion entre les deux composantes de l'immunité, puisque la voie de la phénol-oxydase (PO), mécanisme humoral, est notamment impliquée dans la synthèse de mélanine (Cerenius & Söderhäll, 2004). Quelques travaux ont déjà mis en évidence la production de PO et son lien avec l'immunité dans les mollusques comme les huîtres *C. gigas* (Thomas-Guyon et al., 2009) ou *Saccostrea glomerata* (Butt & Raftos, 2008). Une corrélation existe également entre la

diminution de l'activité de la PO et l'occurrence de certaines maladies chez les bivalves marins (Luna-Acosta *et al.*, 2017), cependant la synthèse de mélanine dans le cadre de la défense immunitaire n'a encore jamais été mis en évidence dans ce clade à ma connaissance.

Malgré l'efficacité de la réponse cellulaire, si les pathogènes ne sont pas reconnus, elle ne sera pas déclenchée et le pathogène pourra proliférer. Une hypothèse propose que les individus *B. glabrata* sensibles à l'infestation à *S. mansoni* ne reconnaissent pas les parasites, empêchant l'activation de la machinerie de la réponse cellulaire (Coustau *et al.*, 2015). Il se pourrait également que les hémocytes soient inhibés par des produits des miracidia interférant ainsi avec leurs capacités de défense. Enfin, les parasites pourraient utiliser le mimétisme moléculaire pour atténuer leur reconnaissance et établir une réciprocité effecteurs/anti-effecteurs (Abu-Shakra *et al.*, 1999; Coustau *et al.*, 2015; Damian, 1997; Mitta *et al.*, 2017) (voir I. C. 1.). Sans l'immunité cellulaire, il n'y a pas d'encapsulation par les hémocytes, et le parasite peut alors s'établir dans l'hôte. La réponse cellulaire n'est cependant pas la seule à intervenir, un autre type de défenses immunitaires se met en place : la réponse humorale.

b) La réponse humorale

Elle correspond à la part des défenses immunitaires liée à la production de molécules effectrices participant à l'élimination de parasites, pathogènes et corps étrangers. Les hémocytes sont également impliqués dans ce type de réponse, comme précurseurs de nombreux effecteurs immunitaires (Adema *et al.*, 1997; Iijima *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2007).

Parmi ces molécules, les composés chimiques hautement réactifs dérivés de molécules d'oxygène (ROS) ou de l'azote (NOS) peuvent jouer un rôle dans la réparation des tissus, la cicatrisation et l'hématopoïèse (Buchon *et al.*, 2013). La production de ce type de molécules par les hémocytes a été montrée à la fin des années 80 chez les mollusques, et notamment *B. glabrata* (Dikkeboom *et al.*, 1988; Shozawa *et al.*, 1989). Leur rôle essentiel, suite à une stimulation immunitaire notamment suite à la phagocytose de particules étrangères, dans la destruction des sporocystes de trématodes a ensuite été soulignée (Adema *et al.*, 1994). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est parmi les plus efficaces dans l'élimination des parasites (Bayne & Hahn, 2001; Hahn *et al.*, 2000, 2001; Humphries & Yoshino, 2008). C'est d'ailleurs la production de cette molécule qui est fortement stimulée après pénétration des miracidia dans le manteau, et reconnaissance par le système immunitaire. Afin de s'adapter aux attaques oxydatives de son hôte, *S. mansoni* a développé un système antioxydant avec des molécules capables d'emprisonner les ROS,

appelées *ROS scavengers* (Moné *et al.*, 2011) (Figure 10). Ces travaux ont, par ailleurs, démontré une coévolution sympatrique très forte entre les parasites et leurs hôtes intermédiaires, avec un lien très clair entre le niveau d'oxydants et d'antioxydants. Ces molécules pouvant également être cytotoxiques pour *B. glabrata*, un système de détoxification enzymatique a été mis en place par ce dernier, et intervient au moment de l'infestation (Adema *et al.*, 2010; Hanington *et al.*, 2010b)

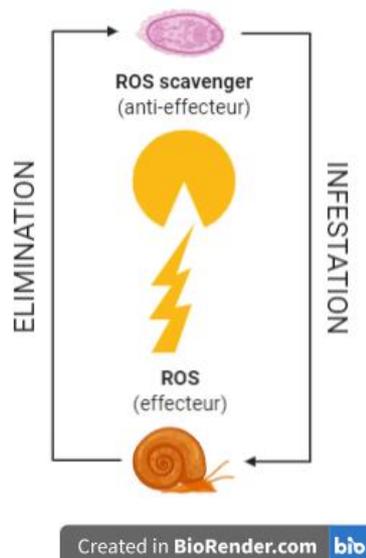


Figure 10 : Production de ROS par les Planorbidae pour éliminer les parasites et défense de ces derniers par production de ROS-scavengers

En complémentarité des ROS et NOS, les protéines et peptides antimicrobiens (AMP) jouent également un rôle essentiel dans l'élimination des parasites. En effet, ils sont synthétisés et sécrétés dans l'hémolymphe suite à une infection et sont essentiels à l'élimination des bactéries et autres pathogènes résistants aux ROS (Buchon *et al.*, 2014). Chez *B. glabrata*, le répertoire d'AMP semble très réduit en comparaison à celui d'autres invertébrés, avec seulement quelques molécules identifiées. Parmi elles, on retrouve notamment six biomphamacines, appartenant à la famille des macines, ainsi que des achacines. Les *Lipopolysaccharides Binding Proteins/Bactericidal Permeability Increasing* (LBP/BPI) sont également des protéines antibactériennes. Les gènes codant pour cette famille de molécules ont été montrés comme étant surexprimés, principalement après une infestation par un échinostome (Guillou *et al.*, 2007). L'une de ces LBP/BPI est exprimée dans la glande albumen (Guillou *et al.*, 2007) et représente la protéine principale retrouvée dans les masses d'œufs de *B. glabrata* (Hathaway *et al.*, 2010). Elle a une activité antibactérienne, mais également antifongique contre les oomycètes de champignons aquatiques (Baron *et al.*, 2013). Une étude dans laquelle j'ai été impliquée a étudié le profil d'expression de ces différentes molécules au cours d'une infestation et des perturbations microbiennes qui en découlaient (voir II. C. 1.). L'expression d'un gène

codant pour une autre protéine antimicrobienne, la *MacroPhage Expressed Gene-1* (MPEG1), appartenant à la superfamille des protéines *Membrane-Attack Complex/Perforin* (MACPF) est augmentée dans les hémocytes de mollusques résistants infestés par *S. mansoni* (Bathige *et al.*, 2014; Ittiprasert *et al.*, 2010). Le rôle de ces AMP et protéines antimicrobiennes dans la lutte antiparasitaire mérite cependant d'être approfondi. Ces premiers résultats permettent d'envisager un lien potentiel (direct ou indirect) entre l'efficacité de la réponse immunitaire et l'ensemble des microorganismes interagissant avec l'hôte, appelé le microbiote, comme cela a été démontré dans de nombreux modèles (voir I. E.).

Une activité transcriptionnelle systémique a été détectée suite à la pénétration des larves de parasites dans l'escargot. Cette réponse peut être le produit de processus inflammatoires liés aux blessures mécaniques (Blankespoor & van der Schalie, 1976) ou protéolytiques des larves (Yoshino *et al.*, 1993). En particulier, des inhibiteurs de protéases comme les cystatines ou les inhibiteurs de protéases à sérines sont sur-régulés dans les hémocytes d'individus résistants après une infestation par des schistosomes ou des échinostomes (Mitta *et al.*, 2005; Yoshino & Coustau, 2011). Ces facteurs ont pour rôle de contrer les protéases des parasites et de rétablir les propriétés adhésives des hémocytes et autres facteurs immunitaires à la surface des parasites. Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation du niveau d'expression de cystatines dans les hémocytes qui s'aggrègent sur le site de pénétration et ceux qui participent à l'encapsulation d'*Echinostoma caproni* (Guillou *et al.*, 2007).

Enfin, le système immunitaire de certains invertébrés est capable de produire des toxines, comme chez *B. glabrata*, où des biophalysines, toxines de type aérolysine, ont été identifiées dans les hémocytes (Moné *et al.*, 2010). Elles ont été caractérisées comme appartenant à la famille des β *Pore-Forming Toxins* (β -PFT) et comme étant hautement toxiques pour *S. mansoni* (Galinier *et al.*, 2013), bien que leur niveau d'expression ne soit pas modifié suite à un challenge parasitaire. Certaines sont capables de se fixer à la surface de bactéries ou de levures, mais leur toxicité envers ces microorganismes n'a pas encore été démontré (Tetreau *et al.*, 2017).

4. Un système immunitaire sous influence...

Outre les différents mécanismes et molécules impliqués dans la réponse immunitaire de l'hôte, d'autres facteurs intrinsèques à ce dernier sont à prendre en compte. Par exemple, le stade de développement influence la manière dont le système immunitaire réagit, avec une acquisition graduelle de l'immunité, qui est accélérée en cas de multi-infection. En effet, chez les insectes, une étude a été menée sur l'immunité au cours de différents stades

de développement de l'abeille *Apis mellifera*, qui a démontré une corrélation entre l'âge des individus et l'efficacité de l'immunité (Wilson-Rich *et al.*, 2008). En effet, l'activité de phénol-oxidase (PO), un composant majeur de l'immunité des invertébrés dans l'hémolymph (Söderhäll & Cerenius, 1998), augmente au cours de la vie des abeilles. Une variation de l'immunité et de la sensibilité des criquets *Anabrus simplex* à une infection fongique a également été démontrée au cours de l'ontogénie (Srygley, 2012). Chez d'autres modèles, comme le coléoptère *Dendroctonus valens*, l'immunocompétence augmente au cours du développement pour finalement diminuer au stade adulte (Shi & Sun, 2010). Les auteurs ont également remarqué, dans cette étude, une différence dans la capacité immunitaire selon le sexe des individus. Concernant les mollusques, des variations d'expression de gènes immunitaires ont également été corrélées avec les stades de développement notamment chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Balseiro *et al.*, 2013). En effet, dans ce modèle, l'expression de nombreux gènes immunitaires (de peptides antimicrobiens, de précurseurs de peptides antifongiques, de MIF, de lysozymes ou de FREPs) augmente au cours des différents stades développementaux. Il semblerait qu'au tout premier stade larvaire, les larves soient encore protégées par l'immunité de leur mère, qui se dissipe ensuite petit à petit (diminution des transcrits immunitaires). Ces résultats suggèrent que les mécanismes immunitaires émergent au cours du développement des moules, une fois l'immunité de leur mère dissipée, leur permettant de faire face aux infections liées aux microorganismes de l'environnement (Balseiro *et al.*, 2013). Les mêmes observations ont été faites chez l'huître *Crassostrea gigas* dont les oocytes et les embryons au stade 2-4 cellules sont protégés par l'immunité maternelle dans un premier temps avant que l'immunité propre se mette en place au cours du développement larvaire (Tirapé *et al.*, 2007). Ceci se traduit par l'expression de gènes immunitaire tels que des AMP (*Cg-def*, *Cg-LBP/BPI*), des ROS (*Cg-EcSOD*), des inhibiteurs de métalloprotéases (*Cg-timp*) ou d'autres molécules exprimées dans les hémocytes (*Cg-tal*, *Dscam3*) (Tirapé *et al.*, 2007). L'immunité et les capacités immunitaires semblent donc influencées par le développement et l'âge de l'animal dans plusieurs modèles.

Bien que les facteurs intrinsèques à l'hôte jouent un rôle essentiel dans sa réponse immunitaire, celle-ci est également influencée par d'autres facteurs. Il s'agit par exemple de facteurs écologiques, c'est-à-dire des facteurs de l'environnement dans lequel évolue l'hôte. Parmi ces facteurs, certains sont abiotiques, autrement dit des facteurs physico-chimiques qui interagissent avec l'hôte (action du non vivant sur le vivant), d'autres sont biotiques, autrement dit concernant des interactions entre le vivant.

Le régime alimentaire peut notamment influencer les capacités immunitaires de l'hôte. En effet, chez *A. mellifera*, en comparaison à un régime monofloral, un régime polyfloral augmente l'activité de la glucose oxydase (GOX) (Alaux *et al.*, 2010), enzyme permettant la synthèse de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) aux propriétés antifongiques (Takakura, 2015). Un autre facteur pouvant impacter l'immunocompétence des organismes est la température. Par exemple, la fièvre est une stratégie du système immunitaire permettant de lutter contre les infections, suggérant que la température a un effet sur le développement de pathogènes ou parasites. Long et ses collaborateurs ont testé l'effet d'une augmentation de la température *in vitro* sur les capacités développementales du parasite responsable de la malaria, *P. falciparum* et ont montré que ce stress, mimant la fièvre des patients lors d'une crise de paludisme, inhibe la croissance des parasites (Long *et al.*, 2001). Il existe plusieurs études ayant démontré les effets positifs de chocs thermiques sur l'immunocompétence d'un organisme. Par exemple, l'expression de protéines impliquées dans la défense immunitaire (protéines *heat-shock*, HSP) est stimulée par une augmentation forte et rapide de la température suivie de l'infection par des pathogènes ou des composés de pathogènes chez plusieurs espèces. Chez la mouche *Musca domestica*, l'augmentation de la protéine Hsp70 après un choc chaud stimule sa réponse à l'infection par *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (Tang *et al.*, 2012), tout comme la Hsp90 de la mite géante *Galleria mellonella* (Wojda & Jakubowicz, 2007; Wojda & Kowalski, 2013), ou encore Hsp27 et Hsp68 lors d'injection de LPS dans le coléoptère *Tribolium castaneum* (Altincicek *et al.*, 2008).

La fièvre est un moyen pour un organisme endotherme (capable de produire de la chaleur via son activité métabolique) de lutter contre une infection, qui peut être médiée par des métabolites de cet organisme, comme les pyrogènes endogènes qui stimulent la synthèse de prostaglandine. Les animaux ectothermes (dont la température corporelle est régulée uniquement par l'environnement), comme les insectes, sont incapables de produire ces métabolites inducteurs de fièvre. Certains ont donc développé une stratégie alternative pour lutter contre les infections, par le biais de l'augmentation de la température corporelle : ils se placent dans des zones plus chaudes, ce qui augmente leur température et provoque ce que l'on appelle une fièvre comportementale. Ce phénomène a été observé dans plusieurs espèces, dont par exemple les criquets *Acheta domesticus* et *Gyllus bimaculatus*, qui se déplacent dans des zones augmentant leur température de 6°C lorsqu'ils sont infectés par les bactéries *Rickettsia grylli* (Adamo, 1998; Louis *et al.*, 1986). Le locuste *Schistocerca gregaria* se rend dans des zones augmentant sa température de 40 à 44°C en cas d'infection fongique par *Metarhizium anisopliae* (Blanford & Thomas, 1999; Bunday *et al.*, 2003). Cette fièvre comportementale peut ralentir

le développement des pathogènes qui les infectent ou directement les éliminer. A l'inverse, une étude a démontré un accroissement de la sensibilité des mollusques *B. glabrata* à l'infestation parasitaire par le parasite *S. mansoni* suite à une exposition à une température élevée (Ittiprasert & Knight, 2012). De plus, l'acclimatation de mollusques à une température plus élevée (33°C) que leur température d'élevage optimale (26°C) a pu être transmise à leur descendants, ceux-ci étant alors sensibles aux parasites même lorsqu'ils sont placés à la température d'élevage (Knight *et al.*, 2015). Ces résultats n'ont, cependant, pas pu être reproduits par d'autres chercheurs qui, malgré l'observation d'une augmentation de l'expression d'HSP, n'ont pu établir de corrélation avec la sensibilité des mollusques face aux parasites (Nelson *et al.*, 2016).

Outre le régime alimentaire et la température, la présence de polluants dans le milieu peut également sensibiliser les organismes aux affections pathogéniques (cas de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en présence de forts taux de nickel (Minguez *et al.*, 2012)) ou au contraire, les rendre plus résistants (cas de *Lymnaea natalensis* pré-exposée au cadmium avant une infestation parasitaire par *Fasciola gigantica* (Soliman, 2009)).

Le second type de facteur écologique pouvant agir sur l'immunité d'un organisme concerne les facteurs biotiques, dont notamment le phénomène de co-infection, autrement dit, l'intervention d'un troisième acteur dans une interaction hôte/pathogène ou hôte/parasite. Certaines interactions peuvent, en effet, diminuer la transmission du parasite ou pathogène, c'est le cas de la co-infection entre *Heterorhabditis baujardi* et *Fasciola hepatica* ou *Fasciola gigantica* (Tunholi *et al.*, 2017) et de *Angiostrongylus cantonensis* et *S. mansoni* (Tunholi-Alves *et al.*, 2011) ; d'autres réduisent la parasitémie, autrement dit l'intensité de l'infection et/ou les symptômes de la maladie, comme dans le cas de l'interaction entre *Trichinella spiralis* et *Plasmodium falciparum* (Ngwenya, 1982), de *Wolbachia* et *P. falciparum* (Hughes *et al.*, 2011) ou *berghei* (Kambris *et al.*, 2010) et de *Plasmodium sp.* et le virus du chikungunya (Teo *et al.*, 2018a; Teo *et al.*, 2018b). Cependant, certains de ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus dans d'autres études, rendant difficile une conclusion sur les effets d'une co-infection sur les mécanismes immunitaires.

Un autre facteur biotique, dont l'étude est aujourd'hui presque incontournable est le microbiome. Ce compartiment est au centre de nombreuses études depuis 2008, année à laquelle l'Institut National de la Santé (*National Institute in Health*, NIH) a financé le *Human Microbiome Project* (HMP), dont le but était de caractériser le microbiome de l'Homme et de comprendre son rôle dans sa santé (Qin *et al.*, 2010). Le terme "**microbiome**" correspond à l'ensemble des génomes du microbiote associé à un système,

qu'il s'agisse d'un organisme ou d'une niche écologique (Hernandez-Agreda *et al.*, 2017; Theis *et al.*, 2016). Ce **microbiote**, quant à lui, se rapporte à l'ensemble des microorganismes, quelle que soit leur nature, interagissant avec cet hôte, ce système, à un temps donné. Il peut s'agir de bactéries, de virus, ou d'eucaryotes uni- ou pluricellulaires appartenant aux protistes, aux champignons, aux plathelminthes..., vivant dans un environnement défini, qu'ils soient pathogènes, neutres ou positifs au temps où ils sont analysés. De nombreux travaux se sont alors focalisés sur la caractérisation du microbiote et son rôle chez l'Homme, mais également chez d'autres vertébrés et chez les invertébrés. Les interactions entre un hôte et son microbiote sont diverses et peuvent être bénéfiques, négatives ou neutres à l'un, l'autre ou les deux protagonistes.

D. Interactions, microbiote et holobionte

1. Les différents types d'interactions entre organismes

Il existe plusieurs types d'interactions biotiques entre organismes, situées le long d'un continuum selon les effets qui s'appliquent à l'un et à l'autre, et qui ont notamment été décrites par Claude Combes (Combes, 1995) (Tableau 1).

Tableau 1 : Les différents types d'interactions biotiques. (+) : effet positif ; 0 : effet neutre ; (-) : effet négatif

Espèce 1 Espèce 2	+	0	-
+	+ / + Mutualisme	+ / 0 Commensalisme	+ / - Parasitisme
0	0 / + Commensalisme	0 / 0 Neutralisme	0 / - Amensalisme
-	- / + Prédation	- / 0 Amensalisme	- / - Compétition

Un organisme peut par exemple tirer profit d'un autre au détriment de celui-ci : c'est le cas du parasitisme ou de la prédation. Dans le premier cas, un organisme vit de façon durable au détriment d'un autre, tirant des bénéfices de ce dernier, en termes de nutrition, de développement, de protection, de transmission (comme c'est le cas des parasites de la reproduction tels que les bactéries du genre *Wolbachia* (Werren *et al.*, 2008)), etc. En ce qui concerne la prédation, un organisme tire un bénéfice immédiat d'un autre en se nourrissant de lui. Dans les deux cas, l'hôte ou la proie est affecté par cette interaction, de manière durable ou immédiate, soit par une dépense d'énergie pour lutter contre le parasite/pathogène ou le prédateur, soit parce que ces derniers réduisent sa survie ou sa valeur sélective, tout en tirant un bénéfice comme la mise à profit de l'hôte/la proie comme ressource alimentaire, niche écologique, moyen de propagation etc... Le

parasitisme est notamment à l'origine de nombreuses maladies, chez les plantes et les animaux, vertébrés comme invertébrés, ayant parfois des conséquences économiques importantes. Parmi les parasites protozoaires les plus connus de l'Homme, on trouve le genre *Plasmodium* qui cause notamment le paludisme, mais qui, selon l'espèce, infecte également d'autres primates, des oiseaux ou des lézards. De la même manière, les vers trématodes du genre *Schistosoma* provoquent la bilharziose, une maladie tropicale négligée, chez l'Homme, mais également chez d'autres espèces de mammifères comme les bovins ou les rongeurs. Ces deux parasites, comme de nombreux autres, ont un cycle de vie complexe, c'est-à-dire qu'ils doivent infecter un hôte intermédiaire (au sein duquel les parasites se multiplient de manière asexuée) pour achever leur développement et pouvoir infecter leur hôte définitif (reproduction sexuée). Ces hôtes intermédiaires peuvent être des vertébrés, l'Homme dans le cas de *Plasmodium* ou des invertébrés, des Planorbidae dans le cas de *Schistosoma*. Les hôtes, qui peuvent également transmettre l'agent responsable des maladies de manière active s'ils sont vecteurs (morsure, piqûre...) ou passive s'ils ne sont qu'hôtes intermédiaires, peuvent également être affectés par sa présence : ils établissent donc également une interaction de type parasitisme.

A l'inverse de ce type d'interaction, certaines sont bénéfiques aux deux protagonistes, chacun tirant profit de la symbiose. Ce type d'interaction est également très fréquent dans la nature et peut se faire entre deux macroorganismes, un macroorganisme et un microorganisme ou deux microorganismes. Parmi les exemples, on peut citer celle de certains dinoflagellés (algues unicellulaires) avec les coraux sclératiniens (*Scleratinia*). La famille des Symbiodiniaceae de ces dinoflagellés constitue le plus répandu des symbiotes d'organismes marins, dont des cnidaires, des plathelminthes, des mollusques, des porifères ou des foraminifères (Pawłowski *et al.*, 2001; Trench, 1979). Stat et ses collaborateurs ont regroupé les travaux sur ces microorganismes, et détaillent la nature de l'interaction par leurs capacités notamment à transmettre une partie de leurs produits photosynthétiques à leur hôte (sous forme de glycérol, de peptides, d'acides aminés, de sucres etc.) (Stat *et al.*, 2006). Leur productivité peut également être mise à profit par les coraux pour la calcification et, par conséquent, la formation de branches supplémentaires. En échange de ces apports, l'hôte leur procure une niche écologique ainsi que des nutriments inorganiques provenant de son métabolisme (ammonium, phosphate etc.) (Stat *et al.*, 2006). Lors d'un épisode de stress, les coraux subissent un phénomène appelé "blanchissement" : leurs polypes expulsent leurs symbiotes dinoflagellés qui sont naturellement colorés.

Il s'agit là d'un exemple de symbiose mutualiste obligatoire, c'est à dire une symbiose sans laquelle l'un des organismes de cette association ne peuvent survivre. C'est également le cas des symbioses alimentaires, dans lesquelles le régime alimentaire des hôtes ne leur procure pas tous les nutriments nécessaires et/ou ils ont perdu la capacité à synthétiser certains métabolites et/ou encore leurs capacités digestives sont insuffisantes pour dégrader tous les éléments nutritifs. Ces symbioses sont si spécifiques et obligatoires qu'il n'est pas rare de voir les bactéries intégrées, telles des organelles, dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes. Une association obligatoire bien étudiée est celle entre les pucerons du genre *Acyrtosiphon* et les bactéries *Buchnera* qui sont internalisées dans des bactériocytes formés au cours du développement du puceron (Miura *et al.*, 2003) et les supplémentent en acides aminés (Shigenobu *et al.*, 2000). Des traitements antibiotiques, et donc l'élimination des bactéries obligatoires, ont mis en évidence une corrélation entre la présence des bactéries et les capacités reproductrices des pucerons, le nombre de descendants étant réduit en conditions traitées (Douglas, 1992; Srivastava & Auclair, 1976).

Les bactéries *Ishikawaella capsulata*, vivent également dans des cryptes spécialisées du système digestif de la punaise *Megacopta punctatissima*, à qui elles procurent les acides aminés nécessaires pour compléter son régime basé sur de la sève de plantes (Hosokawa *et al.*, 2006; Nikoh *et al.*, 2011). Ces bactéries présentent les caractéristiques principales d'un symbiote obligatoire : transmission verticale stricte, coévolution avec son hôte, taille du génome réduite mais conservation des gènes nécessaires à l'approvisionnement en acides aminés (Hosokawa *et al.*, 2006; Nikoh *et al.*, 2011). Une partie du système digestif du gendarme, *Pyrrhocoris apterus* est colonisé par des communautés spécifiques transmises maternellement (Sudakaran *et al.*, 2012) et impliquées dans la supplémentation alimentaire et le développement (Salem *et al.*, 2013).. Dans certaines interactions, il est possible de trouver des intégrations de gènes symbiotiques dans le génome de l'hôte : c'est souvent le cas des virus mutualistes, comme dans l'exemple d'*Aedes aegypti* et *A. albopictus* (Palatini *et al.*, 2017) ou de la guêpe parasitoïde *Microplitis demolitor* (Burke *et al.*, 2018).

Les symbioses alimentaires sont également nécessaires pour les organismes se nourrissant de sang, ce régime ne suffisant pas à fournir tous les nutriments indispensables. Les vecteurs des parasites trypanosomes, *Rhodnius prolixus* sont justement associés spécifiquement avec les actinomycètes *Rhodococcus rhonii*, dont l'acquisition se fait par coprophagie et qui supplémentent le régime alimentaire de leurs hôtes (Beard *et al.* 2002;

Eichler & Schaub, 2002). Il en est de même pour la mouche tsé-tsé, *Glossina sp.*, dont les symbiotes *Sodalis glossinidus* jouent le même rôle (Attardo et al., 2008).

Outre l'apport en nutriments essentiels, certains symbiotes peuvent également aider leur hôte à la digestion complexe de certains aliments, comme par exemple le bois pour les organismes xylophages, dont les communautés microbiennes sont spécifiques à la dégradation de la cellulose (Anand et al., 2010; Kaufman & Klug, 1991). L'exemple des capricornes *Anaplophora glabripennis* et des termites *Zootermopsis angusticollis* illustre bien ce processus, avec l'implication à la fois de microorganismes fongiques, mais également bactériens dans la digestion de la lignine (Le Roes-Hill et al., 2011; Schloss et al., 2006).

Au sein d'un même organisme, on peut trouver plusieurs types d'interactions (parasitisme, mutualisme...) au même moment. Schulenburg et Félix ont, d'ailleurs, récemment décrit les différentes interactions entre le nématode *C. elegans* et des microorganismes, allant de la compétition au mutualisme en passant par le parasitisme (Schulenburg & Félix, 2017).

Une interaction peut évoluer selon une grande variété de facteurs et ne pas demeurer la même tout le long de la vie d'un organisme. Un stress environnemental, une modification du régime alimentaire ou encore l'âge sont autant de facteurs qui peuvent modifier la nature d'une interaction entre organismes. Ces interactions ne doivent donc pas être considérées comme à sens unique et invariables. C'est le cas notamment de l'interaction entre les coraux sclératinières et les algues Symbiodiniaceae qui leur sont associées (Blackstone & Golladay, 2018). En effet, lors de l'augmentation des températures du milieu dans lequel ces organismes interagissent, le métabolisme des algues augmente et produit plus de ROS toxiques pour leur hôte corail (Vidal-Dupiol et al., 2009). L'interaction devient alors parasitaire pour les coraux, qui expulsent leurs symbiotes, ce qui a pour conséquence leur blanchissement, pouvant conduire à leur mort.

En ce qui concerne le microbiote, que j'ai considéré dans mon étude comme l'ensemble des microorganismes bactéries, virus ou eucaryotes (champignons, protistes, plathelminthes...), ceux-ci peuvent interagir avec lui de toutes les manières citées plus haut. Il peut donc être composé de prédateurs, parasites ou pathogènes, de mutualistes obligatoires, de commensaux ou encore de microorganismes opportunistes. Certaines de ces associations sont liées à l'environnement et vont être très variables au cours de la vie d'un organisme. Or, ces variations dans les communautés microbiennes peuvent avoir un impact sur l'interaction entre différents protagonistes, comme la relation hôte/parasite. En

effet, l'ensemble hôte-microbiote est intimement lié et est considéré comme un tout : c'est la théorie de l'holobionte.

2. Microbiote et holobionte : l'histoire des concepts

L'introduction du terme "symbiose" date de 1879, lorsqu'Anton de Bary a décrit l'interaction entre une algue et un champignon, constituant le lichen (Egerton, 2015). Etymologiquement, ce terme signifie "vivre ensemble" et a deux définitions en biologie : l'une considère la symbiose équivalente au mutualisme, une relation bénéfique pour les deux parties (Guerrero *et al.*, 2013). La seconde, plus moderne, réfère à la co-existence et dépendance d'au moins un organisme envers un partenaire et se divise en trois types d'interactions selon l'effet sur l'hôte (le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme) répartis le long d'un continuum (Mushegian & Ebert, 2016). Depuis la découverte d'Anton de Bary, des symbioses entre toutes sortes d'organismes ont été décrites, cependant, ce n'est que récemment que la nature ubiquitaire des interactions hôtes-microorganismes a été réalisée (notamment grâce aux outils de séquençage nouvelle génération), ainsi que l'impact de ces microorganismes sur la biologie, l'écologie et l'évolution de leur hôte (Simon *et al.*, 2019). Depuis 1991, le terme "holobionte" a été introduit par Lynn Margulis, comme l'entité biologique impliquant un hôte et un unique symbiote hérité (Margulis, 1991). Depuis, la définition s'est élargie à l'ensemble formé par un hôte et son microbiote, attestant de l'interaction forte liant les deux parties.

C'est en 1994 que le terme d'hologénome, soit l'ensemble constitué des génomes de l'holobionte, regroupant celui de l'hôte et celui de son microbiote, a été utilisé pour la première fois par Jefferson, au cours d'une conférence. Zilber-Rosenberg et Rosenberg ont synthétisé la théorie de l'hologénome, qui s'appuie sur 4 principes : 1) tous les organismes vivent en interaction avec des microorganismes; 2) les microorganismes sont transmis entre les générations ; 3) l'association entre les protagonistes affecte la valeur sélective de l'hôte dans son environnement ; 4) des changements rapides, médiés par la plasticité de la composition du microbiote et de son génome, augmentent l'adaptabilité de l'holobionte face à un stress (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Elle stipule également que les holobiontes et leurs génomes doivent être considérés comme les véritables unités soumises à la sélection naturelle. Elle implique que l'holobionte et les membres qui le composent sont principalement liés par les interactions positives comme le mutualisme ou la coopération, et que l'holobionte fonctionne comme une unité stable sélectionnable (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2013). Les variations de l'hologénome seraient donc la conséquence de modifications dans le génome de l'hôte ou du microbiote, ou encore dans l'acquisition de nouvelles souches depuis l'environnement ou

par transferts horizontaux entre organismes (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2011). D'autres auteurs sont restés plus équivoques, en estimant que l'hologénome joue un rôle dans l'évolution, sans rentrer plus avant dans les détails (Gordon *et al.*, 2013). La théorie de l'hologénome de Zilber-Rosenberg et Rosenberg a cependant suscité de nombreux questionnements. En effet, les contraintes appliquées par ses conditions me semblent être trop limitantes et exclusive. Selon moi, l'holobionte doit être considéré dans une vision bien plus élargie. Justement, des opposants de cette théorie ont estimé que les holobiontes doivent plutôt être considérés comme des entités instables, et comme des écosystèmes impactés autant par les relations antagonistes que mutualistes (Douglas & Werren, 2016; Foster *et al.*, 2017). Theis et ses collaborateurs ont regroupé les contre-arguments envers la théorie de l'hologénome, sans chercher à remettre en question les définitions originelles de l'holobionte et de l'hologénome, mais plutôt à élucider le lien entre le phénotype et le génotype de l'holobionte (Theis *et al.*, 2016). Notamment, cette théorie implique que s'il n'y a pas de coévolution entre les deux parties de l'holobionte (l'hôte et le microbiote), alors on ne peut pas parler d'hologénome réel (Moran & Sloan, 2015). Or, les opposants avancent que l'holobionte peut être formé par des processus neutres et de la sélection au niveau de l'hôte, des symbiotes ou des deux. Bien que la coévolution soit un processus impliqué dans la formation de l'hologénome, ce n'est pas le seul. En effet, il est également impacté par d'autres processus éco-évolutifs comme des conflits génétiques, de l'épistasie, de la sélection, ou encore de la dérive. (Chandler & Turelli, 2014; Hester *et al.*, 2016; Moran & Sloan, 2015). L'holobionte doit donc plutôt être considéré comme un niveau hiérarchique supérieur à un hôte associé à son microbiote, qui incorpore des systèmes de sélection coopératifs et compétitifs (Skillings, 2016; Theis *et al.*, 2016), et l'hologénome comme un assemblage de différents niveaux de génomes, sur lequel différents niveaux de sélection agissent.

Dans leur théorie, Zilber-Rosenberg et Rosenberg ont émis l'hypothèse que les changements génomiques rapides du microbiote faciliteraient l'adaptation de l'holobionte aux variations constantes des conditions environnementales (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). En effet, le génome de l'hôte est hautement conservé et ses modifications sont lentes, à l'inverse du génome du microbiote qui, lui, est très dynamique et évolue rapidement, par des modifications de la composition bactérienne et/ou des différents génomes eux-mêmes (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). Or, des changements rapides dans l'environnement sont susceptibles de causer des modifications rapides dans la diversité des communautés microbiennes, améliorant l'adaptation et ainsi la survie de l'holobionte face à un stress environnemental (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2011, 2018; Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008). De plus, les variations phénotypiques

causées par différents assemblages hôte-microbiote permettraient de sélectionner un phénotype particulier de l'holobionte, par manipulation des communautés bactériennes par traitements antibiotiques par exemple (Mueller & Sachs, 2015; Voss *et al.*, 2015).

L'étude du microbiote a pris de l'importance depuis plusieurs années, y compris dans le contexte des maladies à transmission vectorielle. Les techniques ont beaucoup évolué, permettant aujourd'hui d'avoir une vision bien plus exhaustive des communautés symbiotiques associées à un organisme. L'analyse du microbiote peut se faire sur des tissus spécifiques ou sur l'animal entier, selon la nature de la question biologique posée. De manière générale, les travaux se basent fréquemment sur le microbiote du système digestif, car il s'agit du compartiment le plus colonisé d'un organisme. Cependant les communautés colonisant d'autres compartiments plus spécifiques, comme par exemple, l'hémolymph, siège de l'immunité des invertébrés, sont également intéressantes à étudier, et peuvent être informatives sur le lien entre le microbiote et certaines fonctions de l'hôte.

L'évolution des méthodes d'analyse du microbiote a permis une analyse plus approfondie des communautés associées à des modèles notamment invertébrés, et notamment la compréhension de l'acquisition et des facteurs influençant sa composition.

3. Acquisition et composition du microbiote

Dans plusieurs modèles invertébrés, les œufs ou les jeunes individus ne possèdent pas de flore microbienne, ils sont axéniques, et n'acquièrent leur microbiote qu'au cours de leur développement. C'est notamment le cas des drosophiles, pour qui la majorité de la flore maternelle se trouve à la surface des œufs (sur le chorion) (sauf symbiotes héréditaires comme *Wolbachia*), et que les larves acquièrent en ingérant cette coquille (Bakula, 1969). Cette particularité rend très facile la création d'individus gnotobiotiques (dont la composition microbienne est contrôlée) ou axéniques pour l'étude notamment de l'effet de certains taxa bactériens sur les individus, grâce au développement de technique de déchoriation (Bakula, 1969; Kietz *et al.*, 2018). Cependant, le microbiote peut varier au cours de la vie d'un individu et être influencé par plusieurs facteurs. En effet, en 2014, la diversité du microbiote a été étudiée chez 218 espèces d'insectes et les auteurs ont remarqué des différences en fonction de l'habitat de l'hôte, de son régime alimentaire, de son stade de développement et de sa phylogénie (Yun *et al.*, 2014).

Les facteurs environnementaux peuvent être déterminants pour la composition du microbiote, ce que démontrent notamment les analyses du microbiote de drosophile. En effet, elles ont révélé une variabilité des taxa bactériens selon les sites de collecte des individus sauvages (Corby-Harris *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2013) et entre des souches de

laboratoire et des souches sauvages, (Chandler *et al.*, 2011). Si dans certaines espèces, comme les femelles du moustique *Culex quinquefasciatus*, le microbiote s'est révélé très variable et très complexe (Chandel *et al.*, 2013), dans d'autres espèces comme *A. aegypti* la présence d'un core microbiote très stable a été mis en évidence chez les moustiques adultes quelle que soit la zone géographique étudiée, et entre les individus élevés en laboratoire et les individus sauvages (David *et al.*, 2016). D'autres facteurs environnementaux, comme la température, peuvent également avoir un effet fort sur la structuration du microbiote. En effet, les animaux marins ectothermes (dont la température corporelle varie avec celle de leur environnement) et leur microbiote sont très influencés par la température du milieu. Une étude a notamment montré que les communautés bactériennes des huîtres *Crassostrea gigas* étaient fortement impactées par la température et les stress thermiques (Lokmer & Wegner, 2015). La niche écologique peut également influencer les communautés bactériennes, celles d'*Armadillidium vulgare* (Dittmer *et al.*, 2016) et de puces de mer (Abdelrhman *et al.*, 2017) ont été montrées comme spécifiques de différentes populations et espèces, respectivement, traduisant des micro-habitats et préférences alimentaires des hôtes. L'alimentation est également un facteur clef de l'acquisition du microbiote bactérien, notamment chez les drosophiles (Chandler *et al.*, 2011). Chez l'escargot d'eau douce *Potamopyrgus antipodarum*, le microbiote bactérien varie en fonction du mode de reproduction (Takacs-Vesbach *et al.*, 2016).

Le génotype de l'hôte a également déjà été démontré comme impactant l'abondance des taxa composant le microbiote, chez des vertébrés mais aussi des invertébrés. Par exemple, chez la drosophile, plusieurs études se sont intéressées à cet effet de l'hôte sur le microbiote. L'une de ces études a cherché à comprendre les facteurs façonnant le microbiote, connu pour impacter l'alimentation, et a révélé un contrôle génétique de l'hôte sur la composition de ce microbiote (Chaston *et al.*, 2016). D'autres chercheurs ont souhaité savoir si, outre le contrôle de la composition du microbiote, le génotype de l'hôte pouvait également influencer d'autres caractéristiques de ce dernier. Ils ont donc testé 36 lignées gnotobiotiques de *D. melanogaster* supplémentées avec des bactéries, et ont démontré que le génotype de l'hôte exerçait un contrôle sur l'abondance des bactéries (Early *et al.*, 2017). Enfin, le contrôle génétique de l'hôte a également été mis en évidence lors de la comparaison des communautés microbiennes de quatre espèces de drosophiles, sympatriques mais séparées par des divergences phylogénétiques. Les auteurs ont souligné le rôle clef de facteurs de sélection sur la composition du microbiote (Martinson *et al.*, 2017).

La composition du microbiote peut donc être influencée par de nombreux facteurs, dont l'hôte, témoignant une fois encore de l'importance de leurs interactions. Ainsi, il est possible de déterminer la nature des relations entre deux protagonistes grâce à la composition du microbiote de ces derniers, mais celle-ci étant influencée par de nombreux facteurs, comme ceux décrits plus haut, c'est un réseau d'interactions complexes qui les définit. De plus en plus de travaux se placent du point de vue de l'holobionte pour étudier les interactions hôte/parasite ou hôte/pathogène, car un lien entre l'immunité d'un organisme et son microbiote a été démontré dans un grand nombre de modèles. Nous pouvons citer par exemple les embryons d'hydres qui utilisent des AMP maternels pour se protéger contre les invasions microbiennes, avant de synthétiser les leurs (Fraune *et al.*, 2011). Ainsi, les jeunes polypes sont protégés d'éventuels pathogènes, mais les AMP leurs permettent également de réguler la charge bactérienne composant leur microbiote. Enfin, les auteurs ont souligné une corrélation entre le microbiote et la protection antifongique des polypes et embryons d'hydre. L'interaction immunité de l'hôte-microbiote peut donc être plastique et ne pas être à sens unique.

E. Le triptyque microbiote - immunité - hôte

1. Immunité de l'hôte et structuration du microbiote

Afin de maintenir des interactions mutualistes ou commensales avec son microbiote, et pour que la présence de ce dernier ne soit pas trop délétère, l'hôte doit éviter la prolifération de ces communautés, afin de conserver une homéostasie. Un contrôle de ces communautés peut donc être nécessaire. Le contrôle du microbiote par l'hôte, comme celui des pathogènes, peut se faire *via* son immunité. Concernant l'interaction entre l'holobionte et le système immunitaire de l'hôte, deux hypothèses ont été proposées.

La première propose que des stimulations immunitaires, faibles et continues, tout au long de la vie d'un hôte, rendrait son système immunitaire tolérant face à ces stimulations (Pradeu & Vivier, 2017). Selon cette théorie, la présence constante des microorganismes composant le microbiote constituerait des stimuli immunitaires faibles mais incessants et rendrait son hôte tolérant à sa présence. Dans ces conditions, il n'y aurait pas de pression du système immunitaire sur le microbiote, et les éventuelles perturbations qu'il subirait face à une infection ou une infestation parasitaire notamment, seraient liées à l'action directe de ces infections.

La seconde théorie suggère que c'est le système immunitaire inné de l'hôte qui contrôle les communautés microbiennes, en exerçant une pression constante sur celles-ci, de sorte à les maintenir dans un état d'équilibre, appelé homéostasie (Hooper *et al.*, 2012). La

composition du microbiote résident est alors contrôlée par le système immunitaire hôte (Zhang *et al.*, 2015). Cette hypothèse suggère que, lors d'une perturbation du système immunitaire, la diversité et la composition du microbiote résident en seraient alors modifiées. De nombreuses études ont confirmé cette hypothèse dans plusieurs modèles. Chez certaines espèces d'hydre, des neuropeptides sécrétés par des neurones de l'épithélium ectodermique ont une activité antibactérienne et participent ainsi à contrôler le microbiote de surface des organismes (Augustin *et al.*, 2017). L'un de ces neuropeptides, NDA-1, contribue à la réduction des bactéries Gram-positives pendant les stades précoces de développement des hôtes, participant ainsi à la colonisation du résident principal, *Curvibacter sp.*. Chez les cnidaires, le système immunitaire est crucial dans la structuration des communautés bactériennes associées (Stabili *et al.*, 2018). C'est le cas notamment du genre *Hydra* chez qui des AMP spécifiques régulent les associations entre l'organisme et les bactéries (Franzenburg *et al.*, 2013). En effet, des AMP de la famille des arminines ont été détectés dans quatre espèces d'*Hydra*, chacune d'entre elles possédant une composition et des profils d'expression uniques. Une expérience d'inactivation des gènes de l'arminine a permis l'étude de la composition bactérienne de chaque espèce. Elle a également révélé que le potentiel des individus déficients en AMP à sélectionner des bactéries de leur flore native était diminué (Franzenburg *et al.*, 2013). Les AMP spécifiques des espèces d'*Hydra* impactent donc les communautés bactériennes. De plus, dans ce modèle, l'arbre phylogénétique des espèces d'hydres et le dendrogramme de ses bactéries associées révèlent une très forte spécificité du microbiote selon l'espèce. D'autres voies immunitaires ont également été mise en avant dans la régulation et le contrôle du microbiote. Par exemple, chez la drosophile, le gène homéotique *Caudal* (impliqué dans le développement embryonnaire) régule le microbiote par la répression de gènes codants pour des AMP dépendant de la voie NF- κ B (Ryu *et al.*, 2008). En effet, les auteurs ont montré que l'inhibition de ce gène homéotique par ARN interférence (RNAi) conduit à la surproduction d'AMP, comme la cecropine et la diptericine, ce qui altère les communautés bactériennes résidentes, et peut conduire jusqu'à la prolifération de bactéries opportunistes. Chez les amibes *Dictyostelium discoideum*, ce sont des lectines, les discoidin I, qui sont impliquées dans l'homéostasie du microbiote (Dinh *et al.*, 2018). Elles se lient aux bactéries et les protègent des dommages extracellulaires. Chez certains crustacés, ce sont également des lectines type-C ainsi que des AMP qui participent à la régulation des communautés microbiennes (Wang & Wang, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Dans le cas où l'immunité de l'hôte participe à la structuration des communautés de microorganismes, l'application d'un stress abiotique ou biotique, tel qu'une infection, peut

modifier l'expression d'AMP ou d'autres voies immunitaires, impactant à son tour la diversité et la composition du microbiote. C'est l'exemple de l'effet du dioxyde de titane (TiO₂), l'une des nanoparticules les plus utilisées, qui est capable d'interagir avec des composés hémolympatiques des moules *Mytilus galloprovincialis*, causant une immunomodulation (Auguste *et al.*, 2019). Celle-ci augmente alors l'activité bactéricide de l'hémolymphe des bivalves, provoquant une dysbiose. L'extinction d'une voie immunitaire, la voie TGFβ/BMP, chez *C. elegans* a permis de démontrer son rôle dans le contrôle de la prolifération des communautés bactériennes, et notamment de *E. coli* (Berg *et al.*, 2019). En effet, une fois cette voie inhibée, ces bactéries jusqu'ici commensales, prolifèrent et deviennent pathogènes. Ceci a également été démontré chez l'huître *C. gigas* dont une infection par le virus OsHV-1 µVar conduit à une prolifération bactérienne puis à une septicémie (de Lorgeril & Lucasson *et al.*, 2018). Concernant les effets d'un stress biotique, une étude menée au laboratoire IHPE a également montré une corrélation entre les variations immunitaires de *B. glabrata* et la perturbation du microbiote (voir II. A) (Pinaud *et al.*, 2016; Portet *et al.*, 2018, 2019).

Dans l'exemple de *B. glabrata*, il est possible que l'infestation détourne l'attention du système immunitaire qui maintient l'homéostasie des communautés microbiennes. Celles-ci peuvent alors échapper à sa pression et être modifiées (voir II. C. 1.).

L'interaction entre le système immunitaire de l'hôte et le microbiote est, cependant, parfois plus complexe : si l'immunité de l'hôte peut parfois influencer le microbiote, la réciproque peut également être vraie. Ainsi, il est fréquent de trouver, dans la littérature, des exemples dans lesquels le microbiote contribue à l'immunité de son hôte, notamment dans la défense contre des pathogènes et/ou des parasites.

2. Rôle du microbiote dans la défense de l'hôte

De nombreuses études ont démontré un rôle du microbiote dans diverses fonctions de son hôte, dont une partie s'est penchée notamment sur la protection, et plus précisément, sur son rôle dans les interactions entre l'hôte et des parasites ou pathogènes. Le microbiote peut être en interaction très étroite avec son hôte, se retrouvant parfois dans des tissus ou compartiments en lien direct avec son immunité, comme par exemple dans l'hémolymphe des invertébrés, comme cela a été décrit chez les crustacés (Wang & Wang, 2015). On retrouve ce lien dans une grande diversité de modèles, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas toujours bien déterminés.

En effet, certains microorganismes sont capables de produire des substances agissant directement sur les pathogènes. Parmi les microorganismes les plus connus pour produire

des molécules antimicrobiennes, on trouve les Actinobacteria, vivant notamment dans le sol, et à partir desquelles de nombreux produits antibiotiques ont été découverts. Dans le contexte de l'émergence croissante de résistance face à ce type de traitements, il est nécessaire de trouver de nouvelles sources. Or, les recherches récentes sur les Actinobacteria du sol conduisent souvent à la re-découverte de molécules déjà connues (Fischbach & Walsh, 2009; Taubes, 2008; Walsh, 2003), c'est pourquoi les investigations se tournent à présent vers les bactéries associées à d'autres organismes (Poulsen *et al.*, 2011). La famille des Actinobacteria est très vaste et bien étudiée dans le cadre d'interactions mutualistes de l'immunité de leurs hôtes (Kaltenpoth, 2009). Leurs capacités à exploiter un grand nombre de sources d'azote et de carbone et à produire de nombreux métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes ont été bien décrites (Goodfellow & Williams, 1983). Ces capacités les prédisposent à s'engager dans des symbioses protectrices et explique en partie leur quasi-ubiquité dans le monde du vivant. Le genre *Streptomyces*, appartenant à cette famille, peut notamment produire des antifongiques et participer ainsi à la défense des fourmis du genre *Attines* (Haeder *et al.*, 2009). Elles peuvent également produire des antibiotiques qui protègent des guêpes du genre *Philanthus* contre des bactéries (Kaltenpoth *et al.*, 2005). Dans cette interaction, les guêpes les cultivent dans des glandes spécialisées situées dans leurs antennes et les transmettent à leur descendance en les déposant sur leurs couvains. Les larves les intègrent alors à l'éclosion, puis, au moment de leur métamorphose, les bactéries se logent dans les parois des cocons, d'où elles protègent les larves d'attaques fongiques et bactériennes, augmentant ainsi leur probabilité de survie (Kaltenpoth *et al.*, 2005). Cette étude a été la première à décrire le cas de bactéries cultivées dans les antennes d'insectes, et également la première à décrire une symbiose entre un insecte et le genre *Streptomyces*. Les *Bifidobacteria*, un autre genre de la famille des Actinobacteria, peuvent également être impliquées dans l'immunité de leur hôte. En effet, leurs capacités à activer les cellules immunitaires telles que les macrophages et les lymphocytes (Hatcher & Lambrecht, 1993; Sekine *et al.*, 1994) ou la production d'anticorps (Link-Amster *et al.*, 1994; Takahashi *et al.*, 1993; Yasui & Ohwaki, 1991) ont été bien décrites. Elles peuvent également activer la fonction de cellules naturellement défensives, notamment en stimulant la production de cytokines par les leucocytes (Marin *et al.*, 1997). De telles capacités semblent l'associer à la résistance aux infections par des pathogènes (Tojo *et al.*, 1987) et potentiellement à la prévention de cancers (Fernandes & Shahani, 1990).

Certains microorganismes produisent des toxines comme des *Pseudomonas* hébergées par des coléoptères *Paederus spp*, participant ainsi à leur défense contre des prédateurs en produisant des pédérines qui peuvent causer de graves dermatites (Kellner, 2002; Piel,

2002). Les bactéries du genre *Wolbachia* sont également capable d'inhiber la réplication de deux virus chez le moustique : le virus de la dengue (Mousson *et al.*, 2012) et le virus du Chikungunya (Raquin *et al.*, 2015).

Le rôle des virus dans la protection de leurs hôtes a déjà été mis en évidence. Chez les guêpes parasitoïdes de la famille des Braconidae et des Ichneumonidae, des polydnaviridae du genre *Bracovirus* ou *Ichnoviridae* sont connus pour aider les larves à s'implanter dans les lépidoptères dont ils inhibent le système immunitaire (Webb, 1998). Chez les coraux, de nombreux virus se trouvent dans le mucus et semblent impliqués dans la régulation de la charge symbiotique de Symbiodiniaceae, mais également des pathogènes (Bettarel *et al.*, 2015). Une expérience a démontré que le nombre de transcrits de certains virus diminuaient en cas de réchauffement du milieu, ce qui conduisait à une augmentation de la sensibilité de l'hôte corail *Symbiodinium*, suggérant un rôle de ces virus dans la thermosensibilité des coraux (Levin *et al.* 2016). Ces quelques exemples font cas de microorganismes particuliers pouvant jouer un rôle dans la protection de leur hôte, cependant, de nombreuses études relatent également du rôle du microbiote dans son ensemble dans cette fonction, y compris dans la protection contre des stress abiotiques. Récemment, l'analyse de la résistance du cafard *Blattella germanica* aux insecticides a démontré l'implication du microbiote (Pietri *et al.*, 2018). Connaissant l'implication de bactéries dans la détoxification de xénobiotiques, dont certains insecticides, les auteurs ont décidé de le tester sur leur modèle, *B. germanica*. Au cours de leur étude, ils ont démontré plusieurs choses : i) les cafards appartenant à une souche de laboratoire résistante aux antibiotiques arboraient des communautés bactériennes différentes de ceux de la souche sensible, ii) la perturbation du microbiote par des antibiotiques rendait sensible la souche résistante, et iii) le transfert du microbiote de la souche résistante à la souche sensible améliorait la résistance de cette dernière face aux insecticides (Pietri *et al.*, 2018). Ainsi, bien que les mécanismes sous-jacents à cette implication dans la résistance aux insecticides restent à clarifier, le rôle du microbiote a été clairement souligné.

Outre l'amélioration de la défense face à des polluants ou molécules étrangères, la compréhension du rôle du microbiote dans les interactions hôte/pathogène, hôte/parasite peut être très importante pour plusieurs raisons, selon le modèle étudié. Par exemple, *Apis mellifera* est une espèce d'intérêt économique et écologique majeur, menacée par de nombreux facteurs, dont notamment l'infection par des pathogènes. Le microbiote des abeilles a été bien étudié et, contrairement à beaucoup d'insectes, elles possèdent un core microbiote fortement conservé et spécialisé, constitué de neuf groupes

bactériens (Ahn *et al.*, 2012; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012), dont toutes les espèces sont cultivables expérimentalement (Engel *et al.*, 2013), et principalement acquises par transmission sociale. Cinq de ces neuf espèces sont ubiquitaires des abeilles et des bourdons *Bombis terrestris* (Martinson *et al.*, 2011). Le rôle du microbiote des abeilles dans de nombreuses fonctions a déjà été décrit, notamment dans la fonction immunitaire et la protection contre des pathogènes (Ellegaard & Engel, 2016; Engel *et al.*, 2012; Koch & Schmid-Hempel, 2011; Raymann *et al.*, 2017). En effet, les abeilles axéniques sécrètent/produisent moins d'AMP que celles avec un microbiote normal, suggérant un lien entre communautés bactériennes et synthèse de ces produits immunitaires, ou dans la stimulation de leur production par l'hôte (Kwong *et al.*, 2017). La perturbation du microbiote par des traitements à la tétracycline a des conséquences néfastes sur la santé des abeilles, avec une forte augmentation de leur sensibilité face aux infections bactériennes de type pathogènes opportunistes comme *Serratia marcescens* (Raymann *et al.*, 2017). Enfin, dans certaines études, les auteurs ont montré que la présence de certains pathogènes tout au long de la vie des abeilles corrélait avec la prolifération ponctuelle de certains taxa bactériens (Erban *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2015; Maes *et al.*, 2016). L'augmentation de la charge de ces taxa suggère soit leur implication dans la défense contre ces pathogènes, soit au contraire, une synergie (collaboration) entre les deux parties. Le microbiote de *B. terrestris* semble jouer un rôle dans sa résistance au Trypanosomatidae *Crithidia bombi*, les individus axéniques présentant une charge de parasites bien plus élevée que ceux dont le microbiote est normal (Koch & Schmid-Hempel, 2011). De manière intéressante, des individus axéniques nourris avec les fécès d'individus de la même colonie et au microbiote normal, développaient un microbiote indifférenciable de celui d'origine, traduisant d'une haute spécificité de sa composition (Koch & Schmid-Hempel, 2011).

Chez les locustes du désert, *Schistocerca gregaria*, moins le microbiote est diversifié, plus la colonisation par les bactéries pathogènes *Serratia marcescens* est efficace (Dillon *et al.*, 2005), ce qui supporte la théorie que plus les communautés sont diversifiées, plus l'hôte est résistant aux invasions pathogènes. En effet, il est possible que ceci soit lié à une compétition trop forte pour le pathogène pour la colonisation de l'habitat ou pour l'alimentation, ou encore à l'amélioration des capacités immunitaires de l'hôte par ces communautés (Reid *et al.*, 2001; Rolfe, 1997).

La compréhension du lien entre microbiote et immunité antiparasitaire de l'hôte est également d'un grand intérêt dans le contexte des maladies à transmission vectorielle. Les mécanismes sous-jacents étant souvent complexes et difficiles à décrypter, l'étude du

microbiote pourrait apporter de nouvelles clefs dans la compréhension des interactions hôte-pathogène ou hôte-parasite et dans la lutte contre ces maladies. En effet, la réduction de leur transmission par le biais du microbiote est une piste intéressante à explorer. Plusieurs exemples de l'influence des communautés microbiennes sur les interactions hôtes/pathogènes dans le contexte des maladies à transmission vectorielle ont été répertoriés. C'est le cas notamment des tiques *Dermacentor andersoni*, connues pour transmettre les bactéries Rickettsiales *Anaplasma marginale* (Jongejan & Uilenberg, 2004). Cette maladie est la plus importante transmise d'une tique au bétail (Kocan *et al.*, 2003) et peut avoir des conséquences économiques très importantes. *D. andersoni* porte également des endosymbiotes impliquées dans sa physiologie et sa survie, mais également dans l'acquisition et la transmission de pathogènes (Clay & Fuqua, 2010). La composition bactérienne de deux populations de tiques, présentant des sensibilités différentes à *A. marginale* a été analysée et indique que la proportion et la quantité de *Rickettsia bellii* étaient inversement corrélées au niveau d'*A. marginale*. De plus, la charge des bactéries endosymbiotiques du genre *Francisella* semblait proportionnelle à la charge d'un autre pathogène des tiques, *Francisella novicida* (Gall *et al.*, 2016). Ainsi, certaines bactéries du microbiote aident leur hôte à lutter contre les pathogènes, alors que d'autres, au contraire, sont impliquées dans l'installation de ces derniers.

Toujours concernant les maladies à transmission vectorielle, le cas de l'interaction entre les moustiques et les parasites responsables du paludisme est également abondamment étudié. En effet, de nombreuses études ont montré le rôle du microbiote dans la protection du moustique face au parasite *Plasmodium*, avec une augmentation des infections après perturbation des communautés bactériennes d'*A. gambiae* par des traitements antibiotiques (Beier *et al.*, 1994; Dong *et al.*, 2009; Kalappa *et al.*, 2018; Meister *et al.*, 2009). Des analyses de transcriptomique suggèrent que les bactéries induisent une réponse immunitaire incluant une sur-expression de plusieurs facteurs antiplasmodiques et de gènes immunitaires (Dong *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2009). Le microbiote pourrait contrôler la prolifération du parasite en stimulant les niveaux basaux de production d'effecteurs immunitaires, comme des cecropines, defensines et gambicines (AMP) (Cirimotich *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2009). Boissière et ses collaborateurs (Boissière *et al.*, 2012) ont découvert une prolifération d'*Enterobacteriaceae* chez des moustiques mis en contact avec *P. falciparum*. Ceci pourrait suggérer une augmentation de la sensibilité, par ces bactéries, des hôtes à l'infection. Cependant, une espèce d'*Enterobacter* isolée de moustiques sauvages a été démontrée comme leur conférant une résistance face au parasite (Cirimotich *et al.*, 2011). Dans cette dernière étude, les auteurs suggèrent un mécanisme de protection plus direct, par la production de ROS par les bactéries elles-mêmes.

L'ingestion d'isolats de bactéries du microbiote de ces moustiques semble conduire à une diminution de la prévalence et de l'intensité de l'infection par le parasite (Tchioffo *et al.*, 2013). Ainsi, le lien entre le microbiote et la réponse antiparasitaire est complexe et semble corrélé à de nombreux facteurs qui doivent être identifiés et pris en compte dans la compréhension des interactions hôte/microbiote.

F. Le microbiote dans le contexte d'une maladie à transmission vectorielle : la bilharziose

1. Microbiote de *Biomphalaria* : état de l'art

Caractériser le microbiote de *Biomphalaria* et d'autres mollusques hôtes intermédiaires de *Schistosoma* et comprendre son rôle potentiel dans l'immunité antiparasite de l'hôte pourrait permettre une meilleure compréhension de l'interaction tripartite entre le mollusque, son parasite et son microbiote. En effet, comme les exemples précédemment cités l'attestent, le microbiote d'un organisme peut jouer un rôle dans l'immunité de son hôte, notamment dans l'interaction avec des parasites.

L'objectif principal de ma thèse était de déterminer le rôle du microbiote dans l'interaction hôte-parasite entre *Schistosoma spp.* et ses hôtes intermédiaires. Pour cela, la première étape a été de caractériser l'ensemble des communautés microbiennes, qu'il s'agisse de bactéries, de virus ou de protistes des mollusques à l'état naïf. La comparaison de ces communautés entre différentes espèces de mollusques avait pour objectif de déterminer l'influence de l'hôte sur la composition de leur microbiote. Par la suite, la composition bactérienne des mollusques naïfs a été comparée à celle de mollusques parasités afin d'étudier la dynamique du microbiote au cours d'une cinétique d'infestation. Cette dynamique a été comparée entre plusieurs combinaisons hôtes-parasites dont la compatibilité (donc les capacités immunitaires) et le type de réponse immunitaire mise en place étaient différentes. Pour cela, le microbiote de combinaisons compatibles et incompatibles, mais également sympatriques et allopatriques a été étudié. Enfin, le rôle de ce microbiote devait être exploré par l'intermédiaire de traitements modifiant sa composition, afin d'étudier la phénoménologie de la réponse immunitaire (par le biais du phénotype de compatibilité) de l'hôte suite à ces modifications.

a) Etudes des communautés virales

Lors de précédents travaux, Galinier et ses collaborateurs ont caractérisé pour la première fois les communautés virales présentes dans différentes souches de *B. glabrata* (BgGUA,

BgVEN, BgBRE et BgBAR) et de *B. pfeifferi* (BpfeOMA) élevées en laboratoire (Galinié et al., 2017b). Cinq virus ont pu être identifiés (annotés de BV1 à BV5), quatre appartenant à la superfamille des picorna-like virus (BV1-BV4), et le cinquième étant proche de la famille des Totiviridae (BV5). Cette étude a montré une spécificité des communautés virales en fonction de l'hôte car, sur des pools de 30 individus, *B. pfeifferi* était la seule à arborer les virus BV4 et BV5. Globalement, la charge virale des différentes souches de *Biomphalaria* était équivalente, à l'exception de la souche BgBAR dont la charge virale était environ 2,5 fois moindre. Cette souche BgBAR présente par ailleurs le phénotype de compatibilité le plus restreint face aux différentes souches de *S. mansoni*, ce qui a permis de faire l'hypothèse d'un lien entre compatibilité hôte/parasite et charge virale de l'hôte. En effet, une charge virale plus importante pourrait soit favoriser directement l'implantation et le développement du parasite, soit perturber le système de défense de l'hôte et en particulier son immunité. Cette étude étant la première à caractériser les virus d'hôtes intermédiaires de *S. mansoni*, d'autres analyses étaient prévues afin d'approfondir les résultats obtenus, et de tester l'hypothèse d'un lien entre le microbiote viral et l'immunité antiparasite de l'hôte.

Peu de temps après, une bactérie pathogène des mollusques a décimé l'élevage au laboratoire, entraînant l'élimination des souches et désinfection, ce qui a eu plusieurs conséquences dont certaines seront exposées plus loin. Cette bactérie, nommée *Candidatus Paenibacillus glabratella*, a d'ailleurs fait l'objet d'un article dans lequel son potentiel molluscicide a été analysé, au vu de son haut niveau de pathogénicité à l'égard de l'ensemble des mollusques élevés au laboratoire, pour éventuellement développer un outil de médiation vectorielle, en éliminant les populations sauvages en contact avec les parasites, de sorte à arrêter le cycle de ces derniers (Duval et al., 2015). Les auteurs ont montré, par des observations histopathologiques que les bactéries s'infiltraient dans les tissus, causant une désorganisation tissulaire et de hauts taux de mortalité. De plus, ils ont remarqué que les œufs des escargots infectés portaient également la bactérie, réduisant le taux d'éclosion.

Ces hauts taux de mortalité ont conduit à un renouvellement de l'élevage par l'envoi d'individus de mêmes souches et espèces, par d'autres équipes de recherche, dont certaines que le laboratoire IHPE leur avait fournies auparavant. Des analyses par PCR quantitative des communautés virales de ce nouvel arrivage ont révélé que, sur les cinq virus précédemment identifiés dans les anciennes souches de mollusques, seuls deux (BV1 et BV3) ont été détectés dans les individus des différentes souches (Tableau 2). Deux hypothèses peuvent être émises : soit les autres virus sont présents sous forme de variants

qui ne sont pas amplifiés par les amorces connues, soit ils sont simplement absents des nouveaux mollusques. Seule une analyse exhaustive par RNAseq aurait pu permettre d'établir la présence ou l'absence de virus précédemment identifiés ou non.

Ces différentes données devaient me servir de résultats préliminaires en vue de l'étude des communautés virales de différentes espèces de Planorbidae. Cette étude avait pour objectif d'analyser les interactions entre les mollusques et les virus et sera développé plus loin (voir II. A.).

Tableau 2 : Présence/absence des souches virales avant et après renouvellement de l'élevage suite à l'infection à *Candidatus Paenibacillus glabratella*. (+) : présence des virus (-) : absence de virus

Souches virales	Présence/absence					
	Avant renouvellement					Après renouvellement
	BgGUA	BgVEN	BgBRE	BgBAR	BpfeOMA	
BV1	+	+	+	+	-	+
BV2	-	+	+	+	+	-
BV3	+	+	+	-	-	+
BV4	-	-	-	-	+	-
BV5	-	-	-	-	+	-

b) Etude des communautés protistes

Les « protistes » sont des organismes eucaryotes unicellulaires, parfois multicellulaires, très diversifiés, non classifiés parmi les métazoaires, les eumycètes ou les plantes, et généralement difficiles à hiérarchiser dans la classification phylogénétique. Je continuerai de les appeler « protistes » dans mon manuscrit afin d'en simplifier la lecture. Ces communautés sont généralement moins étudiées que les communautés bactériennes car elles partagent le marqueur 18S de l'ARNr des hôtes auxquels elles sont associées, rendant leur analyse par séquençage massif plus complexe. Des amorces spécifiques de ces communautés ou bloquant l'amplification des hôtes doivent être développées pour identifier les protistes.

Bien que plus souvent étudiés sous une forme pathogène, notamment chez les humains, les protistes peuvent également faire partie du microbiote d'un organisme, et jouer un rôle dans les fonctions biologiques de ce dernier. Chudnovskiy et ses collaborateurs ont notamment décrit un protozoaire, *Tritrichomonas musculus*, qui améliore les défenses mucosales de son hôte souris (Chudnovskiy et al., 2016). Inoue et ses collaborateurs ont co-écrit un chapitre du livre "Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology" regroupant les travaux ayant caractérisé et analysé les communautés protistes des termites (et des cafards) (Inoue et al., 2000). Ces communautés jouent un rôle essentiel dans la digestion et l'assimilation de la cellulose, abondante dans le régime alimentaire de ces organismes, au point d'être des symbiotes obligatoires sans lesquels les hôtes meurent de faim. Trois espèces de protozoaires ont notamment été décrites, plus ou moins spécifiques de segments du système digestif de termites, traduisant d'un rôle potentiel dans la digestion, différent entre les espèces (Lai et al., 1983).

Ardila-Garcia et Fast ont décrit, en 2012, l'infection causée par des microsporidies appelées *Sporanauta perivermis* chez le nématode *Odontophora rectangula* (Ardila-Garcia & Fast, 2012). Le but de cette étude était de déterminer si toutes les microsporidies étaient délétères voire létales, comme l'est celle causée par le "tueur de nématodes", *Nematocida parisii* chez *Caenorhabditis sp.* (Ardila-Garcia & Fast, 2012). Les résultats de cette étude ont révélé que les *S. perivermis* étaient localisés dans les tissus hypodermiques et musculaires, mais n'atteignaient pas l'intestin, contrairement à *N. parisii* qui y prolifère. Ils sont en effet contenus dans des vésicules, les isolant d'un contact direct avec l'hôte. *S. perivermis* peut se retrouver également dans les œufs suggérant une transmission verticale. A ce jour, cette interaction n'a pas été démontrée comme ayant un effet positif sur l'hôte, en revanche, elle n'a pas d'effet délétère. Sa transmission verticale peut suggérer une possible interaction positive, avec un potentiel rôle dans la physiologie de l'hôte (Ardila-Garcia & Fast, 2012).

La présence de microsporidies du genre *Steinhausia* a été soulignée chez *B. glabrata* en 1975 (Bayne & Owczarzak, 1975). Les auteurs ont suggéré que la reproduction asexuée des schistosomes était réduite dans les mollusques portant ces microsporidies, mais la pathogénicité des microorganismes et les mécanismes sous-jacents n'ont pas été clairement établis. Une autre étude a testé l'effet de la présence de microsporidies sur les larves de *Schistosoma mansoni* chez des *Biomphalaria glabrata* infestés (Lai & Canning, 1980). Les auteurs ont donc nourri les mollusques avec des spores de *Nosema algerae*, des microsporidies infectant naturellement les moustiques *Anopheles stephensi*. Ils ont ensuite observé leur localisation dans leurs tissus à différents stades de l'infestation et l'effet sur

l'émission cercarienne. Ils ont constaté que les microsporidies proliféraient dans les sporocystes primaires et/ou secondaires alors qu'ils ne se trouvaient quasiment pas dans les tissus des escargots. De plus, l'ingestion de spores 14 jours après l'infestation parasitaire réduisait considérablement le nombre de cercaires émises. Ainsi, *N. algerae* a un effet délétère sur le développement parasitaire.

Deux espèces d'amibes du genre *Hartmannella* ont déjà été respectivement identifiées dans deux espèces de mollusques, *Biomphalaria pallida* et *Bulinus globosus* (Richards, 1968). En 1979, alors qu'ils étudiaient le phénomène d'encapsulation amebocytaire des sporocystes résultant de la réponse cellulaire de *Biomphalaria glabrata*, face à une infestation parasitaire, Stibbs et ses collaborateurs (Stibbs *et al.*, 1979) ont observé la prolifération d'une amibe lors de la culture cellulaire. Ils ont alors décrit cette amibe comme étant capable de se fixer très efficacement aux sporocystes du trématode *Schistosoma* et de le détruire. Ils ont également remarqué qu'elles étaient capables d'adhérer et de détruire les cellules Bge (lignée cellulaire produite à partir de cellules embryonnaires de *B. glabrata* (Hansen, 1976)). En revanche, ces amibes ne s'attachaient ni aux cercaires de *Schistosoma*, ni à celles d'autres parasites. Les auteurs ont déterminé ces amibes comme appartenant aux genres *Hartmannella* ou *Acanthamoeba*. Ils ont émis l'hypothèse qu'elles étaient localisées en surface du manteau ou de l'épithélium péricardique, plutôt que dans les cellules et les tissus. En 1980, Okwczarzak et ses collaborateurs ont classifié ces amibes comme *Nuclearia sp.* et ont décortiqué leur mode d'action pour tuer les parasites. Elles agissent en quatre étapes : 1) l'adhésion à la surface des sporocystes, 2) la pénétration dans le tégument, 3) la destruction lytique des tissus du parasite, 4) la suppression des fragments restants par phagocytose (Owczarzak *et al.*, 1980). Ces amibes ont à nouveau été identifiées dans l'hémolymphe de plusieurs souches de *B. glabrata* et une analyse phylogénétique a permis une classification plus précise, non pas dans le genre *Nuclearia*, mais dans les Mesomycetozoea, dont elles ont formé un nouveau genre et une nouvelle espèce : *Capsaspora owczarzaki* (Hertel *et al.*, 2002). Les auteurs ont également remarqué que les mollusques au phénotype résistant face aux parasites étaient plus à même de porter les amibes. En revanche, ces résultats ont été contredits dans une étude ultérieure dans laquelle aucune amibe de cette espèce n'a été retrouvée chez des mollusques résistants (Hertel *et al.*, 2004). D'autres protistes ont cependant été identifiés chez certains individus, dont un autre ichtyosporean *Anurofeca sp.* et deux genres de ciliés, *Paruroleptus* et *Trichodina* (Hertel *et al.*, 2004).

L'interaction entre les mollusques du genre *Biomphalaria* et les protistes reste donc encore mal comprise, et leur lien avec l'immunité de l'hôte reste flou. Une identification des

communautés protistes de ces escargots par séquençage est nécessaire afin d'avoir une vision plus exhaustive de celles-ci, et d'initier une étude plus approfondie sur la nature des interactions symbiotiques entre les protagonistes.

c) Etudes des communautés bactériennes

Quelques travaux ont déjà étudié le microbiote bactérien des Planorbidae hôtes intermédiaires de *Schistosoma*. Quelques-unes se sont notamment focalisées sur la flore cultivable de *B. glabrata* de plusieurs localités (Puerto Rico, Ste Lucie et Guadeloupe) et l'ont comparée à celle d'animaux de laboratoires. Ils ont décrit les taxons bactériens dominants comme appartenant aux familles des Aeromonadaceae, des Enterobacteriaceae, des Moraxellaceae et des Pseudomonadaceae (Ducklow *et al.*, 1979; Ducklow *et al.*, 1981). Ils ont remarqué des différences de composition bactérienne entre les différentes populations étudiées et que les mollusques de laboratoire ont une flore plus dense que celle des mollusques de terrain. Ils ont émis l'hypothèse que des différences de densités d'escargots pourraient être à l'origine de ces différences, la proximité des individus en aquarium pouvant éventuellement favoriser les échanges. Une autre étude, plus récente, a déterminé le microbiote bactérien de *B. glabrata* originaires du Brésil, en comparaison à d'autres de la même souche mais élevés en laboratoire (Silva *et al.*, 2013). Les résultats ont montré que le microbiote cultivable était composé exclusivement de bactéries gram-négatives, principalement représentées par des Proteobacteria, dont les familles dominantes étaient des Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), des Comamonadaceae (Betaproteobacteria) et des Xanthomonadaceae (Gammaproteobacteria). Des tests antibiotiques ont également révélé que tous les isolats étaient résistants à l'amoxicilline mais sensibles au meropenem. Encore une fois, les auteurs ont pu observer une différence dans la composition des individus de laboratoire, en comparaison aux individus sauvages.

Ces travaux ont été menés uniquement sur la flore cultivable des mollusques, or, toutes les bactéries ne peuvent pas être cultivées *in vitro*. L'avènement des nouvelles techniques de séquençage et d'analyse ont ouvert le champ des possibles à l'analyse des communautés bactériennes, permettant un approfondissement de nos connaissances sur le sujet. L'analyse du microbiote bactérien de la souche Guadeloupéenne (Allan *et al.*, 2018) et d'une souche brésilienne (voir II. C. 1. ; à laquelle j'ai participé) de *B. glabrata* a été faite grâce à la technique du séquençage MiSeq de la région V3V4 de l'ARN 16S. Les résultats de ces deux études ont démontré que les phyla bactériens dominants étaient les Proteobacteria et les Bacteroidetes chez ces deux souches de mollusques. Ils ont été utilisés comme résultats préliminaires pour mon analyse du microbiote bactérien dans

plusieurs souches de *Biomphalaria glabrata*, et chez *Biomphalaria pfeifferi*, *Planorbium metidjensis* et *Bulinus truncatus*, hôtes intermédiaires du parasite trématode *Schistosoma* sp. Il s'agit ici des premiers travaux à comparer la composition des communautés bactériennes en fonction de la phylogénie de l'hôte, apportant une nouvelle dimension coévolutive à ce modèle, et ouvrant la voie à une meilleure compréhension de l'interaction entre les mollusques et leur parasite.

II. Chapitre 1 : Caractérisation du microbiote

A. Analyses du microbiote viral

L'un des objectifs de ma thèse était d'analyser les caractéristiques liées aux virus BV1 et BV3, les deux virus retrouvés dans les mollusques suite à la décimation de l'élevage sur les cinq initialement identifiés. Nous avons choisi d'étudier quatre paramètres :

- La prévalence : l'identification de ces virus ne nous a pas donné d'indication sur les souches de mollusques, ni sur le nombre d'individus porteurs. Nous avons donc choisi de tester leur présence sur quatre souches de *B. glabrata* (BgBAR, BgBRE, BgGUA et BgBS90) et une souche corse de *B. truncatus*. Afin de tester la prévalence (nombre d'individus infestés), nous avons estimé l'échantillonnage à environ 15 individus par souche afin de garantir une valeur statistique.
- Le tropisme tissulaire : l'affinité des virus pour certains compartiments devait également être testée, et notamment pour l'hémolymphe, siège de l'immunité, ce qui aurait pu ouvrir de nouvelles pistes de réflexion, comme la potentialité d'un lien entre ces virus et l'immunité des mollusques. Des organes de mollusques devaient être échantillonnés séparément afin de tester la présence de BV1 et BV3.
- La transmission : l'acquisition et la transmission du microbiote ne sont pas encore déterminées dans notre modèle. L'isolement des pontes permettrait de tester la transmission verticale et une expérience de Jardin Commun, la transmission horizontale.
- La dynamique : la dynamique des transcrits viraux au cours d'une infestation parasitaire aurait pu nous informer sur l'interaction entre ces virus et l'immunité des mollusques. De plus, la stimulation du système antiviral par l'utilisation de poly I:C pour éliminer les mollusques, suivie d'une infestation parasitaire et de mesures de compatibilité était prévue afin d'établir l'existence d'un impact des virus dans l'immunité antiparasitaire. Le poly I:C (ligand polyinosinique-polycytidilique) est similaire à de l'ARN double brin (synthétique) présent chez les virus (Grant *et al.*, 1968). Il s'agit d'un immunostimulateur interagissant avec les récepteurs de type Toll (Li *et al.*, 2015). Son efficacité contre les virus a été démontrée pour la première fois en 1969, chez les souris (Nemes *et al.*, 1969)

Des exemples ont démontré l'implication de virus dans plusieurs fonctions biologiques de leur hôte, notamment les défenses immunitaires (voir I. E. 2.). Les analyses prévues sur les virus BV1 et BV3 auraient pu permettre de comprendre leur potentiel rôle dans la relation tripartite avec le mollusque et le parasite. En effet, une corrélation entre la présence et la

dynamique des deux virus restants (BV1 et BV3) et compatibilité hôte-parasite aurait pu être recherchée.

L'analyse de la séquence des virus précédemment identifiés avait permis le développement d'amorces de qPCR pour le suivi des virus. Cependant, aucun virus n'a été détecté dans nos échantillons avec l'utilisation de ces amorces. Il est donc probable que les communautés virales aient changé ou bien qu'il s'agisse de variants viraux non amplifiés par ces amorces. Dans ces conditions, l'étude des communautés virales est devenue impossible, à moins d'un nouveau séquençage par RNAseq sur ces nouveaux mollusques. Ceci n'a pas été envisageable au cours de cette thèse mais fera l'objet d'une étude à venir. En revanche, nous avons pu conclure de ces résultats que les communautés virales ne sont pas installées de manière stable chez les mollusques dont nous disposons. Ceci semble éliminer l'hypothèse d'un virus symbiotique et d'une coévolution entre les virus et les mollusques. Cette impasse a cependant arrêté là mes recherches concernant le microbiote viral de l'hôte intermédiaire de *Schistosoma*.

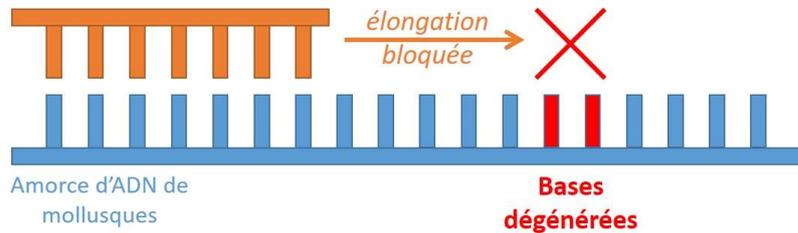
B. Analyses du microbiote protiste

Il existe peu de travaux sur les communautés protistes des mollusques hôtes intermédiaires du schistosome, et les études existantes sont assez anciennes et ne sont pas exhaustives. L'analyse du microbiote protiste par séquençage massif sur le marqueur 18S des eucaryotes a donc été effectuée. Ma contribution à ces travaux a consisté en l'extraction de l'ADN des échantillons, la participation à l'analyse des communautés bactériennes et à la rédaction des résultats sous la forme d'un article.

Nous avons dû, au cours de ce travail, développer des outils pour réduire l'information génétique de l'hôte et identifier les communautés protistes présentes. Ainsi, des amorces bloquantes de l'ADN d'escargots et des amorces spécifiques des protistes ont été conçues (Figure 11). Les premières correspondent à des séquences d'amorces amplificatrices de l'information génétique des mollusques, auxquelles ont été ajoutées des bases dégénérées, bloquant ainsi l'amplification. Les amorces spécifiques, quant à elles, ont été

construites à partir de bases de données regroupant les protistes connus, de sorte à déterminer une séquence universelle de ce taxon, excluant le taxon de l'hôte mollusque.

1) Principe des amorces bloquantes



2) Principe des amorces spécifiques

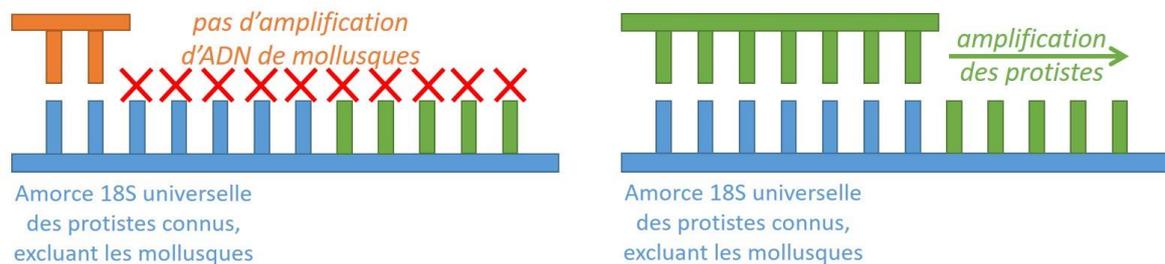


Figure 11 : fonctionnement théorique des amorces 1) bloquantes, empêchant l'amplification de l'ADN de mollusques, et 2) spécifiques des protistes, ne permettant l'amplification que de ces derniers.

Après différents tests d'efficacité, les amorces bloquantes se sont révélées plus exhaustives quant à la caractérisation des communautés de protistes. Celles-ci étaient principalement représentées par des Amebozoa et des Alveolata. Un genre protiste a été identifié, phylogénétiquement proche d'un autre précédemment caractérisé pour sa disposition à prédaté des sporocystes de *Schistosoma*.

En parallèle à l'analyse de ces communautés eucaryotes, une étude des communautés bactériennes a été menée. Les phyla prédominants identifiés appartenaient aux Proteobacteria et aux Tenericutes. Plus précisément, le genre *Mycoplasma* a été retrouvé dans nos échantillons. L'analyse phylogénétique de ce genre bactérien, déjà été décrit dans une grande diversité d'hôtes invertébrés, semble indiquer une interaction spécifique avec ses hôtes mollusques.

Enfin, l'environnement a été montré comme impactant la composition des deux communautés, bien que les bactéries semblent particulièrement liées à la souche de leur hôte.

Une version non finalisée de l'article dans lequel ces résultats seront présentés se trouve ci-dessous.

Co-variation between eukaryotic and prokaryotic microbes associated with Planorbidae snails

Running title: Protists and bacteria within snails

Camille Huot⁺¹, Camille Clerissi^{+1,2}, Anaïs Portet¹, Benjamin Gourbal¹, Eve Toulza^{*1}.

1, IHPE UMR 5244, CNRS, Ifremer, Université de Montpellier, Université de Perpignan Via Domitia, Perpignan, France

2, Present address, PSL Université Paris: EPHE-UPVD-CNRS, USR 3278 CRIOBE, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan Cedex, France

⁺These authors contributed equally to the work

^{*}Corresponding author: Eve Toulza. Mailing address: IHPE UMR 5244, Université de Perpignan via Domitia, 52 Avenue Paul Alduy, F-66860 Perpignan Cedex, France. Phone: +33 468 662 187. Fax: +33 468 662 281. E-mail: eve.toulza@univ-perp.fr

157 words for the abstract and 3975 words for the text

Keywords: holobiont, protist, microbiota, metabarcoding, blocking primers, Heterobranchia, Mycoplasmataceae

Abstract

Microbial communities associated with macroorganisms might affect host physiology and homeostasis. The prokaryotes are well studied in this context, but diversity of microbial eukaryotes (protists) remains almost unknown. In order to study protists communities, while reducing the amplification of host snails DNA, we used existing specific primers and we developed blocking primers for metabarcoding analyses. Our results showed that the phyla Amoebozoa and Opisthokonta were dominant within snail protist microbiota. The role of these taxa remains unknown, but we believe that these primer sets offer new possibilities to study the hidden diversity of protists within snail microbiota. In addition, we analyzed bacterial communities using 16S rRNA gene metabarcoding, and we highlighted that protist and bacteria assemblages were correlated, suggesting either similar influences of host/environmental factors, or ecological interplays. Lastly and similarly to other invertebrate hosts (chitons,

isopods, termites, etc.), Mycoplasmataceae sequences were abundant among bacteria. A phylogenetic reconstruction of these sequences suggested host specific interactions with snails.

Introduction

Interactions between micro- and macro-organisms are ubiquitous on Earth. The composition of these microbial communities (hereafter named microbiota) are mostly specific, and thus notably linked to host taxonomy (Rohwer et al., 2002; Fraune & Bosch, 2007; Roterman et al., 2015; Brooks et al., 2016). In the context of host microbiota, the adage “tell me what you eat, and I will tell you what you are” might be easily translated to “tell me what your microbiota looks like, and I will tell you what you are” (even though diet highly influence microbiota composition (Sommer & Bäckhed, 2013; Wang et al., 2014; Carmody et al., 2015)).

Studies of hosts and their microbiota (such associations formed entities called holobionts) mostly concerned prokaryotes, but very few focused on microbial eukaryotes (protists). Consequently, it is unclear whether protist communities had also specific associations with hosts, and whether links exist between eukaryotic and prokaryotic microbiota. Methodological issues mainly explain this lack of knowledge. Indeed, although the 16S rRNA gene is well adapted to metabarcoding surveys of prokaryotic communities, 18S rRNA primers mostly amplify the abundant host DNA rather than protist communities.

To tackle this issue, we used existing specific primers (Clerissi et al., 2018), and we also developed blocking primers to study protists associated with subtropical aquatic snails (Planorbidae). We also analysed bacterial microbiote to determine a correlation between both the communities. Prokaryotic microbiota are very diverse for these snails (Ducklow, Clausen & Mitchell, 1981; Van Horn et al., 2012; Silva et al., 2013), and are highly influenced by host genetics (Allan et al., 2018). Several pathogens were identified within *Paenibacillus* (Duval et al., 2015) and *Vibrio* genera (Ducklow, Tarraza Jr. & Mitchell, 1980). Moreover, *Biomphalaria glabrata* snails were found to harbor an eukaryote symbiont, the Mesomycetozoea, *Capsaspora owczarzaki* (Hertel, Loker & Bayne, 2002; Hertel et al., 2004). This snail species is an intermediate host of the human pathogen *Schistosoma mansoni*, and strikingly while *C. owczarzaki* is a predator of *S. mansoni*, this Mesomycetozoea was mainly found in snails resistant to schistosome infections. In snails, some microscopic (metazoan ??) eukaryotes were also identified to be pathogens such as oomycetes (Baron et al., 2013), and rotifers (Azzam, 2013), but protist diversity remains poorly explored particularly at the community scale.

As a consequence, this study aims at (i) comparing specific and blocking primers to describe protist diversity within strains/species of planorbid snails, and (ii) analyzing potential covariation between protist and bacterial microbiota community assemblages. Such a pattern might reflect ecological interplays between microbial eukaryotes and prokaryotes.

Methods

Biological material

Five strains of Planorbidae snails were used in this study (Table 1): three strains of *Biomphalaria glabrata*, two from Brazil (BgBAR and BgBRE) and one experimentally selected for reduced compatibility to different *S. mansoni* parasite strains (BgBS90) (Theron et al., 2014), a strain of another Planorbinae genus (*Planorbarius metidjensis*), and a strain of a Planorbidae non-Planorbinae species (*Bulinus truncatus*).

Table 1. Microbiota samples from three snail species.

Species	Strain	Nb of samples	Sample name	Origin
<i>Biomphalaria glabrata</i>	Barreiro	3	BgBAR	Belo Horizonte, Brazil
	Brazil	11	BgBRE	Recife, Brazil
	Mass selection	4	BgBS90	Salvador, Brazil
<i>Bulinus truncatus</i>	Spain	1	Btru	Almeria, Spain
<i>Planorbarius metidjensis</i>	Spain	5	Pmet	Salamanca, Spain

Rearing conditions

All strains were reared in the same conditions and maintained within water tanks of 8L at constant temperature of 26°C. Snails were fed every 2 days with lettuce (and fasted one week before sampling) and 50% of the water was renewed every week.

Design of blocking primers for snails

To reduce the proportion of host DNA amplification, two strategies were compared. First, we used existing specific primers targeting eukaryotic communities, but avoiding host amplification. The specific primer sets for metazoan-associated protists were previously designed to amplify V1V2 loops of the 18S rRNA gene (Clerissi et al., 2018) (Table 2).

Secondly, new blocking primers were designed to block the host DNA amplification using 18SV4 primer set (Table 2). The non redundant (99 %) Silva SSU database (release 128, September 2016) (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2013) was downloaded and only the sequences matching with 18SV4 primer set (with only one allowed mismatch) were used for subsequent analysis. Metazoa were removed from the protist dataset, and a host database was also created keeping all sequences of Heterobranchia species (mollusc sub-class that includes Planorbidae). The last 40 nucleotides of Heterobranchia, corresponding to the 3'-region of host amplicon including the reverse primer, were aligned with the metazoan-free database using Muscle v3.8.31 (Edgar, 2004). Blocking primers were designed to overlap with this region. Entropy decomposition (R package {otu2ot}, CalcEntropy seq) (Ramette & Buttigieg, 2014) was used to check the alignment of nucleotides between both Heterobranchia and protist databases. The diversity of Heterobranchia was particularly high at the 3' region of host amplicons (Fig. S1), thus the Biomphalaria genus was targeted to design blocking primer (28 bp) with a 10 bp overlap with the reverse primer, and a T_m similar to the targeted primer set. The blocking primer was synthesized using a Spacer C3 CPG (3 hydrocarbons) at the 3'-end, in order to prevent the PCR elongation as previously described (Vestheim & Jarman, 2008; Leray et al., 2013). For bacterial community analysis, we targeted V3V4 loops of the 16S rRNA gene using the 341F and 805R primer set (Table 2) (Klindworth et al., 2013).

Table 2. Specific and blocking primers used in this study.

Marker region	Target	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')	Blocking primer (5'->3')
16SV3V4	Bacteria	CCTACGGGNGGC WGCAG	GACTACHVGGGT ATCTAATCC	No
18SV1V2	Non-metazoa	ACCTGGTTGATCC TGCCA	GTARKCCWMTA YMYTACC	
18SV4	Eukaryota	CCAGCASCYGC GG TAATTCC	ACTTTCGTTCTTG ATYRA	TCTTGACTAATG AAAACATTCTTG ACAA

DNA extraction, PCR and sequencing

After collection of snail individuals, shells were cleaned with cotton bud soaked in bleach (to avoid transfers of contaminants on snail body), then molluscs were removed from shell by dissection and flash-frozen individually in liquid nitrogen before being kept at -80°C until DNA extraction.

DNA extraction was performed using the DNA from tissue kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. In order to improve DNA extractions, we performed an additional 30 seconds mechanical lysis using zirconium beads (BioSpec) and MagNA Lyser Instrument (Roche), before the 90 min enzymatic lysis in the presence of proteinase K. DNA concentration and quality were checked with Epoch microplate spectrophotometer (BioTek Instruments, Inc.).

Then, the rDNA genes were amplified and sequenced using the 16S V3V4 loop for bacterial communities (Klindworth et al., 2013) and the 18S variable V1V2 and V4 loops for eukaryotic communities (Table 2) (Wuyts et al., 2002; Stoeck et al., 2010; Clerissi et al., 2018). Library construction and paired-end sequencing (250 bp read length) were performed at the McGill University (Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Canada). Locus-specific PCR reactions were carried out in a 25 μ l volume with final concentrations of 0.4 μ M of each PCR primers, 0.02 U of the Qiagen Hotstar Taq DNA Polymerase, 0.2 mM of the dNTP mix and 1xTaq buffer. In order to reduce amplification of snail amplicons for 18SV4, blocking primers were added to the PCR mix at a final concentration of 1.2 μ M. PCR cycling included an initial incubation of 15 min at 96 $^{\circ}$ C followed by 35 cycles of 96 $^{\circ}$ C for 30 sec, 52 $^{\circ}$ C for 30 sec and 72 $^{\circ}$ C for 1 min, with a final 10 min incubation at 72 $^{\circ}$ C. Sequencing was performed on the MiSeq system (Illumina) using the v2 chemistry according to the manufacturer's protocol. Raw sequence data are available in the SRA database (accession number PRJNA579897).

Sequence analyses

We used the FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented into a galaxy instance (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) for sequence analysis (Escudié et al., 2017). Briefly, paired reads were merged using FLASH (Mago c & Salzberg, 2011). After denoising and primer/adapters removal with cutadapt (Martin, 2011), de novo clustering was done using SWARM that uses a local clustering threshold, with denoising and aggregation distance $d=3$ (Rognes et al., 2015). Chimera were removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016). We filtered the dataset for singletons and we annotated OTUs using Blast+ against the Protist Ribosomal Reference database (PR2) (Guillou et al., 2013) for protist sequences, and the Silva database (release 123, September 2015) for bacterial sequences.

Subsequent analyses were done using R v3.3.1. Rarefaction curves of species richness for protists and bacteria were produced using the {phyloseq} R package and the ggrare function. In order to compare samples for alpha and beta diversity, we subsampled the dataset to 5160 reads per sample for all markers using the rarefy_even_depth function. The alpha diversity

metrics (Observed, Chao1, Simpson and Shannon) were estimated at the OTU level with the `estimate_richness` function. Moreover, Pielou's measure of species evenness was computed using the `diversity` function in `{vegan}`. We also used `phyloseq` to obtain abundances at different taxonomic ranks (from genus to phylum) (`tax_glom` function).

Statistical analyses

Clustering methods were used to describe composition of microbial communities between samples. Hierarchical clusterings (average linkages (`hclust {stats}`)) of microbial communities were computed using Bray-Curtis dissimilarities (`vegdist {vegan}`). Clusterings of 18SV4 and 16SV3V4 were plotted face-to-face using the `tanglegram` function (`{dentextend}`). Abundances associated with each sample were plotted face to clustering using the `heatmap.2` function and the `{gplots}` package.

We performed Student's t-test (`t.test {stats}`) or non-parametric Wilcoxon test (`wilcox.test {stats}`) (when normality was rejected with the Shapiro-Wilk test, (`shapiro.test {stats}`)) to compare relative abundances of higher taxonomic ranks (hosts, Embryophyceae, protist, others) and alpha diversity metrics (Chao1, Simpson, Pielou's evenness and Shannon) between 18SV1V2 and 18SV4. Moreover, we tested the correlation between 18SV4 and 16SV3V4 for alpha diversity metrics using Spearman's rho statistic (`cor.test {stats}`). Lastly, we tested the correlation between protist and bacterial assemblages (based on Bray-Curtis dissimilarities) using the Mantel test (`mantel {vegan}`). P-values were adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni correction (`p.adjust {stats}`).

Phylogenetic analysis of Mycoplasmataceae sequences

We computed BLASTn (Altschul et al., 1990) searches of OTU_66 sequence (Mycoplasmataceae) against the non-redundant nucleotide collection of NCBI. We kept only hits having 100% coverage, being annotated as Mycoplasmataceae, and having host information in their annotation. Sequences used to estimate the phylogenetic relationships of Mycoplasmataceae isopod symbionts (Fraune & Zimmer, 2008) were also downloaded from NCBI. In order to reduce the number of sequences, they were aligned using MAFFT (Kato et al., 2002), the alignment was trimmed at each extremity, and sequences were clustered at different nucleotide similarities (from 90 to 99%) using Mothur (Schloss et al., 2009). The reduced alignment obtained at 95% similarity cutoff was conserved for the next analyses, in order to use less than 100 sequences to compute a readable phylogenetic tree. In addition to the Mycoplasmataceae OTUs of this study, four sequences of *Escherichia coli* (used as outgroups)

were added to the output alignment from Mothur, aligned using MAFFT, and trimmed at each extremity. Finally, poorly aligned and highly variable regions of the alignment were automatically removed using GBlocks [55], and maximum likelihood (ML) trees were computed with IQ-TREE v1.3.8 using the best model (selected with the Bayesian information criterion) (Nguyen et al., 2014), and validated via an ultrafast bootstrap procedure with 1000 replicates (Quang et al., 2013).

Results

Design of blocking primers to study protist microbiota

A preliminary sequencing test was performed to describe protist communities associated with a *B. glabrata* sample using the 18S rDNA V4 loop (Table 2). However, because this primer set was designed to amplify all eukaryotes (Stoeck et al., 2010), *B. glabrata* amplicons were dominants (i.e., 81.4% of 2445 sequences).

In order to increase the proportion of protist sequences, a blocking primer targeting the 18S V4 region of the *Biomphalaria* genus (18SV4BP) was designed. About 75 % of *Biomphalaria* amplicons were predicted to be removed using the blocking primer (Table S1). Moreover, a very low proportion (<1%) of protist amplicons might be targeted by this blocking primer.

Comparison of blocking and specific primers on Planorbidae snails

In order to describe protist assemblages within Planorbidae snails, we used the newly designed blocking primer as well as a specific primer sets targeting V1V2 loops of the 18S rRNA gene (hereafter named 18SV4BP and 18SV1V2SP respectively), and avoiding metazoan sequences (Clerissi et al., 2018). Multiple host strains were selected to favor the identification of replicable microbiota characteristics. In particular, individuals from three Planorbidae species (*B. glabrata* (three different strains), *P. metidjensis* and *B. truncatus*) were used in this study (Table 1). On average, each sample had 10,339 host sequences, and 7,224 protist sequences representing 196 OTUs (Tables S2, S3, S4).

A comparison of the proportion of host, Embryophyceae, protists and other sequences (i.e., other metazoan and multi-affiliations) for both marker regions revealed no amplification of host

sequences with 18SV1V2SP, while contaminations remained with 18SV4BP (56%) (Fig. 1 and Table S2).

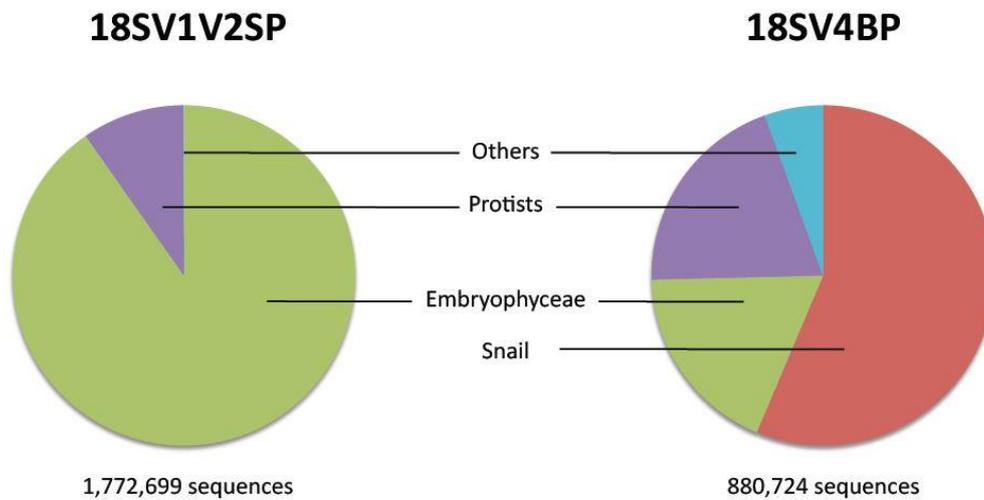


Fig. 1. Sequences of snails, Embryophyceae, protists and other taxonomic groups for 18SV1V2SP and 18SV4BP.

Although snail sequences were absent from 18SV1V2SP samples, the protist fraction was higher for 18SV4BP (20% with 18SV4BP and 10% with 18SV1V2SP) because of a high proportion of Embryophyceae for 18SV1V2SP (90%) that may be due to residues of lettuce feeding of snails, according to their coprophagous behaviour (Table 3). Consequently, bias linked to the presence of Embryophyceae was significantly lower for 18SV4BP than 18SV1V2SP.

Table 3. Comparison of the relative abundances of taxonomic groups between 18SV1V2SP and 18SV4BP. Numbers into brackets are p-values. "18SV1V2SP" and "18SV4BP" indicate which marker had significantly higher values.

Variable	Marker with higher values
Snails	18SV4BP (<0.001)
Embryophyceae	18SV1V2SP (<0.001)
Protists	18SV4BP (0.02)
Others	18SV4BP (<0.001)

Secondly, we computed a comparison of 18SV1V2SP and 18SV4BP for different alpha diversity indices (Tables 4 and S5). Samples with less than 5160 protist sequences were removed from the analysis and the dataset was rarefied to this minimum value. Because of the observed bias towards Embryophyceae sequences, only 7 out of 24 18SV1V2SP samples had more than 5160 protist sequences. In contrast, 13 out of 24 18SV4BP samples were above this

threshold. Among them, 4 samples were shared between 18SV1V2SP and 18SV4BP, and were thus used for subsequent analyses. Higher values of evenness and Simpson were obtained for 18SV1V2SP compared to 18SV4BP (Tables 4 and S5).

Table 4. Comparison of alpha diversity indices for protists between 18SV1V2SP and 18SV4BP. Numbers into brackets are p-values. "18SV1V2SP" and "18SV4BP" indicate which marker had significantly higher values.

Index	Marker with higher values
Observed	NS (1)
Chao1	NS (1)
Evenness	18SV1V2SP (0.032)
Simpson	18SV1V2SP (0.041)
Shannon	NS (0.098)

Although 18SV1V2SP excluded most snail host DNA, the proportion of protists was higher for 18SV4BP. In this context, the 18SV4BP marker was used to compare protist and bacterial assemblages within snails.

Comparisons between eukaryotic and prokaryotic microbial communities

We compared eukaryotic and prokaryotic microbiota using 18SV4BP (Table S4) and 16SV3V4 (Table S6) datasets. Similarly, a threshold of 5160 sequences to select samples and rarefy the 16SV3V4 dataset of prokaryotes was applied. Altogether, 13 samples were kept for analyses of alpha and beta diversities.

First, the correlation between 18SV4BP and 16SV3V4 datasets for alpha diversity indices revealed that eukaryotic and prokaryotic microbial communities were not significantly correlated for any indices (Table 5).

Table 5. Correlation for alpha diversity indices between eukaryotic (18SV4BP) and prokaryotic (16SV3V4) microbial communities. Numbers are correlation coefficients (Spearman's rho), numbers into brackets are p-values.

Index	Spearman's rho correlation coefficient
Observed	-0.499 (0.082)
Chao1	-0.451 (0.121)
Evenness	0.368 (0.217)
Simpson	0.071 (0.821)
Shannon	0.225 (0.459)

Secondly, analyses of beta diversity showed that both communities displayed similar patterns (Fig. 2), and that dissimilarities were significantly correlated ($r=0.81$, $p=0.001$, Mantel test).

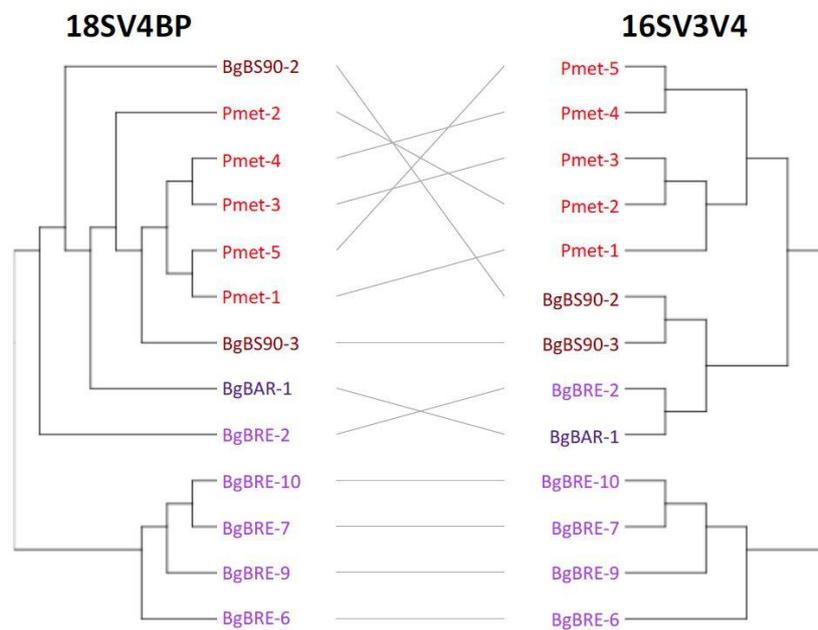


Fig. 2. Clustering of microbial communities using 18SV4BP and 16SV3V4. Clustering were computed using Bray-Curtis dissimilarities based on abundances of OTUs, and the average linkage method. Each color is a snail strain. The grey lines rely the same samples between 18SV4BP and 16SV3V4.

Dominant microbiota associated with Planorbidae snails

In order to identify dominant taxa, we first studied eukaryotic and prokaryotic microbiota at the phyla level. Prokaryotes were more diverse than protists, and Proteobacteria and Bacteroidetes were the most abundant bacteria phyla with also high proportions of Tenericutes, Planctomycetes and Actinobacteria (Fig. 3). Protists were mainly represented by Amoebozoa and Opisthokonta.

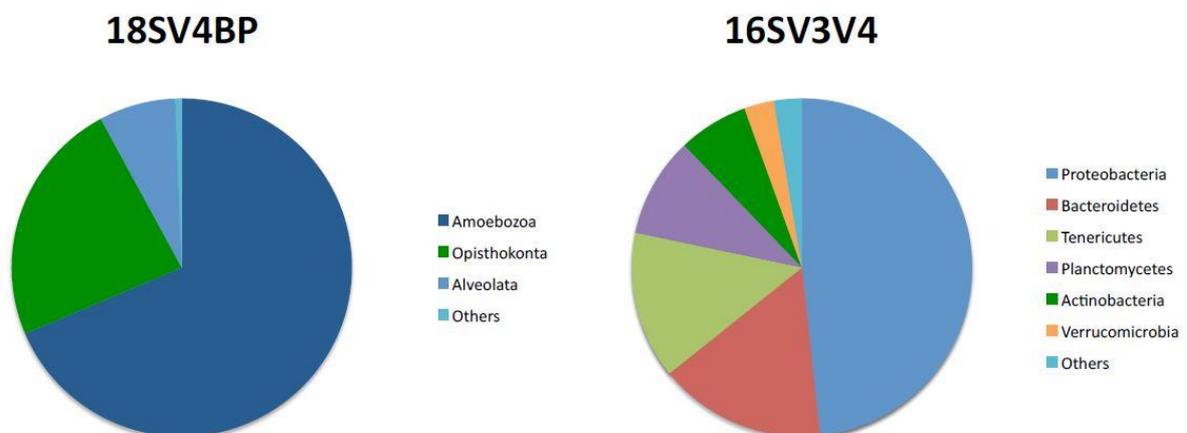


Fig. 3. Dominant phyla of snail-associated microbial communities using 18SV4BP and 16SV3V4.

Secondly, we described the distribution of dominant taxa at the family level (Fig. 4). We found that two Amoebozoa (Lobosa and Pseudoperkinsidae) were the main protists within snails, and that they had antagonistic distributions. In contrast, Comamonadaceae, Flavobacteriaceae, Mycoplasmataceae, Planctomycetaceae, and Pseudomonadaceae were common bacterial families within snail microbiota. Lastly, we studied snail microbiota at the OTU level. In particular, we described the structure of microbial communities and the identity of dominant OTUs. OTUs for the bacterial 16SV3V4 marker showed more even structures than 18SV4BP (values of evenness: 0.66 for 16SV3V4; 0.38 for 18SV4BP, respectively). Accordingly, dominant OTU corresponded to 12% (OTU_4, Mycoplasmataceae, phylum: Tenericutes) of bacterial microbiota (Table S6). In contrast, dominant eukaryotic OTUs represented 68% (OTU_7, sub-phylum Lobosa, phylum: Amoebozoa) (Table S4).

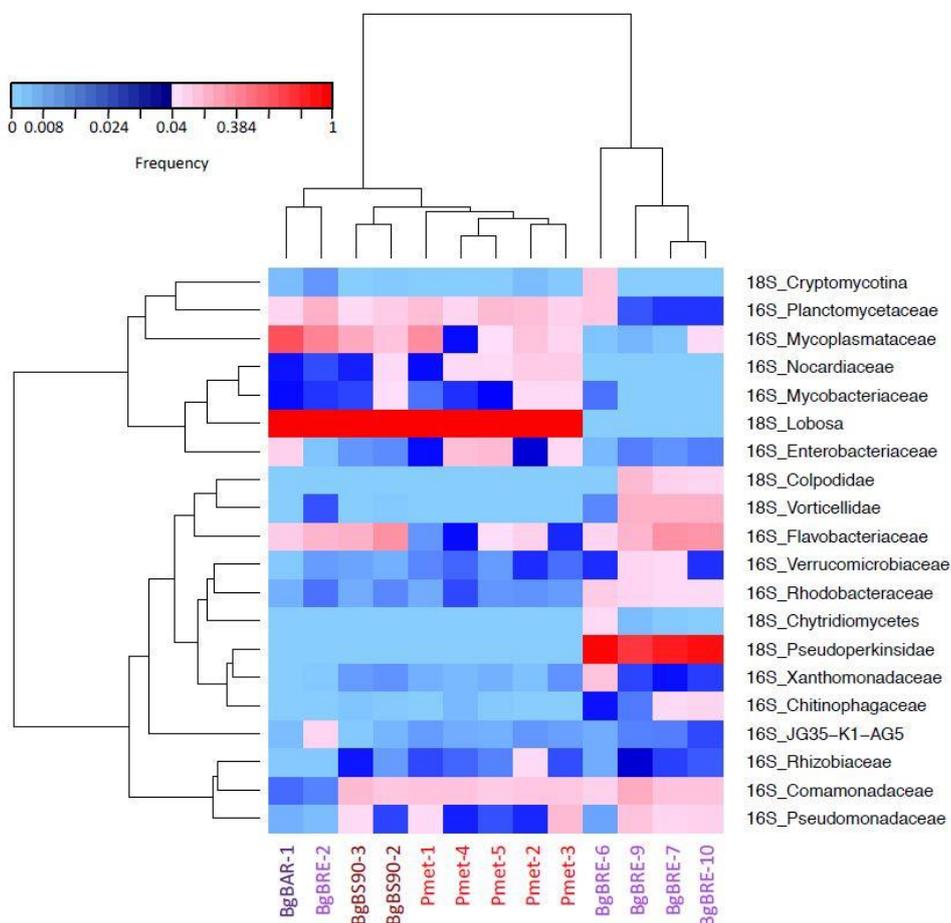


Fig. 4. Distribution of dominant families of snail-associated microbial communities using 18SV4BP and 16SV3V4. Clustering was computed based on family abundances using Bray-Curtis dissimilarities or Spearman's rho correlation coefficient distances (average linkage method) for samples and taxa, respectively. The corresponding marker gene precedes family names. Only families with a relative abundance above 4 % in at least one sample are shown.

Mycoplasmataceae in Planorbidae snails and other organisms

A Mycoplasmataceae OTU dominated microbiota of Planorbidae snails (Fig. 4 and Table S6). Interestingly, we found that Mycoplasmataceae was already identified in other mollusc species (Table 6), when we compared the nucleotide sequence of the representative OTU_66 to the nucleotide collection of NCBI using BLASTn. Therefore, we computed a phylogenetic tree using available sequences of Mycoplasmataceae from NCBI (see Methods for more details). This analysis showed that this family is associated with a diverse set of hosts (oysters, snails, algae, birds, chitons, cnidarians, fishes, isopods, mammals, reptiles, shrimps, spiders, and termites) (Fig. 5). Several host transfers occurred for Mycoplasmataceae strains between mammals, birds, and reptiles. In contrast, Mycoplasmataceae associated with snails, termites, and isopods formed monophyletic groups, suggesting host specific interactions or environmental segregation. Oyster-associated Mycoplasmataceae were also closely related in the phylogeny (even though one OTU was closed to strains associated with fishes and mammals), but it is likely that host switches to cnidarians occurred as well.

Table 6. BLASTn searches of Mycoplasmataceae in other molluscs species (NCBI).

Host	Identity (%)	Coverage (%)	Accession number	Description	Reference
Oyster	94	100	JF827518.1	Uncultured clone 300F3 in <i>Crassostrea gigas</i>	(Fernandez-Piquer et al., 2012)
Giant African snail	93	100	JN211307.1	Uncultured clone SN_ST_4 in <i>Achatina fulica</i>	(Pawar et al., 2012)
Chiton	92	100	HE663319.1	Uncultured clone LBDT7262 in <i>Leptochiton boucheti</i>	(Duperron et al., 2013)

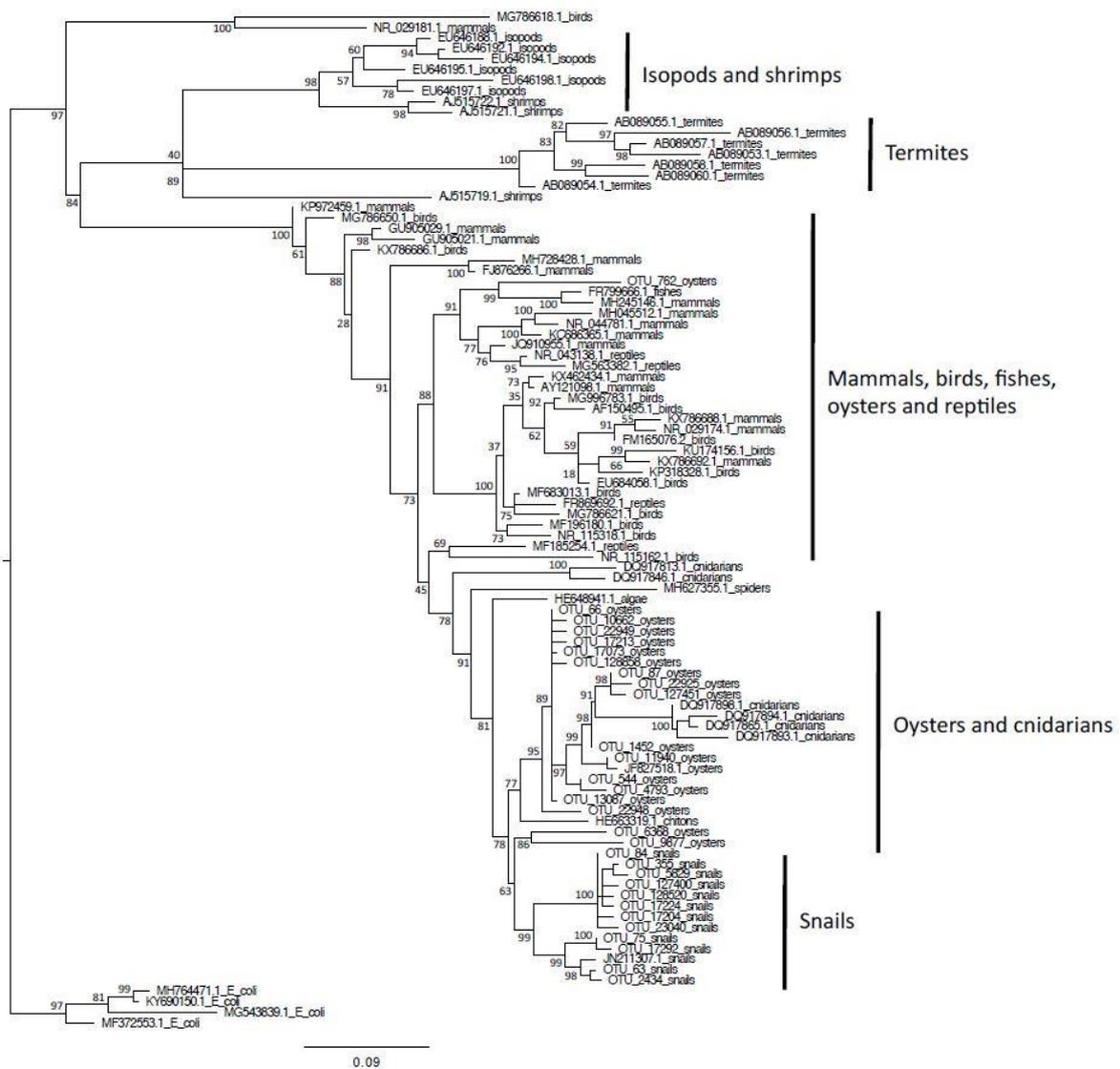


Fig. 5. Maximum-likelihood phylogenetic tree of Mycoplasmataceae sequences. The tree was rooted using *Escherichia coli* sequences. Numbers are ultrafast bootstraps (%) reflecting clade support.

Discussion

Efficiency of blocking and specific primers

Various efficiencies were observed for the different samples using the designed blocking primer. On average, host sequences still represented 53% (from 19 to 97%). Such variations were already reported in previous studies (Vestheim & Jarman, 2008; Leray et al., 2013; Clerissi et al., 2018), and might be mainly linked to the proportion of host amplicons in the PCR output. In contrast, 18SV1V2SP amplified less than 1% of host sequences. It also produced a higher amount of Embryophyceae sequences, reducing the proportion of protist sequences identified. These results thus suggested that, even if host contamination remained high, the use of 18SV4BP would be better suited to characterize protist communities of snails.

Moreover, metabarcoding analyses commonly use the V4 loop of 18S rRNA gene (Stoeck et al., 2010; Decelle et al., 2014; Massana et al., 2014; Hu et al., 2015; Giner et al., 2016; Piredda et al., 2017; Tragin et al., 2017), thus making possible the comparison with diverse types of samples, here, the comparison between several mollusks species.

Significant correlations between eukaryotic and prokaryotic microbial assemblages

Our analyses highlighted that eukaryotic and prokaryotic microbial assemblages were significantly correlated based on community dissimilarity values (Table 5). This link might be related to host factors, but also to ecological interplays between eukaryotes and prokaryotes. Indeed, members of both communities establish relationships for biogeochemical cycles when they are free in the environment (Azam et al., 1983; Thingstad et al., 2008). They could also be linked to top-down or sideways factors, because ciliates and flagellates are known grazers of bacteria (Raven, Finkel & Irwin, 2005), and competition exists between bacteria and protists for nutrients (Thingstad et al., 2008). Grazers such as amoeba might also contain various resistant microorganisms (prokaryotes and viruses), and even play a role of melting pot for microbial evolution (Boyer et al., 2009; Moliner, Fournier & Raoult, 2010). This study aims to explore these relationships within the same macroorganism.

Dominant taxa within Planorbidae snails

We identified dominant protists and bacteria associated with snails (Fig. 3). Among them, several taxa were already observed in other related host strains, suggesting that they might be part of these holobionts. The amiboïd *C. owczarzaki* (Mesomycetozoea) was proposed to be an eukaryotic symbiont of *B. glabrata* (Hertel, Loker & Bayne, 2002; Hertel et al., 2004), but we did not find related sequences in our dataset. However, an amoeba from the Lobosa sub-phylum prevailed in snail microbiota, and a closely related genus to *C. owczarzaki* (*Anurofeca* genus) was also present in this study. Because *C. owczarzaki* might favor snail resistance to *S. mansoni*, it would be interesting to explore if closely related genus and amoeba might predate this parasite. Thus, future studies might test if *Anurofeca* and Lobosa are involved in snail holobiont homeostasis. Lastly, one bacterial OTU from the Mycoplasmataceae family dominated snail bacterial microbiota in our dataset. Actually, links with Mycoplasmataceae strains were already observed for many invertebrate hosts, such as chitons (Duperron et al., 2013), snails (Pawar et al., 2012), oysters (King et al., 2012; Fernandez-Piquer et al., 2012; de Lorgeril et al., 2018), isopods, and termites (Fraune & Zimmer, 2008) (Fig. 5).

Specific association with Mycoplasmataceae strains

Although Mycoplasmataceae are known pathogens of mammals and birds, they might have beneficial roles for other organisms. Notably, a link was observed between oyster mortalities and decrease of the genus *Mycoplasma* (Mycoplasmataceae family) in oyster microbiota (de Lorgeril et al., 2018). A similar trend with host mortality was also highlighted for isopods. Indeed, isopods harboring Mycoplasmataceae symbionts had higher survival rates on low-quality foods than isopods lacking this symbiont within their microbiota (Fraune & Zimmer, 2008). In this study, we found that this family showed specific host-symbiont interactions, forming different monophyletic groups for isopods (such as previously observed (Fraune & Zimmer, 2008)), snails, and possibly oysters (even though host switches likely occurred to cnidarians according to the phylogeny) (Fig. 6).

Additional sequences will be needed in the future to precisely describe Mycoplasmataceae diversity within these groups, and to test the hypothesis that the observed phylogenetic pattern is linked to host-symbiont interactions, and not simply to environmental segregation. It will be also necessary to study the exact nature of relationships between Mycoplasmataceae and hosts. However, it might be difficult to estimate their role within holobionts, and to differentiate mutualism from commensalism. In particular, because Mycoplasmataceae strains lack peptidoglycan, they might be more resistant to host-producing antibiotics that inhibit cell wall synthesis (Fuerst & Sagulenko, 2011). As a consequence, this family might be resident within these microbiota, but it is possible that such bacteria do not affect host phenotypes.

Conclusions

To conclude, we compared specific and blocking primers to describe eukaryotic microbiota from several snail strains. The use of blocking primers for the 18SV4 marker gene allowed comparisons of protist with prokaryotic assemblages. Eukaryotic and bacterial microbiota were correlated in this study for community dissimilarities. Future studies should test whether this link is due to host or environmental factors, or if ecological interplays exist between protists and bacteria within snail microbiota. Furthermore, we identified dominant taxa from Amoebozoa, Opisthokonta, Proteobacteria and Bacteroidetes phyla. Lastly, we highlighted a specific association with Mycoplasmataceae strains. We did not know if all these taxa influenced host homeostasis, but future studies should reveal their diversity, distribution and possible role within holobionts.

Declarations

Ethics approval and consent to participate: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Availability of data and materials: The datasets generated during the current study are available in the Sequence Read Archive repository under submission ID PRJNA579897 (to be released upon publication).

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Funding: CH and AP benefited from a doctoral fellowship from. CC benefited from post-doctoral fellowships from CNRS and IFREMER. This work was supported by the DHOF program of the UMR5244/IHPE (<http://ihpe.univ-perp.fr/en/ihpe-transversal-holobiont/>). This study was supported by the "Laboratoire d'Excellence (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41).

Authors' contributions: CC, BG and ET were involved in the study concept and design. CH and AP were involved in data acquisition. CH, CC and ET were involved in data analyses. CH, CC and ET drafted the manuscript and all authors contributed to critical revisions and approved the final manuscript.

Acknowledgements: We thank IHPE members, and more especially Jean-Michel Escoubas, for stimulating discussions. We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing help and computing resources thanks to Galaxy instance <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>. We are also grateful to Sébastien Brunet and Pierre Lepage from the McGill University and Genome Quebec Innovation Center for technical assistances.

References

- Allan ERO, Tennessen JA, Sharpton TJ, Blouin MS. 2018. Allelic variation in a single genomic region alters the microbiome of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Heredity*:1–6. DOI: 10.1093/jhered/esy014.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Azam F, Fenchel T, Field J, Gray J, Meyer-Reil L, Thingstad F. 1983. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series* 10:257–263. DOI: 10.3354/meps010257.
- Azzam KM. 2013. Effect of some Rotifers on the Embryonic Development and Mortality of *Biomphalaria alexandrina* (Ehrenberg). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 23:319–323.

- Baron OL, van West P, Industri B, Ponchet M, Dubreuil G, Gourbal B, Reichhart JM, Coustau C. 2013. Parental Transfer of the Antimicrobial Protein LBP/BPI Protects *Biomphalaria glabrata* Eggs against Oomycete Infections. *PLoS Pathogens* 9:1–10. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003792.
- Boyer M, Yutin N, Pagnier I, Barrassi L, Fournous G, Espinosa L, Robert C, Azza S, Sun S, Rossmann MG, Suzan-Monti M, La Scola B, Koonin E V, Raoult D. 2009. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *PNAS* 106:21848–21853.
- Brooks AW, Kohl KD, Brucker RM, van Opstal EJ, Bordenstein SR, Relman D. 2016. Phylosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol* 14:1–29. DOI: 10.1371/journal.pbio.2000225.
- Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, Turnbaugh PJ. 2015. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. *Cell Host and Microbe* 17:72–84. DOI: 10.1016/j.chom.2014.11.010.
- Clerissi C, Toulza E, Brunet S, Vidal-Dupiol J, Adjeroud M, Lepage P, Guillou L, Escoubas J-M. 2018. Protists Within Corals: The Hidden Diversity. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02043.
- Decelle J, Romac S, Sasaki E, Not F, Mahé F. 2014. Intracellular Diversity of the V4 and V9 Regions of the 18S rRNA in Marine Protists (Radiolarians) Assessed by High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE* 9:104297. DOI: 10.1371/journal.pone.0104297.
- Ducklow HW, Clausen K, Mitchell R. 1981. Ecology of bacterial communities in the schistosomiasis vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Microbial Ecology* 7:253–274. DOI: 10.1007/BF02010308.
- Ducklow HW, Tarraza Jr. HM, Mitchell R. 1980. Experimental pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* for the schistosome-bearing snail *Biomphalaria glabrata*. *Canadian Journal of Microbiology* 26:503–506. DOI: 10.1139/m80-084.
- Duperron S, Pottier M-A, Léger N, Gaudron SM, Puillandre N, Le Prieur S, Sigwart JD, Ravaux J, Zbinden M. 2013. A tale of two chitons: is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 83:552–567. DOI: 10.1111/1574-6941.12014.
- Duval D, Galinier R, Mouahid G, Toulza E, Allienne JF, Portela J, Calvayrac C, Rognon A, Arancibia N, Mitta G, Théron A, Gourbal B. 2015. A Novel Bacterial Pathogen of *Biomphalaria glabrata*: A Potential Weapon for Schistosomiasis Control? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9:1–20. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003489.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Research* 32. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Escudé F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2017. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287–1294. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx791.
- Fernandez-Piquer J, Bowman JP, Ross T, Tamplin ML. 2012. Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. *Journal of Applied Microbiology* 112:1134–1143. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05287.x.
- Fraune S, Bosch TCG. 2007. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *PNAS* 104:13146–13151.
- Fraune S, Zimmer M. 2008. Host-specificity of environmentally transmitted *Mycoplasma*-like isopod symbionts. *Environmental Microbiology* 10:2497–2504. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01672.x.
- Fuerst JA, Sagulenko E. 2011. Beyond the bacterium: Planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology* 9:403–413. DOI: 10.1038/nrmicro2578.

- Giner CR, Forn I, Romac S, Logares R, De Vargas C, Massana R. 2016. Environmental Sequencing Provides Reasonable Estimates of the Relative Abundance of Specific Picoeukaryotes Downloaded from. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:4757–4766. DOI: 10.1128/AEM.00560-16.
- Guillou L, Bachar D, phane Audic S, Bass D, dric Berney C, Bittner L, Boutte C, tan Burgaud G, de Vargas C, Decelle J, del Campo J, Dolan JR, Dunthorn M, Edvardsen B, Holzmann M, HCF Kooistra W, Lara E, Le Bescot N, Logares R, dé ric Mahé F, Massana R, Montresor M, Morard R, Not F, Pawlowski J, Probert I, Sauvadet A-L, Siano R, Stoeck T, Vaultot D, Zimmermann P, Christen R. 2013. The Protist Ribosomal Reference database (PR 2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research* 41:597–604. DOI: 10.1093/nar/gks1160.
- Hertel LA, Barbosa CS, Santos RAAL, Loker ES, Hertel LA, Barbosa S, Santos RAAL, Loker ES. 2004. Molecular Identification of Symbionts From the Pulmonate Snail *Biomphalaria Glabrata* in Brazil Molecular Identification of Symbionts From the Pulmonate Snail. 90:759–763.
- Hertel LA, Loker ES, Bayne CJ. 2002. The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoa. *International Journal for Parasitology* 32:1183–1191. DOI: 10.1016/S0020-7519(02)00066-8.
- Van Horn DJ, Garcia JR, Loker ES, Mitchell KR, Mkoji GM, Adema CM, Takacs-Vesbach CD. 2012. Complex intestinal bacterial communities in three species of planorbid snails. *Journal of Molluscan Studies* 78:74–80. DOI: 10.1093/mollus/eyr038.
- Hu SK, Liu Z, Lie AAY, Countway PD, Kim DY, Jones AC, Gast RJ, Cary SC, Sherr EB, Sherr BF, Caron DA. 2015. Estimating protistan diversity using high-throughput sequencing. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62:688–693. DOI: 10.1111/jeu.12217.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K-I, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acid Research* 30.
- King GM, Judd C, Kuske CR, Smith C. 2012. Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. *PloS one* 7:e51475. DOI: 10.1371/journal.pone.0051475.
- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41:e1. DOI: 10.1093/NAR/GKS808.
- Leray M, Agudelo N, Mills SC, Meyer CP, Schierwater B. 2013. Effectiveness of Annealing Blocking Primers versus Restriction Enzymes for Characterization of Generalist Diets: Unexpected Prey Revealed in the Gut Contents of Two Coral Reef Fish Species. DOI: 10.1371/journal.pone.0058076.
- de Lorgeril J, Lucasson A, Petton B, Toulza E, Montagnani C, Clerissi C, Vidal-Dupiol J, Chaparro C, Galinier R, Escoubas J-M, Haffner P, Dégremont L, Charrière GM, Lafont M, Delort A, Vergnes A, Chiarello M, Faury N, Rubio T, Leroy MA, Pérignon A, Régler D, Morga B, Alunno-Bruscia M, Boudry P, Le Roux F, Destoumieux-Garzón D, Gueguen Y, Mitta G. 2018. Sup : Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature communications* 9:4215. DOI: 10.1038/s41467-018-06659-3.
- Magoč T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* (Oxford, England) 27:2957–63. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.

- Massana R, Del Campo J, Sieracki ME, Audic S, Logares R. 2014. Exploring the uncultured microeukaryote majority in the oceans: Reevaluation of ribogroups within stramenopiles. *ISME Journal* 8:854–866. DOI: 10.1038/ismej.2013.204.
- Moliner C, Fournier PE, Raoult D. 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* 34:281–294. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00209.x.
- Nguyen L-T, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. 2014. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32:268–274. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
- Pawar KD, Banskar S, Rane SD, Charan SS, Kulkarni GJ, Sawant SS, Ghate H V., Patole MS, Shouche YS. 2012. Bacterial diversity in different regions of gastrointestinal tract of Giant African Snail (*Achatina fulica*). *MicrobiologyOpen* 1:415–426. DOI: 10.1002/mbo3.38.
- Piredda R, Tomasino MP, Manzari C, Pesole G, Montresor M, C F Kooistra WH, Sarno D, Zingone A. 2017. Diversity and temporal patterns of planktonic protist assemblages at a Mediterranean Long Term Ecological Research site. *FEMS Microbiology Ecology* 93:200. DOI: 10.1093/femsec/fiw200.
- Quang B, Anh M, Nguyen T, Von Haeseler A. 2013. Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol/ Biol. Evol.* 30:1188–1195. DOI: 10.1093/molbev/mst024.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Rg Peplies J, Glö Ckner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acid Research* 41. DOI: 10.1093/nar/gks1219.
- Ramette A, Buttigieg PL. 2014. The R package otu2ot for implementing the entropy decomposition of nucleotide variation in sequence data. *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00601.
- Raven JA, Finkel Z V., Irwin AJ. 2005. Picophytoplankton: Bottom-up and top-down controls on ecology and evolution. *Vie et Milieu* 55:209–215.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4:e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584.
- Rognes T, Mahé F, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2015. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ PeerJ* 3:e1420. DOI: 10.7717/peerj.1420.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series* 243:1–10. DOI: 10.3354/meps243001.
- Roterman YR, Benayahu Y, Reshef L, Gophna U. 2015. The gill microbiota of invasive and indigenous *Spondylus* oysters from the Mediterranean Sea and northern Red Sea. *Environmental Microbiology Reports* 7:860–867. DOI: 10.1111/1758-2229.12315.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 75:7537–7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09.
- Silva TM, Melo ES, Lopes ACS, Veras DL, Duarte CR, Alves LC, Brayner FA. 2013. Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 57:19–25. DOI: 10.1111/lam.12068.
- Sommer F, Bäckhed F. 2013. The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* 11:227–238. DOI: 10.1038/nrmicro2974.
- Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones MDM, Breiner H-W, Richard TA. 2010. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology* 19:21–31. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x.

- Theron A, Rognon A, Gourbal B, Mitta G. 2014. Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: A new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infection, Genetics and Evolution* 26:80–88. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.04.025.
- Thingstad TF, Bellerby RGJ, Bratbak G, Børsheim KY, Egge JK, Heldal M, Larsen A, Neill C, Nejtgaard J, Norland S, Sandaa RA, Skjoldal EF, Tanaka T, Thyrraug R, Töpper B. 2008. Counterintuitive carbon-to-nutrient coupling in an Arctic pelagic ecosystem. *Nature* 455:387–390. DOI: 10.1038/nature07235.
- Tragin M, Zingone A, Vaultot D, Tragin M, Zingone A, Vaultot D. 2017. Comparison of coastal phytoplankton composition estimated from the V4 and V9 regions of 18S rRNA gene with a focus on photosynthetic groups and especially Chlorophyta To cite this version : HAL Id : hal-01628365. *Environmental Microbiology* 20:506–520.
- Vestheim H, Jarman SN. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology* 5. DOI: 10.1186/1742-9994-5-12.
- Wang J, Linnenbrink M, Künzel S, Fernandes R, Nadeau M-J, Rosenstiel P, Baines JF, McDonald E. 2014. Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *PNAS* 111. DOI: 10.1073/pnas.1402342111.
- Wuyts J, Van De Peer Y, Winkelmans T, De Wachter R. 2002. The European database on small subunit ribosomal RNA.
- Yilmaz P, Parfrey LW, Yarza P, Gerken J, Pruesse E, Quast C, Schweer T, Rg Peplies J, Ludwig W, Glöckner FO. 2013. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acid Research* 42. DOI: 10.1093/nar/gkt1209.

Supplementary informations

Fig. S1. Nucleotide diversity (entropy) of Heterobranchia and metazoa-free sequences at the 3’-end of 18SV4 amplicons. Blue and red lines correspond to Heterobranchia and metazoa-free sequences, respectively. Dashed lines indicate positions of reverse (in light blue) and blocking (in black) primers.

Table S1. *In silico* specificity of blocking primers.

Table S2. Number of sequences and OTUs. NA: not analyzed.

Table S3. OTU annotations and abundances for 18SV1V2SP samples.

Table S4. OTU annotations and abundances for 18SV4BP samples.

Table S5. Metadata and alpha diversity indices. Alpha diversity indices correspond to 18SV1V2SP/18SV4BP/16SV3V4. NA: not analyzed.

Table S6. OTU annotations and abundances analysis for 16SV3V4 samples.

C. Analyses du microbiote bactérien

Au cours de cette partie de ma thèse, j'ai caractérisé le microbiote de différentes souches et espèces de Planorbidae, hôtes intermédiaires du schistosome, à l'état naïf.

Outre l'analyse du microbiote viral et protiste, je me suis focalisée majoritairement sur le microbiote bactérien. Tout d'abord, j'ai participé à l'analyse du microbiote dans une souche de *B. glabrata* originaire du Brésil, par séquençage MiSeq Illumina de l'ADN 16S, spécifique des bactéries. Les résultats ont indiqué une faible variation interindividuelle du microbiote, et une prédominance des Proteobacteria. De plus, les communautés bactériennes se sont révélées très stables au cours du temps. Le core bactérien a également été analysé. Ce core correspond à la part du microbiote qui se retrouve dans une certaine proportion d'individus. Cette portion est déterminée par les auteurs, selon le modèle : par exemple, une étude chez les coraux a défini le core microbiote comme la portion commune à 50% des individus (Brener-Raffalli *et al.*, 2018) alors que dans une autre chez les moustiques, n'était considéré comme appartenant au core microbiote que les taxa bactériens communs à plus de 90% des individus (Guégan *et al.*, 2018). Dans notre étude sur le microbiote bactérien de *B. glabrata*, nous avons considéré uniquement les taxa présents dans 100% des individus comme appartenant au core microbiote. Sur les 97 familles identifiées, 62 se retrouvaient dans tous les individus, formant ainsi le core microbiote. En plus de la caractérisation du microbiote bactérien des individus naïfs de la souche brésilienne de *B. glabrata*, la dynamique de ce microbiote au cours d'une primo-infestation parasitaire (par une souche sympatrique ou allopatrique), puis d'une seconde infestation, a également été analysée. L'ADN 16S a donc également été séquencé dans des individus échantillonnés à différents pas de temps le long de la cinétique d'infestation. Les résultats ont démontré une dysbiose (perturbation du microbiote) causée par la présence des parasites, sans discrimination de la souche infestante. De manière intéressante, nous avons observé une « résilience » du microbiote bactérien, 25 jours après la primo-infestation, à un état proche de celui à l'état naïf. Enfin, l'analyse du profil d'expression de trois types de protéines et peptides antimicrobiens a mis en évidence une augmentation de l'expression de biophamacines en corrélation avec la dysbiose provoquée par l'infestation parasitaire. Ces résultats ont été publiés dans un article disponible dans biorXiv (<http://dx.doi.org/10.1101/386623>) présenté ci-après (voir II. C. 1.).

Le travail principal que j'ai mené au cours de ma thèse s'est notamment appuyé sur les résultats obtenus lors de cette première étude. Cette fois, cependant, j'ai comparé la composition bactérienne de différentes souches et espèces de mollusques, hôtes intermédiaires de *Schistosoma*. J'ai choisi quatre souches de *Biomphalaria glabrata*, une

souche de *Biomphalaria pfeifferi*, une espèce phylogénétiquement proche de *B. glabrata*, une souche de *Planorbarius metidjensis*, un Planorbinae plus éloigné phylogénétiquement des deux précédentes, et une souche de *Bulinus truncatus*, un Planorbidae Bulinae très éloigné phylogénétiquement de toutes les autres. Les deux dernières sont également incompatibles à *S. mansoni* mais respectivement à *S. bovis* et *S. haematobium*. De la même manière que précédemment, l'ADN 16S a été séquencé par MiSeq Illumina puis analysé. Le microbiote des individus élevés en bacs séparés par souche a révélé une forte spécificité en fonction de l'hôte. En effet, une analyse d'indices de similarité a montré un regroupement des individus par espèce de mollusque, démontrant une composition spécifique. Par ailleurs, la comparaison du dendrogramme représentant la topologie des communautés bactériennes par individus avec l'arbre phylogénétique des hôtes suggère un patron de phyllosymbiose. Autrement dit, il nous a été possible de superposer la phylogénie des mollusques avec la composition de leur microbiote bactérien. Ces résultats nous ont permis de conclure que l'hôte a un fort impact sur la structuration des communautés microbiennes.

Afin, cette fois, d'analyser l'effet de l'environnement sur cette structuration, une expérience de jardin commun a été menée, dans laquelle les individus de toutes les souches précédentes ont été maintenus un mois dans un bac commun. L'analyse du microbiote bactérien de ces individus a confirmé une structuration fortement corrélée à l'hôte, suggérant que l'effet de ce dernier sur la composition des communautés bactériennes est plus fort que celui de l'environnement.

Ces différents résultats ont été rassemblés sous forme d'article qui a été accepté dans le journal *Frontiers in Microbiology* (voir II. C. 2.).

1. Caractérisation et dynamique du microbiote d'une souche de *B. glabrata*

Dysbiosis of the *Biomphalaria glabrata* vector snail microbiota following infection by *Schistosoma* parasites.

Anaïs Portet¹, Eve Toulza¹, Ana Lokmer², Camille Huot¹, David Duval¹, Richard Galinier¹ and Benjamin Gourbal^{1,§}

¹ Univ. Perpignan Via Domitia, Interactions Hôtes Pathogènes Environnements UMR 5244, CNRS, IFREMER, Univ. Montpellier, F-66860 Perpignan, France

² Department Coastal Ecology, Wadden Sea Station Sylt, Alfred Wegener Institute, Helmholtz Centre for Polar and Marine Research, List/Sylt, Germany.

AP: anaisportet@aol.fr, ET: eve.toulza@univ-perp.fr, AL: Ana.Lokmer@awi.de, CH: camillehuot86@gmail.com, DD: david.duval@univ-perp.fr, RG: richard.galinier@univ-perp.fr, BG: benjamin.gourbal@univ-perp.fr

[§] Corresponding author:

Benjamin GOURBAL

UMR5244 IHPE, Université de Perpignan

58 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan

benjamin.gourbal@univ-perp.fr

Abstract:

The importance of the microbiota in host-parasite interactions has taken a deeper interest recently. Microbiota has to be considered as a third partner playing a central role in these interactions. *Biomphalaria glabrata* is the vector snail of the trematode *Schistosoma mansoni*, the agent of human schistosomiasis causing hundreds of thousands of deaths every year. How snail microbiota is affected in such host-parasite interaction following infection remains unstudied. Here, we analyse for the first time how the snail bacterial microbiota is affected or modified by schistosoma infections. We used a massive 16s DNA sequencing approach (MiSeq) to characterize the *Biomphalaria* bacterial microbiota at the individual level in naïve and infected snails. Sympatric and allopatric strains of parasites were used following infections and re-infections to analyse the modification or dysbiosis of snail microbiota populations in different host-parasite co-evolutionary contexts. Concomitantly, using RNAseq data, we investigate the link between bacterial microbiota dysbiosis and snail anti-microbial immune response. These investigations would have a central role in the understanding of snail/schistosome interaction, and would have critical consequences in terms of snail control strategies for fighting schistosomiasis disease in the field.

Key words: microbiota; bacteria; *Biomphalaria* snail; *Schistosoma* infection; immune response; dysbiosis

Introduction:

Biomphalaria glabrata is a freshwater snail (Lophotrochozoan, Planorbidae), living in inter-tropical regions more precisely in Latin America. It is found in rivers, ponds, waterways or other freshwater impoundments. *B. glabrata* snails have important medical and epidemiological impacts due to their role as the main vector of *Schistosoma mansoni* (Lophotrochozoan, Platyhelminth, trematoda), the agent of intestinal schistosomiasis. Schistosomiasis is the second most widespread human parasitic disease after malaria affecting over 200 million people worldwide and causing 200 000 deaths annually (WHO 2010). The *Schistosoma* adult parasites mate in the human host venous system. Female worms produced eggs that came across endothelial mesenteric vessels and intestinal epithelium to reach faeces and finally the aquatic environment. Into fresh water, eggs hatched and released miracidia, the free-living snail-infective parasite stage. At this step of its life cycle the miracidium needs to infect the fresh water snail *B. glabrata*. Into snail tissues, intensive asexual multiplication occurs and leads to the continuous production of hundreds of generations of cercariae, the free-living human-infective parasite stage.

Nowadays, there is no effective vaccine and the treatment for schistosomiasis relies on a single chemotherapeutic treatment, the Praziquantel (Doenhoff, Hagan et al. 2009), against which resistances have been observed (Fallon and Doenhoff 1994). Molluscicides have been also used to impair *Schistosoma* transmission in the field. However, the dramatic effects of molluscicides on natural environments are prompting us to seek new ways to prevent and / or control such parasitic disease in the field (Tennesen, Théron et al. 2015). To meet this goal, we considered that a better understanding of the interaction between *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* and the abiotic or biotic factors affecting such interaction might constitute an interesting approach to find alternative control strategies.

In this context, we have conducted numerous studies on immunological interactions between the snail and the parasite (Mitta, Galinier et al. 2005, Bouchut, Roger et al. 2008, Moné, Ribou et al. 2011, Coustau, Gourbal et al. 2015, Galinier, Roger et al. 2017, Mitta, Gourbal et al. 2017). We have demonstrated that the nature of the snail immune response depends on the type of interactions and influenced by both the host and the parasite intrinsic capacities. In compatible or incompatible interactions, parasites developed normally in snail tissue or were encapsulated by hemocytes (the snail immune cells), respectively (Mone, Gourbal et al. 2010,

Mitta, Adema et al. 2012, Coustau, Gourbal et al. 2015) (Fig. 1). During a sympatric interaction, an immunosuppression is observed while an activation of the immune response is set up during an allopatric interaction (Portet, Pinaud et al. 2018). Following primo-infection and successive challenges, a shift from a cellular immune response toward a humoral immune response has been described (Pinaud, Portela et al. 2016) (fig. 1). Moreover, abiotic environmental factors can also modify the snail immune response and change the interaction issue. For example, an increase in temperature leads to a modification of the snail susceptibility towards the *S. mansoni* parasite (Ittiprasert and Knight 2012, Knight, Elhelu et al. 2015).

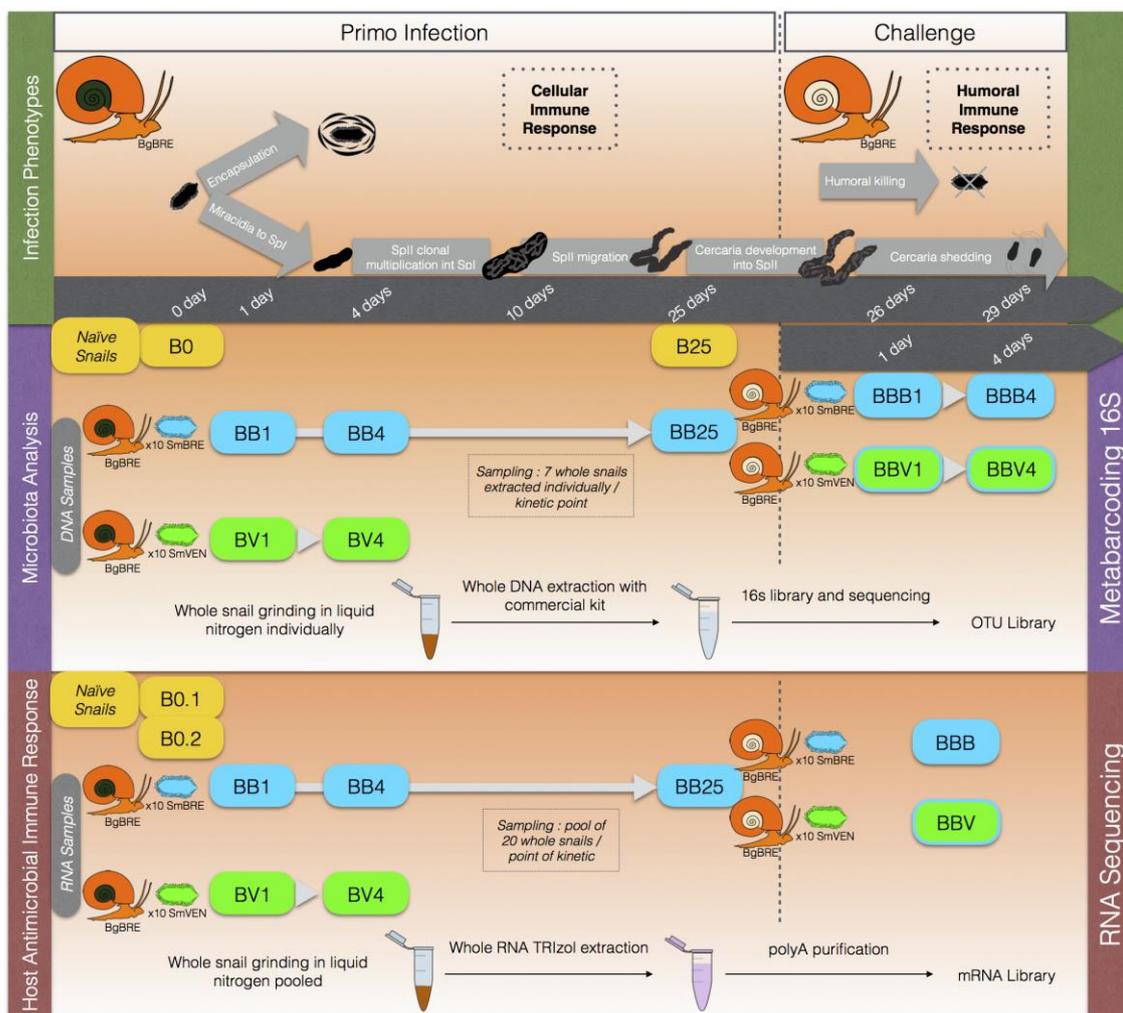


Fig. 1: Experimental protocol

Finally concerning biotic factors, several studies have shown that microbiota can influence the host / pathogen interaction and/or the host immunity and this within several respects.

The host microbiota can play a role in pre-conditioning immunity. Indeed, in *Aedes sp.*, the midgut microbiota elicits a basal immune activity of mosquito immunity (Ramirez, Souza-Neto et al. 2012), by activating mostly, the Toll pathways (Xi, Ramirez et al. 2008). In *Anopheles gambiae*, the microbiota is known to naturally limit malaria transmission, inducing a wide antimicrobial immune response (Gendrin 2017). Moreover, the bacteria *Enterobacter* which is part of the microbiota was shown to produce reactive oxygen species (ROS) against pathogens (Cirimotich, Dong et al. 2011). Again in *Anopheles sp.*, the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* leads to an induction of immune genes, like TEP1 (Thioester-containing protein 1), LRIM1 (Leucine-Rich Immune Molecule 1) or defensin 1 (Joshi, Pan et al. 2017). In drosophila, the bacterial microbiota is necessary to produce the Pvf2 factor, during stimulations (Sansone, Cohen et al. 2015). In the tick *Ixodes scapularis* the secreted protein, PIXR, inhibits the bacterial biofilm formation and protect the gut microbiota composition, its inactivation impairs the microbiota homeostasis and increases and facilitates the colonization by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent (Narasimhan, Schuijt et al. 2017). The microbiota may also play a role in host immune shaping. For example, in *Anopheles gambiae*, an unspecific priming based on hemocyte differentiation, naturally induced by the gut microbiota is observed when *Plasmodium* disrupts the barriers that normally prevent the gut microbiota from coming in direct contact with epithelial cells (Rodrigues, Brayner et al. 2010). Similarly, the gut microbiota is necessary for immune priming in *Tribolium castaneum* and efficient response against *Bacillus thuringiensis* *bv. tenebrionis* (Futo, Armitage et al. 2015). Finally, the host immunity can influence the tolerance or can control the microbiota. In drosophila for example, the intestinal homeobox gene Caudal regulates the commensal-gut mutualism by repressing nuclear factor kappa B-dependent antimicrobial peptide genes (Ryu, Kim et al. 2008). In Hydra, the innate immune sensors and effectors protect not only against pathogens but also control microbiota homeostasis (Augustin, Fraune et al. 2010). Moreover, host specific antimicrobial peptides (Fraune, Augustin et al. 2010, Franzenburg, Fraune et al. 2012) and a rich repertoire of pattern recognition receptors (Bosch 2013) are involved in maintaining homeostasis between animal and the resident beneficial microbiota. Recently, it was also demonstrated that a bactericidal permeability-increasing proteins (BPIs) of the squid *Euprymna scolopes* play different defensive roles to modulate interactions with the squid's symbiont, *Vibrio fischeri*, which colonizes light organ crypt epithelia (Chen, Krasity et al. 2017).

However, to our knowledge no studies have been carried out to analyse the tripartite interaction between the host, its microbiota and the parasite in *Biomphalaria glabrata* / *Schistosoma mansoni* interactions.

Until now few studies have been conducted on *Biomphalaria glabrata* snails to characterize their bacterial microbiota (Ducklow, Boyle et al. 1979, Silva, Melo et al. 2013). The aerobic heterotrophic cultivable flora of 200 snails has been investigated on Agar-Petri-dishes (Ducklow, Boyle et al. 1979). Five predominant bacteria genera including *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrios* and *Enterobacteria* have been identified. In a more recent study, the *Biomphalaria glabrata* bacterial microbiota has been characterized using 16S rRNA sequencing (Silva, Melo et al. 2013) but only on predominant taxa grown in culture. In addition to the 5 genera previously identified, 6 additional bacteria genera were found: *Citrobacter*, *Cupriavidus*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella* and *Sphingomonas*. In addition, resistant and susceptible phenotypes of *Biomphalaria* snails have been shown to influence diversity and composition of bacterial microbiota. The relative abundances of *Gemmatimonas aurantiaca* and *Micavibrio aeruginosavorus* seemed to be affected. This observation supports the hypothesis that resistance against *Schistosoma* parasite main influence snail microbial communities (Allan, Tennessen et al. 2018).

However, no studies have depicted changes in bacterial microbiota communities in *Biomphalaria* snails following *Schistosoma* infections. The aim of the present study was thus to investigate the inter-individual structure of microbiota in snail populations as well as investigating the influence of various immune stimulations on the host microbiota composition and dynamic following *Schistosoma* infections. To reach this goal, we realised a global characterization of the bacterial microbiota of naive *Biomphalaria glabrata* snails using 16S rDNA metabarcoding. Then, we analysed changes in microbiota composition following parasite infections with sympatric and allopatric *S. mansoni* isolates, or following primo-infection and challenge with homologous or heterologous parasite strains. A highly contrasted snail immune response occurs following such various snail/parasite interactions, thus we concomitantly analysed the snail immune response using a massive sequencing transcriptomic approach (RNAseq), to infer their consequences in terms of microbiota modifications.

Materials and Methods:

Ethical statements

Our laboratory holds permit # A66040 for experiments on animals, which was obtained from the French Ministry of Agriculture and Fisheries and the French Ministry of National Education, Research, and Technology. The housing, breeding, and care of the utilized animals followed the ethical requirements of our country. The experimenter possesses an official certificate for animal experimentation from both of the above-listed French ministries (Decree # 87–848, October 19, 1987). The various protocols used in this study have been approved by the French veterinary agency of the DRAAF Languedoc-Roussillon (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt), Montpellier, France (authorization # 007083).

Biological Materials

In this study, we used a single strain for the host snail, the albino Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* (BgBRE) and two strains for the trematode parasite *Schistosoma mansoni*: a Brazilian strain (SmbRE, for sympatric infection) and a Venezuelan strain (SmVEN, for allopatric infection). The Brazilian strains of snail and parasite originate from the locality of Recife; the Venezuelan parasite strain was recovered from the locality of Guacara. All host and parasite strains were maintained in the laboratory on their sympatric snail hosts. The snails were reared in constant temperature at 26°C and fed only with washed salad every 3 days. During experiments, snails were not fed 24 hours before the DNA extraction for metabarcoding analysis.

Experimental Infections (fig. 1)

In order to decipher the inter-individual structure of snail microbiota as well as investigate the influence of different snail immune stimulations on its microbiota structure and dynamics we conducted a complex experimental infection protocol (Fig. 1); using naive snail BgBRE and infected snail BgBRE by SmbRE or SmVEN parasites.

Briefly, snails were primo-infected with two parasite strains and either they are individually recovered at 1, 4 and 25 days after infection or challenged with similar parasite strains and individually recovered at 1, 4 days after challenge (Fig. 1). For all experimental infections, the snails were individually exposed for 12h to 10 miracidia in 5mL of pond water, thereafter snails

were turned back to water tanks and separated accordingly to the parasite strain and infection conditions.

- Microbiota analysis

We performed a primo-infection of 63 BgBRE snails with either SmbRE (sympatric, 49 snails) or SmVEN (allopatric, 14 snails) strains. Then, 25 days after the primo-infection, we re-infected a subset (28 snails) of SmbRE-infected snails with either SmbRE (14 snails) or SmVEN (14 snails).

To examine the effect of primo-infection on the snail microbiota, we took 7 whole-snails for each infection samples on days 1 (groups BB1 and BV1; the second letter refers to the Sm strain origin used for prim-infection), 4 (BB4 and BV4), and 25 (BB25, no SmVEN-infected snails were sampled on day 25) after the infection. Similarly, we sampled 7 whole-snails on day 1 (BBB1 and BBV1; the third letter refers to the Sm strain origin used for challenge) and day 4 (BBB4 and BBV4) after the challenge. In addition, we used 6 naive snails collected at the beginning of the experiment (B0) and 6 naive snails collected at the time of challenge (i.e. day 25, B25) as controls to establish if the bacterial communities of naive BgBRE snails were stable in our breeding and rearing laboratory conditions.

- Host antimicrobial immune response

We performed a primo-infection of 180 BgBRE snails with either SmbRE (sympatric, 140 snails) or SmVEN (allopatric, 40 snails). Then, 25 days after infection, we re-infected a subset (80 snails) of SmbRE-infected snails with either SmbRE (40 snails) (homologous challenge) or SmVEN (40 snails) (heterologous challenge).

To study the primo-infection transcriptomic immune response of the snail, we took 20 snails pooled for each infection samples on days 1 (BB1 and BV1), 4 (BB4 and BV4), 25 (BB25). After the challenge, we sampled 20 snails in each condition (1 and 4 days), equimolar amounts for each experimental groups were joined together into a single sample (BBB and BBV). In addition, we used 2 pools of 30 naive snails (B0.1 and B0.2) to establish the basal snail transcriptomic activity.

DNA Extraction

Immediately after sampling, shell snails were cleaned with alcohol and the hemolymph was

extracted from the head-foot according to standard procedures (Sminia and Barendsen 1980) and individually recovered in Eppendorf tube. Shell snails were removed and total snails were individually with its hemolymph frozen in liquid nitrogen and ground. The total DNA was extracted with DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The DNA quantification was performed by Qubit 2.0 Fluorometer, using dsRNA BR Assay kit. Individual 16S rDNA amplicon libraries were generated using the 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) and 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) primers targeting the variable V3-V4 loops (Klindworth et al., 2012). Paired-end sequencing with 250 bp read length was performed on the Illumina MiSeq sequencing system (GenomeQuébec, Montréal, Québec, Canada) using the v2 chemistry according to the manufacturer's protocol.

RNA Extraction

Immediately after sampling, snail shells were cleaned with alcohol and removed, then snails are pooled by infection conditions. Total RNA was extracted using TRIZOL (Sigma Life Science, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed in paired-end 72-bp read lengths, using an Illumina Genome Analyzer II (MGX-Montpellier GenomiX, Montpellier, France).

Microbiota Analysis

- Data analysis of 16S sequences

The FROGS pipeline (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implemented on a galaxy instance (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) was used for data processing (Escudié, Auer et al. 2017) Briefly, paired reads were merged using FLASH (Magoč & Salzberg, 2011). After denoising and primer/adapters removal with cutadapt (Martin, 2011), de novo clustering was done using SWARM, which uses a local clustering threshold, with aggregation distance $d=3$ after denoising. Chimeras were removed using VSEARCH (Rognes, Flouri, Nichols, Quince, & Mahé, 2016). We filtered out the singletons and performed taxonomic assignment using Blast+ against the Silva database (release 128, sept 2016).

All statistical analyses were done using R v3.3.1 (R: a language and environment for statistical computing, 2008; R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria [<http://www.R-project.org>]). We used the phyloseq R package for community composition analysis (McMurdie & Holmes, 2013) to infer alpha diversity metrics

as well as beta diversity (between sample distance) from the identified OTUs. Community similarity was assessed by Principal Coordinate Analysis (PCoA) using the Bray-Curtis distance matrices.

We performed a Mann Withney U test ($p < 0.05$) to compare alpha diversity and one-way PERMANOVA with a Benjamini & Hochberg post-hoc to compare beta diversity metrics between groups of samples. For all analyses, the threshold significance level was set at 0.05.

- Analysis of core-microbiota

We defined the core-microbiota as the set of bacterial groups that were present in all naive snails. To determine which families belong to core-microbiota, we made a pivot table from the OTUs and the taxa ones, and we conserved only OTU families that were present in 100% of the naive individuals excluding unknown or multi-affiliations at lower taxonomic ranks (Table S1). Once the OTUs selected we recovered the abundance of each of these families to establish the composition of the core-microbiota.

To check if the core-microbiota is affected by infection, we compared the abundance of core families between infected snails and naive conditions with a one-way PERMANOVA with a Benjamini & Hochberg post-hoc. Conditions with significant differences ($p < 0.05$) were noted. Moreover, a frequency test was realised to determine which specific families were affected during infection. Families with significant differences ($p < 0.05$) were noted. The number of significantly differentially represented families at each sampling day (1, 4 and 25 days after primo infections and 1, 4 days after challenges) was calculated to examine the temporal variability during the course of infection.

Transcriptome analysis of antimicrobial immune response

- Antimicrobial response transcriptome

An antimicrobial transcriptome was constituted with transcripts known to be involved in *Biomphalaria* immune response against bacteria (antimicrobial peptides: Biomphamacin or antimicrobial proteins: LBP/BPI and Achacin; see Table S2 for details). These transcripts were recovered from GenBank and the *Biomphalaria* genome (Adema, Hillier et al. 2017) as full-length sequences. This antimicrobial transcriptome was then added with concatenate datasets tools on a Galaxy server with the *Biomphalaria* transcriptome de novo assembled in the laboratory (see (Dheilly, Duval et al. 2015, Pinaud, Portela et al. 2016, Galinier, Roger et

al. 2017) for details). Before concatenation a Blastn (70 % identity and 90% coverage) was conducted to identify the similar transcripts between both transcriptomes, and then discarded from the *de-novo* assembled transcriptome to avoid any mapping error and bias for read counts using Bowtie2.

- Differential expression analysis

High-quality reads (Phred score >29) were aligned to the concatenated transcriptome using Bowtie2 (v.2.0.2), which was run locally on a Galaxy server. The DESeq2 (v2.12) R package was used to identify differential expression levels between uninfected (B0.1 and B0.2) and infected conditions (p value < 0.05).

Results:

Biomphalaria microbiota characterization

To examine the stability of naïve snail microbiota, we first inspected the microbiota diversity and composition in the control naïve snails. We found no significant differences between the B0 and B25 snails in any of the alpha diversity indices (Table S3). At the phylum level, individual naïve snails at B0 and B25 time points show little inter-individual variability and a stable composition over time (fig. 2A), with Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria and Planctomycetes phyla being the most represented (Fig 2A). Therefore, the bacterial microbiota of naïve BgBRE snails seems to have a considerable temporal and inter-individual stability in our laboratory rearing conditions (fig. 2B).

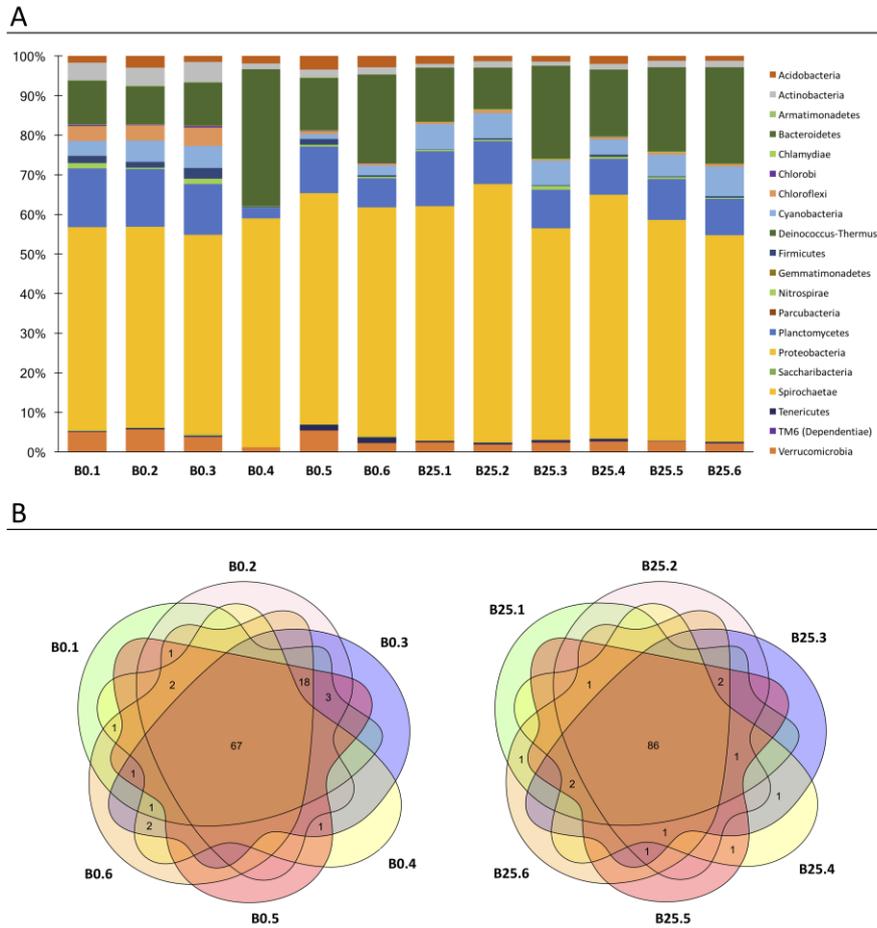


Fig. 2: *Biomphalaria glabrata* microbiota characterization: Characterisation of the *Biomphalaria* bacterial microbiota of six naive snails recovered at the start of experimentation (B0.1; B0.2; B0.3; B0.4; B0.5 and B0.6) and 6 naive snails recovered 25 days after the start of experimentation (B25.1; B25.2; B25.3; B25.4; B25.5 and B25.6). A. Phylum level composition of the 20 most abundant OTUs phyla among the 12 naive snails. B. The Venn diagram represents the number of the 97 OTUs families which shared between the 6 naive snails at B0 (left Venn diagram), and between the 6 naive snails at B25 (right Venn diagram).

In terms of composition, we observed that 67 (69%) and 86 (89%) out of 97 OTU families were shared by B0 and B25 naive snails respectively (fig. 2B). Those results were used to determine the core microbiota. Core microbiota is defined as the most abundant OTU families that were present in 100% of the naive snails. In this respect, 62 out of 97 OTU families were identified in all naive individual snails, constituting the *B. glabrata* core-microbiota (S7 and S8 Table). This core microbiota represents 92.5% and 69.6% of the OTU families of B0 and B25 respectively.

Microbiota dynamics following *Biomphalaria* infections by *S. mansoni*

After establishing the stability of naive *Biomphalaria* bacterial microbiota, we next investigated whether *Schistosoma mansoni* infections affected the microbiota composition, structure and dynamic.

To investigate the influence of parasite infections on the bacterial microbiota communities, we then analysed microbiota dynamic following sympatric or allopatric primo-infections and homologous or heterologous challenges (fig. 1).

We did not observe any significant changes in alpha diversity during the course of primo-infection compared to naive snails, excepted a decrease of the Shannon diversity index at four days after sympatric infection (Fig. 3, Table S3, Mann-Whitney U test: Table S4). Conversely, all indices changed significantly following homologous or heterologous challenges (Fig. 3, Table S3, Table S4). Indeed, the observed species richness (Mann-Whitney U test, $p=0.002$), the Chao 1 richness index (Mann-Whitney U test, $p=0.006$), Shannon diversity index ($p=0.0004$) and Piélou evenness index (Mann-Whitney U test, $p=0.009$) were significantly reduced following such immune challenges compared to naive and primo-infected snails (Fig. 3, Table S3, Table S4). However, 4 days after heterologous challenge changes in the microbiota alpha diversity appeared not significant (Fig.3). This observation may indicate that microbiota richness and diversity tends to turns similar to naive snails few days after infection (Fig. 3, Table S4). The alpha diversity seemed to be mainly affected by the challenge whichever homologous or heterologous. Primo-infection did not affect significantly the microbiota alpha diversity except for the sympatric parasite 4 days after infection. To conclude, homologous SmBRE and heterologous SmVEN challenge infections resulted in greater changes in microbiota alpha diversity compared to all the other experimental infections tested.

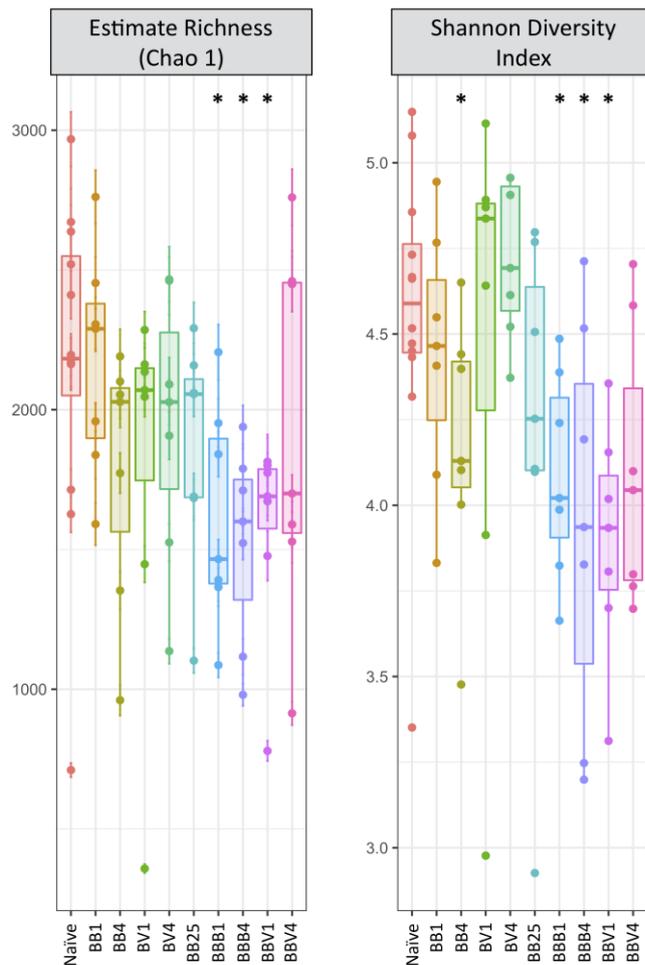
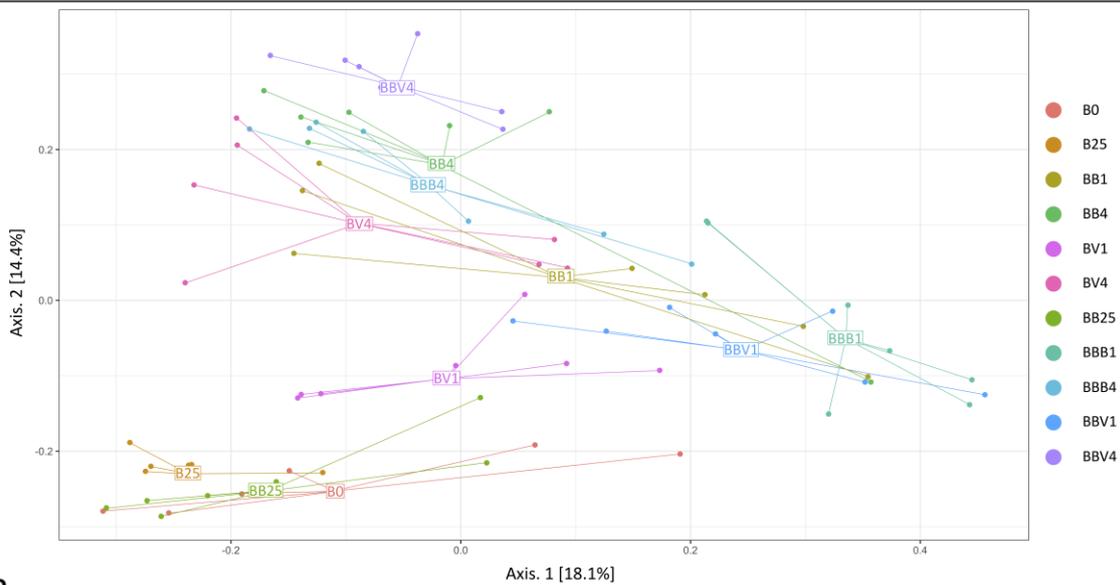


Fig. 3: Microbiota alpha Diversity: Boxplots of Chao1 and Shannon indices for all samples. For the Naive condition, B0 and B25 snails were pooled; BB: primo infection of BgBRE by SmBRE; BV: primo infection of BgBRE by SmVEN; BBB: primo infection of BgBRE by SmBRE and challenge by SmBRE; BBV: primo infection of BgBRE by SmBRE and challenge by SmVEN. The time point is mentioned with 1, 4 or 25 corresponding to the day after primo-infection or challenge. The differences between naive and infected conditions were tested with a Mann-Whitney U test and significant differences mentioned with “*”.

As stated above for alpha diversity, Principal Coordinate Analysis (PCoA) of beta diversity on Bray-Curtis dissimilarity between samples revealed that BB25 samples groups with the naive snail samples (B0 and B25) separately from the other infected-snail samples (Fig. 4A, S5 Table). All the infection conditions tested were separated along the first or the second axis from the naive and BB25 snails (Fig.4A). Although the BB25 sample was still significantly different from the naive snail samples, it suggests that the snail microbiota is resilient to infection, with a tendency to recover between day 4 and day 25 after the primo-infection turning similar but not identical to naive snails (Fig. 4A). Analysis of Bray-Curtis dissimilarity index revealed a significant difference between naive and primo-infected samples ($p=0.001$) and also between naive and challenged samples ($p=0.001$) (S5 Table). Concerning infection samples, all the Bray-

Curtis dissimilarity index values were significantly different from each other except, BB1 versus BB4 and BBB1 versus BBV1 (S5 Table).

A



B

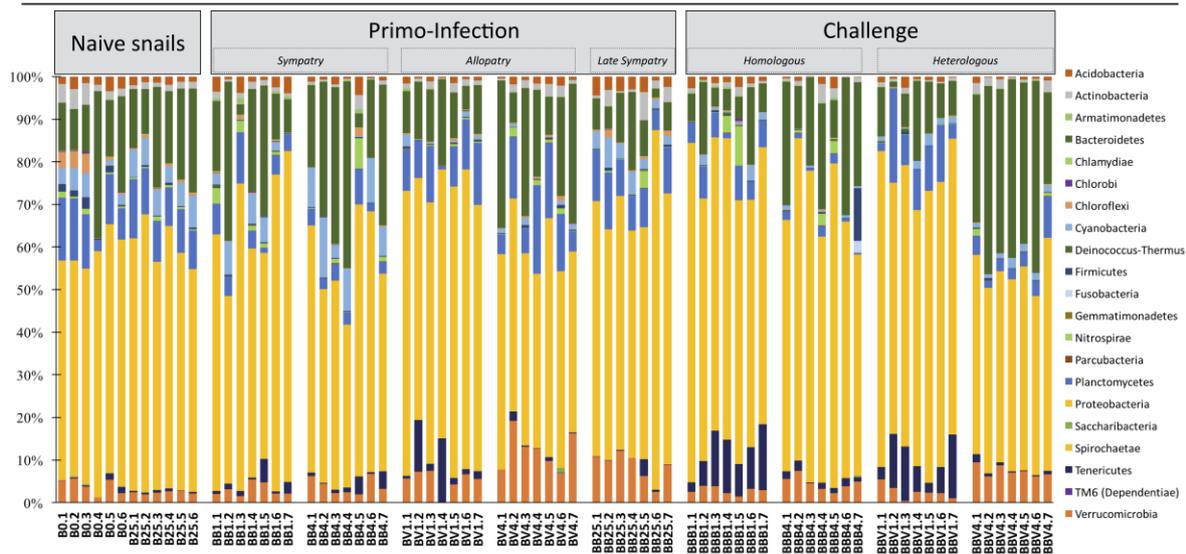


Fig. 4: Beta diversity and bacterial communities following *Biomphalaria* infection: Dynamics of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* following *Schistosoma* primo-infection and challenge. A. Functional diversity comparisons of *Biomphalaria* microbiota along infection. Principal coordinate analysis of pairwise Bray-Curtis distances between all infection type and time samples. Axes represent the two synthetic variables explaining the greatest proportion of variation in the data set. The sample name indicated in the figure corresponds to the centroid of all the biological replicates points of the respective experimental sample. B. Phylum level composition of the 20 most abundant OTUs among all points of the kinetic. In this representation, the replicate naive snails were pooled for more readability.

Moreover, the samples from day 1 and day 4 after infection were separated along the first axis (Fig. 4A). This axis separated also day 1 after primo infection samples (BB1, BV1) from day 1 after challenge samples (BBB1, BBV1) and from day 4 infection samples (BB4, BV4, BBB4, BBV4) (Fig. 4A). These results indicate that the snail microbiota response to the infection depend on the type of infection sympatric or allopatric primo-infection or challenge or to the kinetic of infection (day 1 vs day 4). Interestingly greater changes in microbiota communities is observed at day1 after infection, the first axis separate the primo-infection (BB1, BV1) from the challenge (BBB1, BBV1) and the second axis separate the sympatric primo-infection (BB1) from the allopatric primo-infection (BV1) (Fig. 4A). At day 4 after infection the samples tend to group in the upper left corner of the PCoA demonstrating similarity between these samples whichever the experimental infection conditions (Fig. 4A).

Moreover, we investigate the OTUs phyla dynamic following infections, some phyla increase and other decrease consistently following the experimental infections tested (Fig. 4B). The Tenericutes increase after infection and more specifically at day 1 after challenges. The Verrucomicrobia increase following allopatric primo-infection and homologous / heterologous challenges principally at day 4 after infection (Fig. 4B). Interestingly the Verrucomicrobia remained highly represented in BB25 snail sample, appearing as the main difference compared to naive snail microbiota community composition (Fig. 4B). The Planctomycetes decrease after sympatric primo-infection while the Cyanobacteria decrease after allopatric primo-infection. Interestingly both phyla decrease similarly after homologous and heterologous challenges (Fig. 4B).

To conclude, at day 1 after infection we observe the strongest microbiota community dysbiosis. Some bacterial communities increase following sympatric primo-infection and others increase following allopatric primo-infection. Interestingly, dysbiosis observed following challenges looks very similar whichever homologous or heterologous (i.e., no significant differences between BBB1 and BBV1 were observed) (S5 Table).

Finally, we then focused on the core microbiota dynamics during infections. Similarly, to the entire microbiota, the core-microbiota composed of 62 families was affected by the type of infection (naive vs primo-infection ($p=0.003$) and naive vs challenge ($p=0.003$)), by the time of infection (early vs late) ($p=0.006$) and also by the strain of parasite used for infection (SmBRE vs SmVEN) ($p=0.016$) (S6 Table). Principal Coordinate Analysis (PCoA) of beta diversity on Bray-

Curtis dissimilarity has been done for the core microbiota families (Fig. S1) and it is quite superimposable to the PCoA of the entire microbiota beta diversity (Fig. 4A).

In addition, we observed that the 69.4% (43 families) of the core microbiota was significantly affected by infections, among them 6.5% (4 families) were affected in all conditions compared to control (S7 Table) and interestingly grouped into the main represented families (S8 Table). Nineteen families (30.6%) were never affected by the infection (S7 Table). Those families belong to the less represented ones excepts the *Xanthomonadaceae* that are one of the most represented families (7th more represented family, see S8 Table). Further 32.6% (14 families) of the core-microbiota responded solely to the primo-infection and 4.7% (2 families) to the challenge (S7 Table). In the same way 20.9% (9 families) of the core-microbiota was affected early after infection (1 day) and 7% later (3 families) (4 days). Finally, 23.3% (10 families) are affected by the SmBRE infection and 9.3% (4 families) by the SmVEN infection (S7 Table).

Link between the microbiota dysbiosis and *Biomphalaria* snail's antimicrobial immune response.

Using RNAseq data the expression of the antimicrobial peptides and antimicrobial proteins have been investigated following sympatric or allopatric primo-infection and homologous or heterologous challenges (Fig. 5 and Fig. S2). Two genes of achacin, 5 genes of Lipopolysaccharide-binding protein / Bactericidal Permeability-Increasing protein (LBP/PBI), and 5 genes of biomphamacins have been selected based on the *Biomphalaria glabrata* genome annotation (Adema, Hillier et al. 2017). The LBP/BPI 3.1 and 3.2 were over-expressed at 25 days after infection and following the challenges compared to naive snails, while all other genes were under-expressed in all conditions (Fig. S2). The achacins were under-expressed following sympatric primo-infection, at day 25 after primo-infection and following challenges (Fig. S2). No changes in expression were observed following allopatric primo-infection compared to naive snails (Fig. S2). Finally, the AMP biomphamacins 1, 4, 5 and 6 were over-expressed throughout infections except for BV1 and BB25 (Fig.6). The biomphamacin 3 was mainly under-expressed except at BV4 and BBB where no differential expressions have been detected compared to naive snails (Fig. 5).

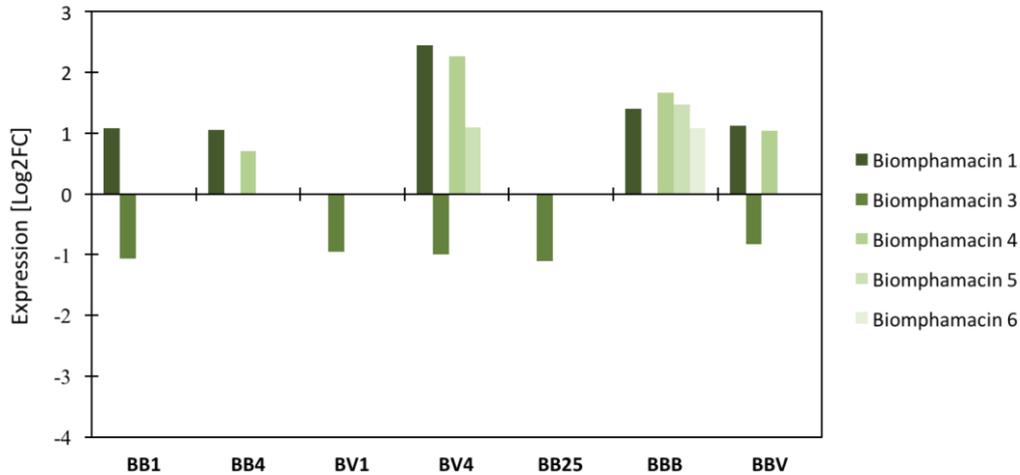


Fig. 5: Differential gene expression of Biomphamacin antimicrobial peptides: Log₂FC (fold change) of antimicrobial immune transcripts between naive and infected snails inferred from previous RNAseq analysis on the same experiment. A positive Log₂ fold-change indicates over-expression in infected snails compared to the naive snails. Antimicrobial peptide families included 6 Biomphamacins (macin-like AMPs) consisting of 6 genes (shade of green).

Based on our observations of microbiota dysbiosis, changes in expression of antimicrobial molecules were expected to occur following primo-infections and challenges and not for BB25, where resilience of microbiota communities has been described. In this context, the LBP/BPI and achacin seemed not to be correlated with dysbiosis; while both remained highly down regulated even at BB25 (Fig. S2). All biomphamacins, except the biomphamacin 3, were over-expressed after infection, from day 1 in BB infection and day 4 in BV infection and for homologous or heterologous challenges (BBB and BBV). Moreover, Biomphamacins 1, 4, 5, 6 were not differentially expressed at BB25 (Fig. 5) and thus correlate thinly with dysbiosis.

Discussion:

An intimate interaction between the microbiota, the host immunity and pathogens has been revealed in many vertebrate and invertebrate models. Following an infection by a pathogen, the host displays a specific or adapted immune response against the intruder. This activation of the immune response may affect the microbiota community structure. Two hypotheses have been proposed to explain this intricate dialogue between the host and its microbiota

through the host immune system. The first hypothesis proposed that the host immune system ensures constant pressure on the microbiota and thus constrains its composition permanently (Hooper, Littman et al. 2012). Indeed, the resident bacterial microbiota may profoundly shape the host immunity and conversely the host immune system may play a role to maintain the homeostasis between resident microbial communities (Hooper, Littman et al. 2012). Adaptive immunity have been also demonstrated to regulate gut microbiota composition and diversity (Zhang, Sparks et al. 2015). In this context, any changes in host immune response toward potential infections would resulted in immune constrains on microbiota communities and thus in changes in microbiota diversity and composition. The second hypothesis is linked to the antigenic discontinuity theory, and proposed that the immune system reacts to a strong variation of antigens detected, for example following an infection, but would be tolerant for weak and continuous antigenic immune stimulations experienced during a lifespan (Pradeu and Eric 2014). In this context, one would expect that no host immune response toward installed and/or stable bacterial microbiota communities would be observed. Thus, the activation of the immune response against intruders would potentially not results in drastic changes in microbiota communities. However, ost of these theories were proposed based on work conducted on vertebrate models and especially mammals. To fill this gap, we thus investigated herein the interaction between the host, the bacterial microbiota and the immune system in an invertebrate model. We chose the model involving the gastropod snail *Biomphalaria glabrata* and its trematode parasite *Schistosoma mansoni*. Depending on the past evolutionary history between snails and schistosomes, different immune responses against *S. mansoni* have been observed. We showed recently that in a sympatric interaction, the parasite was adapted to its host and induced a strong immunosuppression, whereas in an allopatric interaction the host cellular immune response is potently activated (Portet, Pinaud et al. 2018). Moreover, in innate immune memory, a cellular immune response was observed following primo-infection, but a humoral immune response was observed following challenges (Pinaud, Portela et al. 2016). Thus using *S. mansoni* infections, we were able in the present study to induce different immune stresses, i.e., immunosuppression with sympatric parasite strain, immune cellular response activation with allopatric parasite strain, and a humoral immune response activation following challenges with homologous or heterologous parasite strains. Following such various immune stimulations, we then analysed the microbiota bacterial community composition and diversity.

We studied non-cultivable bacterial microbiota using a 16S rDNA metabarcoding approach on whole snail extracts. The first step of this analysis was to characterize the microbiota community structure in naive *Biomphalaria glabrata* snails. The bacterial microbiota of BgBRE has a temporal and inter-individual stability (Fig. 2), that was useful to identify and characterize the core microbiota shared by all naive individual *Biomphalaria glabrata* snails and analyse changes in core microbiota composition following infections (S7 and S8 Table).

First, studying the global bacterial microbiota community of *Biomphalaria* snails, we showed that the bacterial alpha diversity was not modified following primo-infection whatever the parasite strains or the time point of infection (Fig. 3, S3 Table). Decrease of the alpha diversity is observed exclusively following challenge infection, highlighted by a decrease in diversity and specie richness (Fig. 3, S3 Table). Concerning the beta-diversity, primo-infection and challenge strongly affected the bacterial OTU composition (Fig. 4). Totally different immunobiological interactions between the snail *Biomphalaria glabarata* and its parasite *Schistosoma mansoni* resulted in totally different microbiota dysbiosis (Fig. 4). One day after infection, the activation of a cellular immune response in allopatric interaction, the immunosuppression occurring in sympatric interaction (Portet et al 2018 BioRxiv) or the humoral immune response activated following homologous or heterologous challenges (Pinaud, Portela et al. 2016) affected the bacterial community in a totally different manner. Interestingly, homologous and heterologous challenges that both activated a similar humoral immune response resulted in an identical change of microbiota alpha and beta diversity (Fig. 3, S3 Table, Fig. 4). Then, four days after infections, regardless of experimental conditions, the microbiota dysbiosis remained strong compared to naïve snails, but changes in bacterial community composition appeared more similar, as BB4, BV4, BBB4 and BBV4 are grouped in the PCoA (see Fig. 4). This observation suggested a resilience of the bacterial communities following a first stress of infection (Fig. 4). This observation seems to be confirmed by the results obtained following primo-infection, as most of the OTUs affected following primo-infection, turned similar to naive snails at day 25 after infection (Fig. 4). However, the Verrucomicrobia phylum remained highly represented in infected snail microbiota at day 25 after primo-infection (Fig. 4B). Interestingly, some microbiota species belonging to Verrucomicrobia have been recently proposed as a hallmark of healthy gut due to its anti-inflammatory and immunostimulant

properties and its ability to improve gut barrier function (Fujio-Vejar, Vasquez et al. 2017). Verrucomicrobia would thus potentially participate in microbiota community restoration and would thus being maintained highly represented in infected snail microbiota community. Moreover, similar expansion of Verrucomicrobia phylum has been demonstrated in the gut microbiota of *S. mansoni*-infected mice, arguing for an overall central functional role of Verrucomicrobia in *Schistosoma* infection processes in their definitive as well as in their intermediate hosts (Jenkins, Peachey et al. 2018).

Given that infections affect the microbiota structure, we explored the antimicrobial immune response following infection to find potential explanations of the observed microbiota dysbiosis (Fig. 5 and Fig. S2). We analysed more specifically antimicrobial peptides (AMP) and antimicrobial proteins and we demonstrated that exclusively the AMP belonging to biomphamacin family may potentially affects the microbiota communities. Indeed, our results suggest that even if antimicrobial families can be involved in complex process of regulation or of control of microbiota communities, solely the biomphamacins AMP family members displayed a specific pattern of regulation that can be correlated with the observed dysbiosis of *Biomphalaria* bacterial communities (Fig. 5). It has been yet shown in some models that the immune system is a key determinant of host-associated bacterial communities, and more precisely that species-specific antimicrobial peptides can shape species-specific bacterial associations in *Hydra* (Franzenburg, Walter et al. 2013). Other immune pathways have been also demonstrated to regulate or control the microbiota communities, like the intestinal homeo-box gene Caudal in *Drosophila* (Ryu, Kim et al. 2008), or neuropeptides with antibacterial activity which are secreted to shape the microbiome on the body surface of *Hydra* (Augustin, Schröder et al. 2017), even host lectins were also demonstrated to stabilize microbiota communities (Dinh, Farinholt et al. 2018).

Thus, if a biotic stress (i.e. an infection) modifies the expression of the antimicrobial peptides or other immune related pathways, an effect on the microbiota communities can be expected. Our first results seem to indicate that we have in *B. glabrata* a regulation of the bacterial communities by the immune system. Based on the hypothesis proposed by Hooper and collaborators (Hooper and Macpherson 2010, Hooper, Littman et al. 2012) the immune system maintain permanently the endosymbiotic microbial communities in a physiological threshold compatible with their functional role as symbionts. Thus following an infection, the

immune system is diverted from its function of managing the microbiota and consequently the bacterial communities were deeply affected in their composition and diversity. When the immune response stopped and returned to a basal level the microbiota is again under-control and resilience can be observed (Hooper and Macpherson 2010, Hooper, Littman et al. 2012). This is exactly what we observed in the present study, indeed between 4 and 25 days after the primo-infection the microbiota composition turns similar to the microbiota of uninfected control snails (Fig. 4). In this context, the microbiota dysbiosis would be a consequence of the infection and of the activation of the immune system against an intruder or a modification of the host physiological status.

In this context, we paid also a particular attention to the core-microbiota. Given the various ways to define core microbiota, we considered exclusively the persistent occurrence of the bacterial community in naive *Biomphalaria glabrata* snails (Astudillo-García, Bell James et al. 2017). Similarly, to the entire microbiota, the core-microbiota was affected by the type of infection (naive vs challenge), by the time of infection (1-day vs 4-days) and also by the strain of parasite used for infection (SmBRE vs SmVEN) (S6 Table). Beta diversity on Bray-Curtis dissimilarity is also affected and this similar to the entire microbiota beta diversity (Fig. S1 and Fig. 4A). Thus immunosuppression or the activation of the immune response seemed also to affect greatly the core microbiota. Core microbiota is known to have functional relevance. Indeed, the long-term stability and persistent occurrence of beneficial microbes and their associated functions ensure host health and well-being to maintain host functionality and fitness toward changing ecological environment or environmental stress (Nyholm and McFall-Ngai 2004, Lozupone, Stombaugh et al. 2012, McFall-Ngai, Hadfield et al. 2013). On the one hand, one can propose that following infection, the immune system was no longer able to maintain the core microbiota homeostasis that results in changes in microbiota composition and structure. On the other hand, microbiota dysbiosis would have consequently strong effects on the host homeostasis.

These changes in microbiota composition appeared as predictive or consecutive to the infection? Changes in microbiota composition is the results of the activation of specific bacterial communities that may participate in anti-pathogen response or just a collateral effect of the activation of the immune response against metazoan parasite infection. This

question will deserve further investigation. We can propose for example to test *S. mansoni* prevalence and intensity in experimental infections of *Biomphalaria glabrata* snails following antibiotic treatments or microbiota transfers. In this specific interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*, the agent of Schistosomiasis disease, it would be now essential to determine if microbiota bacterial communities may have an impact on the parasite transmission. This consideration would be of central importance in terms of disease transmission and in finding new ways to control the expansion of this widespread human parasitic disease in the field.

Reference:

- Adema, C. M., L. W. Hillier, C. S. Jones, E. S. Loker, M. Knight, P. Minx, G. Oliveira, N. Raghavan, A. Shedlock, L. R. do Amaral, H. D. Arican-Goktas, J. G. Assis, E. H. Baba, O. L. Baron, C. J. Bayne, U. Bickham-Wright, K. K. Biggar, M. Blouin, B. C. Bonning, C. Botka, J. M. Bridger, K. M. Buckley, S. K. Buddenborg, R. Lima Caldeira, J. Carleton, O. S. Carvalho, M. G. Castillo, I. W. Chalmers, M. Christensens, S. Clifton, C. Cosseau, C. Coustau, R. M. Cripps, Y. Cuesta-Astroz, S. F. Cummins, L. di Stephano, N. Dinguirard, D. Duval, S. Emrich, C. Feschotte, R. Feyereisen, P. FitzGerald, C. Fronick, L. Fulton, R. Galinier, S. G. Gava, M. Geusz, K. K. Geyer, G. I. Giraldo-Calderón, M. de Souza Gomes, M. A. Gordy, B. Gourbal, C. Grunau, P. C. Hanington, K. F. Hoffmann, D. Hughes, J. Humphries, D. J. Jackson, L. K. Jannotti-Passos, W. de Jesus Jeremias, S. Jobling, B. Kamel, A. Kapusta, S. Kaur, J. M. Koene, A. B. Kohn, D. Lawson, S. P. Lawton, D. Liang, Y. Limpanont, S. Liu, A. E. Lockyer, T. L. Lovato, F. Ludolf, V. Magrini, D. P. McManus, M. Medina, M. Misra, G. Mitta, G. M. Mkoji, M. J. Montague, C. Montelongo, L. L. Moroz, M. C. Munoz-Torres, U. Niazi, L. R. Noble, F. S. Oliveira, F. S. Pais, A. T. Papenfuss, R. Peace, J. J. Pena, E. A. Pila, T. Quelais, B. J. Raney, J. P. Rast, D. Rollinson, I. C. Rosse, B. Rotgans, E. J. Routledge, K. M. Ryan, L. L. S. Scholte, K. B. Storey, M. Swain, J. A. Tennesen, C. Tomlinson, D. L. Trujillo, E. V. Volpi, A. J. Walker, T. Wang, I. Wannaporn, W. C. Warren, X.-J. Wu, T. P. Yoshino, M. Yusuf, S.-M. Zhang, M. Zhao and R. K. Wilson (2017). "Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail." *Nature communications* 8: 15451.
- Allan, E. R. O., J. A. Tennesen, T. J. Sharpton and M. S. Blouin (2018). "Allelic Variation in a Single Genomic Region Alters the Microbiome of the Snail *Biomphalaria glabrata*." *J Hered* 109(5): 604-609.
- Astudillo-García, C., J. Bell James, S. Webster Nicole, B. Glasl, J. Jompa, M. Montoya Jose and W. Taylor Michael (2017). "Evaluating the core microbiota in complex communities: A systematic investigation." *Environmental Microbiology* 19(4): 1450-1462.

- Augustin, R., S. Fraune and T. C. G. Bosch (2010). "How Hydra senses and destroys microbes." *Seminars in Immunology* 22(1): 54-58.
- Augustin, R., K. Schröder, A. P. Murillo Rincón, S. Fraune, F. Anton-Erxleben, E.-M. Herbst, J. Wittlieb, M. Schwentner, J. Grötzinger, T. M. Wassenaar and T. C. G. Bosch (2017). "A secreted antibacterial neuropeptide shapes the microbiome of Hydra." *Nature communications* 8: 698.
- Bosch, T. C. (2013). "Cnidarian-microbe interactions and the origin of innate immunity in metazoans." *Annu Rev Microbiol* 67: 499-518.
- Bouchut, A., E. Roger, B. Gourbal, C. Grunau, C. Coustau and G. Mitta (2008). "The compatibility polymorphism in invertebrate host/trematode interactions : research of molecular determinants." *Parasite*(August): 304-309.
- Chen, F., B. C. Krasity, S. M. Peyer, S. Koehler, E. G. Ruby, X. Zhang and M. J. McFall-Ngai (2017). "Bactericidal Permeability-Increasing Proteins Shape Host-Microbe Interactions." *mBio* 8(2): e00040-00017.
- Cirimotich, C. M., Y. Dong, A. M. Clayton, S. L. Sandiford, J. A. Souza-Neto, M. Mulenga and G. Dimopoulos (2011). "Natural microbe - mediated refractoriness to Plasmodium infection in *Anopheles gambiae*." *Science* 332: 855-858.
- Coustau, C., B. Gourbal, D. Duval, T. P. Yoshino, C. M. Adema and G. Mitta (2015). "Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade." *Fish & Shellfish Immunology*.
- Dheilly, N. M., D. Duval, G. Mouahid, R. Emans, J.-F. Allienne, R. Galinier, C. Genthon, E. Dubois, L. Du Pasquier, C. M. Adema, C. Grunau, G. Mitta and B. Gourbal (2015). "A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*." *Developmental & Comparative Immunology* 48(1): 234-243.
- Dinh, C., T. Farinholt, S. Hirose, O. Zhuchenko and A. Kuspa (2018). "Lectins modulate the microbiota of social amoebae." *Science* 361(6400): 402-406.
- Doenhoff, M. J., P. Hagan, D. Cioli, V. Southgate, L. Pica-Mattoccia, S. Botros, G. Coles, L. A. Tchuem Tchuente, A. Mbaye and D. Engels (2009). "Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs." *Parasitology* 136(13): 1825-1835.
- Ducklow, H. W., P. J. Boyle, P. W. Mangel, C. Strong and R. Mitchell (1979). "Bacterial flora of the schistosome vector snail *Biomphalaria glabrata*." *Applied and Environmental Microbiology* 38: 667-672.

- Escudié, F., L. Auer, M. Bernard, M. Mariadassou, L. Cauquil, K. Vidal, S. Maman, G. Hernandez-Raquet, S. Combes and G. Pascal (2017). "FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution." *Bioinformatics*: btx791-btx791.
- Fallon, P. G. and M. J. Doenhoff (1994). "Drug-Resistant Schistosomiasis: Resistance to Praziquantel and Oxamniquine Induced in *Schistosoma Mansoni* in Mice is Drug Specific." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51(1): 83-88.
- Franzenburg, S., S. Fraune, S. Künzel, J. F. Baines, T. Domazet-Lošo and T. C. G. Bosch (2012). "MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(47): 19374-19379.
- Franzenburg, S., J. Walter, S. Künzel, J. Wang, J. F. Baines, T. C. G. Bosch and S. Fraune (2013). "Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(39): E3730-E3738.
- Fraune, S., R. Augustin, F. Anton-Erxleben, J. Wittlieb, C. Gelhaus, V. B. Klimovich, M. P. Samoilovich and T. C. G. Bosch (2010). "In an early branching metazoan, bacterial colonization of the embryo is controlled by maternal antimicrobial peptides." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(42): 18067-18072.
- Fujio-Vejar, S., Y. Vasquez, P. Morales, F. Magne, P. Vera-Wolf, J. A. Ugalde, P. Navarrete and M. Gotteland (2017). "The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia." *Front Microbiol* 8: 1221.
- Futo, M., S. A. Armitage and J. Kurtz (2015). "Microbiota Plays a Role in Oral Immune Priming in *Tribolium castaneum*." *Front Microbiol* 6: 1383.
- Galinier, R., E. Roger, Y. Moné, D. Duval, A. Portet, S. Pinaud, C. Chaparro, C. Grunau, C. Genthon, E. Dubois, A. Rognon, N. Arancibia, B. Dejean, A. Théron, B. Gourbal and G. Mitta (2017). "A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(3): e0005398.
- Gendrin, M. (2017). "A Swiss Army Knife to Cut Malaria Transmission." *Cell Host & Microbe* 22(5): 577-579.
- Hooper, L. V., D. R. Littman and A. J. Macpherson (2012). "Interactions between the microbiota and the immune system." *Science (New York, N.Y.)* 336(6086): 1268-1273.

- Hooper, L. V. and A. J. Macpherson (2010). "Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota." *Nat Rev Immunol* 10.
- Ittiprasert, W. and M. Knight (2012). "Reversing the Resistance Phenotype of the *Biomphalaria glabrata* Snail Host *Schistosoma mansoni* Infection by Temperature Modulation." *PLoS Pathogens* 8(4): e1002677-e1002677.
- Jenkins, T. P., L. E. Peachey, N. J. Ajami, A. S. MacDonald, M. H. Hsieh, P. J. Brindley, C. Cantacessi and G. Rinaldi (2018). "*Schistosoma mansoni* infection is associated with quantitative and qualitative modifications of the mammalian intestinal microbiota." *Sci Rep* 8(1): 12072.
- Joshi, D., X. Pan, M. J. McFadden, D. Bevins, X. Liang, P. Lu, S. Thiem and Z. Xi (2017). "The Maternally Inheritable *Wolbachia* wAlbB Induces Refractoriness to *Plasmodium berghei* in *Anopheles stephensi*." *Frontiers in Microbiology* 8: 366.
- Knight, M., O. Elhelu, M. Smith, B. Haugen, A. Miller, N. Raghavan, C. Wellman, C. Cousin, F. Dixon, V. Mann, G. Rinaldi, W. Ittiprasert and P. J. Brindley (2015). "Susceptibility of Snails to Infection with Schistosomes is influenced by Temperature and Expression of Heat Shock Proteins." *Epidemiology (Sunnyvale, Calif.)* 5(2): 189.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson and R. Knight (2012). "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* 489(7415): 220-230.
- McFall-Ngai, M., M. G. Hadfield, T. C. Bosch, H. V. Carey, T. Domazet-Loaso, A. E. Douglas, N. Dubilier, G. Eberl, T. Fukami, S. F. Gilbert, U. Hentschel, N. King, S. Kjelleberg, A. H. Knoll, N. Kremer, S. K. Mazmanian, J. L. Metcalf, K. Nealson, N. E. Pierce, J. F. Rawls, A. Reid, E. G. Ruby, M. Rumpho, J. G. Sanders, D. Tautz and J. J. Wernegreen (2013). "Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(9): 3229-3236.
- Mitta, G., C. M. Adema, B. Gourbal, E. S. Loker and A. Theron (2012). "Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms." *Dev Comp Immunol* 37(1): 1-8.
- Mitta, G., R. Galinier, P. Tisseyre, J. F. Allienne, Y. Girerd-Chambaz, F. Guillou, a. Bouchut and C. Coustau (2005). "Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes." *Developmental and comparative immunology* 29(5): 393-407.
- Mitta, G., B. Gourbal, C. Grunau, M. Knight, J. M. Bridger and A. Theron (2017). "Chapter Three – The Compatibility Between *Biomphalaria glabrata* Snails and *Schistosoma mansoni*: An Increasingly Complex Puzzle." *Advances in Parasitology* 97: 111-145.

- Mone, Y., B. Gourbal, D. Duval, L. Du Pasquier, S. Kieffer-Jaquinod and G. Mitta (2010). "A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model." *PLoS Negl Trop Dis* 4(9).
- Moné, Y., A.-C. Ribou, C. Cosseau, D. Duval, A. Théron, G. Mitta and B. Gourbal (2011). "An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions." *International Journal for Parasitology* 41(7): 721-730.
- Narasimhan, S., T. J. Schuijt, N. M. Abraham, N. Rajeevan, J. Coumou, M. Graham, A. Robson, M.-J. Wu, S. Daffre, J. W. Hovius and E. Fikrig (2017). "Modulation of the tick gut milieu by a secreted tick protein favors *Borrelia burgdorferi* colonization." *Nature communications* 8: 184.
- Nyholm, S. V. and M. J. McFall-Ngai (2004). "The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis." *Nat Rev Microbiol* 2(8): 632-642.
- Pinaud, S., J. Portela, D. Duval, F. C. Nowacki, M.-A. Olive, J.-F. Allienne, R. Galinier, N. M. Dheilly, S. Kieffer-Jaquinod, G. Mitta, A. Théron and B. Gourbal (2016). "A Shift from Cellular to Humoral Responses Contributes to Innate Immune Memory in the Vector Snail *Biomphalaria glabrata*." *PLOS Pathogens* 12(1): e1005361-e1005361.
- Portet, A., S. Pinaud, C. Chaparro, R. Galinier, G. Charriere, J. F. Allienne, D. Duval and B. Gourbal (2018). "Sympatric and allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in *Biomphalaria* / *Schistosoma* interaction." *BioRxiv* 378034; doi: <https://doi.org/10.1101/378034>
- Pradeu, T. and V. Eric (2014). "The discontinuity theory of immunity." *Sci Immunol* 1(1): 1-9.
- Ramirez, J. L., J. Souza-Neto, R. T. Cosme, J. Rovira, A. Ortiz, J. M. Pascale and G. Dimopoulos (2012). "Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6: 1-11.
- Rodrigues, J., F. A. Brayner, L. C. Alves, R. Dixit and C. Barillas-mury (2010). "Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes." *Science* 329(5997): 1353-1355.
- Ryu, J.-H., S.-H. Kim, H.-Y. Lee, J. Y. Bai, Y.-D. Nam, J.-W. Bae, D. G. Lee, S. C. Shin, E.-M. Ha and W.-J. Lee (2008). "Innate Immune Homeostasis by the Homeobox Gene *Caudal* and Commensal-Gut Mutualism in *Drosophila*." *Science* 319(5864): 777.

- Sansone, C. L., J. Cohen, A. Yasunaga, J. Xu, G. Osborn, H. Subramanian, B. Gold, N. Buchon and S. Cherry (2015). "Microbiota-dependent priming of antiviral intestinal immunity in *Drosophila*." *Cell Host and Microbe* 18: 571-581.
- Silva, T. M., E. S. Melo, A. C. S. Lopes, D. L. Veras, C. R. Duarte, L. C. Alves and F. A. Brayner (2013). "Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil." *Letters in Applied Microbiology* 57: 19-25.
- Sminia, T. and L. Barendsen (1980). "A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails, *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncatus*." *Journal of Morphology* 165: 31-39.
- Tennessen, J. A., A. Théron, M. Marine, J.-Y. Yeh, A. Rognon and M. S. Blouin (2015). "Hyperdiverse Gene Cluster in Snail Host Conveys Resistance to Human Schistosome Parasites." *PLoS Genetics* 11(3): e1005067.
- Xi, Z., J. L. Ramirez and G. Dimopoulos (2008). "The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection." *PLOS Pathogens* 4.
- Zhang, H., J. B. Sparks, S. V. Karyala, R. Settlage and X. M. Luo (2015). "Host adaptive immunity alters gut microbiota." *ISME J* 9(3): 770-781.

Supplementary material

Fig. S1: Core Microbiota analysis: Modifications of the bacterial core microbiota of *Biomphalaria glabrata* following *Schistosoma* primo-infection and challenge. After a one-way Permanova with a Benjamini & Hochberg post-hoc, a frequency test was realised to determine which specific families were affected during infection. A. Proportion of OTU Families affected by infection are represented by colour circles. The Venn diagram shows more precisely the specific impact of infections on the OTU families partially influenced. B. Heatmap corresponding to all core microbiota with clustering on Family modification patterns between conditions. The scale of red correspond to ratio between naive condition and each point of infection.

Fig. S2: Differential gene expression of LBP/BPI and Achacin antimicrobial protein families: Log₂FC (fold change) of antimicrobial immune transcripts between naive and infected snails inferred from previous RNAseq analysis on the same experiment. A positive Log₂ fold-change indicates over-expression in infected snails compared to the naive snails. Antimicrobial protein families: LBP/BPIs (*Lipopolysaccharide-binding protein / Bactericidal Permeability-Increasing protein*) consisting of 5 genes (in blue) and achacins consisting of 2 genes (in orange).

2. Composition du microbiote bactérien de différentes souches de Planorbidae

Schistosomiasis vector snails and their microbiota display a phylosymbiosis pattern

Camille Huot¹, Camille Clerissi^{1,2}, Benjamin Gourbal¹, Richard Galinier¹, David Duval¹ and Eve Toulza^{1*}

¹IHPE, Univ. Montpellier, CNRS, Ifremer, Univ. Perpignan Via Domitia, Perpignan France.

²Present address: EPHE, UPVD-CNRS, USR3278 CRIOBE, PSL Research University, Perpignan, France.

* **Correspondence:**

Eve Toulza : eve.toulza@univ-perp.fr

Keywords: *microbiota, phylosymbiosis, metabarcoding, Planorbid snails, tripartite interactions, schistosomiasis. (Min.5-Max. 8)*

Abstract

Planorbidae snails are the intermediate host for the trematode parasite of the *Schistosoma* genus which is responsible for schistosomiasis, a disease that affects both humans and cattle. The microbiota for *Schistosoma* has already been described as having an affect on host/parasite interactions, specifically through immunological interactions. Here we sought to characterize the microbiota composition of seven Planorbidae species and strains. Individual snail microbiota was determined using 16S rDNA amplicon sequencing. The bacterial composition was highly specific to host strain with limited inter-individual variation. In addition, it displayed complete congruence with host phylogeny, revealing a phylosymbiosis pattern. These results were confirmed in common garden, suggesting that the host highly constrains microbial composition. This study presents the first comparison of bacterial communities between several intermediate snail hosts of *Schistosoma* parasites, paving the way for further studies on the understanding of this tripartite interaction.

1 Introduction

A microbiota consists of microbial communities in association with a host. Here, we defined the microbiota as all microorganisms involved in a long lasting interaction with a host, excluding parasites and pathogen microorganisms (Bordenstein & Theis, 2015). The microbiota is involved in numerous functions, including nutrition (McCutcheon *et al.*, 2009), development (Fraune & Bosch, 2010; McFall-Ngai, 2002), reproduction (Perlman *et al.*, 2008; Werren *et al.*, 2008) and immunity (Hahn & Dheilly, 2016; Lee & Mazmanian, 2010). For example, the bacterial microbiota of the mosquito gut is involved in the immune response of its host against

DENV pathogen virus, through direct inhibition of the virus towards bacterial metabolites as well as through indirect effects by stimulating its basal immunity (Saraiva *et al.*, 2016). This illustrates the importance of considering microbiota in host-pathogen interactions. Numerous studies have already explored the factors shaping microbiota composition in several models and highlighted the role of neutral processes (Burns *et al.*, 2015), environment (Roder *et al.*, 2015), host genetic background (Brucker & Bordenstein, 2011) or host physiology/immunity (Chu & Mazmanian, 2013; Hahn & Dheilly, 2016). Results from these studies demonstrate the effect of the host immune system in microbiota homeostasis. In *Hydra*, the nature and combination of antimicrobial peptides belonging to the arminin family are involved in the species-specificity of host microbial communities that follow host phylogeny (Franzenburg *et al.*, 2013).

Here, we characterized the microbiota of several genera of Planorbidae, a family of freshwater snails. These snails are the intermediate hosts for the parasite *Schistosoma spp.*, a genus of trematode parasites which develop asexually in the snails before infecting vertebrates where sexual reproduction takes place. Human *Schistosoma* species, mainly *S. mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*, infect about 250 million people (Hotez *et al.*, 2014) annually, and each year, more than 200 000 people die as a result of the infection worldwide (WHO, 2019). While *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria pfeifferi* snails can be infected with *Schistosoma mansoni* (responsible for human intestinal schistosomiasis), *Planorbarius metidjensis* is responsible for the transmission of *S. bovis*, and *Bulinus truncatus* snails are natural hosts for *S. bovis* as well as *S. haematobium* (agent of the human urinary schistosomiasis). Interestingly, it has been shown that within the *B. glabrata* species, some strains can be completely refractory to infection depending on the parasite strain, a phenomenon called compatibility polymorphism (Galinier *et al.*, 2017; Theron *et al.*, 2014). These snail-parasite interactions, resulting from coevolution dynamics, reflect differences in host immune capacities or differences in immunobiological interactions between different host-parasite combinations.

The snail immune response in this interaction is complex with a specificity according to the parasite strain (Portela *et al.*, 2013). Indeed, snails immune effectors and receptors seem to be specific to the parasite and the type (cellular or humoral) and efficiency of immune response is linked to the infection type (primo-infection or challenge (homologous or heterologous) (Pinaud *et al.*, 2016). A shift in microbiota composition following an infection was observed after an immune challenge, where humoral immunity took place (Portet *et al.*, 2018). This highlights the importance of further in-depth studies of the relationship between the host's immune and vectorial capacities and its microbiota composition. To do this, it is essential to first characterize the factors that shape microbial communities and their host specificity.

To identify the effect of host identity in bacterial microbiota composition, we used 16S rDNA amplicon sequencing to analyse the bacterial communities at the individual level (10 to 15 samples per condition/strain) for six snail strains: four different strains of *Biomphalaria glabrata*, one strain of *Biomphalaria pfeifferi*, one strain of *Planorbarius metidjensis*, and one strain of *Bulinus truncatus*. Our results provided the first characterization of microbiota for several strains of molluscs, the intermediate hosts of the *Schistosoma sp.* parasite.

2 Material & Methods

2.1 Rearing conditions

2.1.1 Individual tank experiment

To determine the bacterial microbiota composition and specificity, we used four strains of *Biomphalaria glabrata*, one from Guadeloupe (B. gla GH2), two from Brazil (B. gla BAR2 and B. gla BRE2) and one experimentally selected for reduced compatibility to different *S. mansoni* parasite strains (B. gla BS902) (Theron et al., 2014). In addition, *Biomphalaria pfeifferi* (Oman) as well as another Planorbinae genus, *Planorbarius metidjensis* (Spain), and a Planorbidae non-Planorbinae species, *Bulinus truncatus* (Spain) were used (Table 1).

Table 1 : Origin of snail strains used in this study

Species	Strain	Strain code	Strain origin
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BAR2	B. gla BAR2	Belo Horizonte, Brazil (G. Oliveira, 2013)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BRE2	B. gla BRE2	Recife, Brazil (A. Théron, 1975)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	GH2	B. gla GH2	Dans Fond, Guadeloupe (2005)
<i>Biomphalaria glabrata</i>	BS902	B. gla BS902	Salvador, Brazil (1960)
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	/	B. pfe	Anakhar, Oman (H. Moné, G. Moné, 2015)
<i>Planorbarius metidjensis</i>	/	P. met	Salamanca, Spain (S. Mas-Comà, 2014)
<i>Bulinus truncatus</i>	/	B. tru	Almeria, Spain (A. Olega, 2015)

All strains were reared in the same conditions: 20 individuals of each strain were maintained in separate tanks (3L) and fasted one week before sampling to avoid changes in microbiota composition associated with diet. Snail shell size (diameter 7-8 mm), which is directly correlated to age, was similar for each experimental group.

2.1.2 Common garden experiment

Thirty molluscs of each strain were maintained for two months within the same 8L tank, where perforated baskets separating the strains were used in order to avoid mixing and potential antagonistic interactions, but which favoured the potential exchange of microbiota as they were reared in the same tank. Molluscs were fed with lettuce every 2 days (and fasted one week before sampling) and 50% of the water was renewed weekly.

2.2 Sampling

The mollusc shells were cleaned with cotton buds soaked in bleach (to avoid transfer of contaminants), and molluscs were then removed from the shell by dissection and flash-frozen individually in liquid nitrogen before being kept at -80°C until DNA extraction. DNA extraction and sequencing

DNA was extracted with the Nucleospin® tissue extraction kit from Macherey-Nagel and quantified with Qubit 2.0 Fluorometer following the procedure described in the Qubit™ dsDNA HS Assay Kit, to check its purity and yield.

For samples with highest DNA yield and quality (11 to 15 depending on snail strains for individual tank experiment, and 10 per strain for the common garden experiment, Table S1), 16S rRNA gene (V3-V4 regions) (Klindworth et al., 2013) libraries were generated using PCR primers 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') and 805R (3'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-5') following the standard Illumina two-step procedure. Libraries were paired-end sequenced with 250 bp read length on three different flow cells using the MiSeq system (Illumina) at the Génome Québec Innovation Centre, McGill University Montréal, Canada. A blank sample was sequenced in each of the three runs but as very few sequences were obtained, this dataset was not further analyzed.

2.3 Analysis of 16S sequences

The FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) pipeline implemented on a galaxy instance (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) was used for data processing (Escudié et al., 2017). In brief, paired reads were merged using FLASH (Magoč & Salzberg, 2011). After denoising and primers/adapters removal with CUTADAPT (Martin, 2011), de novo clustering was performed using SWARM with a local clustering threshold (Mahé et al., 2014), with aggregation distance $d = 3$ after denoising. Chimeras were removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016). We filtered the dataset for singletons and performed affiliation using Blast+ against the Silva database (release 128, September 2016) for 16S rRNA gene amplicons. Finally, OTU tables were produced in a standard BIOM format for subsequent analyses.

We then used the packages phyloseq 1.24.2 (McMurdie & Holmes, 2013) and vegan 2.5-4 (Oksanen et al., 2018) with RStudio (R Core Team (2017)). Sample B. gla BRE_JC_7 had too low coverage (155 reads) and was thus discarded from subsequent analyses. Non-bacterial sequences as well as singletons remaining after all the secondary filtering steps were discarded from the dataset. We rarefied the data according to the sample with fewer sequence numbers (18299 reads for the Individual Experiment and 15969 reads for the Common Garden) in order to normalize for sequencing coverage. We characterized the beta-diversity dissimilarities using Principal Coordinates Analyses (PCoA) and Hierarchical Clustering on Bray-Curtis distance matrix (ranging from 0 for identical communities to 1 for completely different communities).

2.4 Core microbiota

To determine the core microbiota, which is the most stable part of the microbiota, we identified the families and genera that were either present in 100% of individuals or absent from a maximum of one individual for each strain, and represented at least 0.5% of sequences for each strain.

2.5 Snail phylogeny

Phylogenetic analysis was performed using 28S rRNA gene sequences from the NCBI database (*B. glabrata*: AF435694.1, *B. pfeifferi*: MG461588.1, *P. metidjensis*: AF435671.1 and *B. truncatus*: AF435659.1). The 28S rRNA gene sequence of a Physidae species, *Physa* sp. (Egypt) (sister family of the Planorbidae) was used as an outgroup (AF435654.1). The sequences were aligned using MUSCLE (v3.8.31) and the tree was reconstructed using the

maximum likelihood method implemented in the PhyML program (v3.1/3.0 aLRT) with 500 bootstraps on <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al., 2008; Dereeper et al., 2010).

2.6 Statistical analyses

We analysed the variance due to host effect on dissimilarity matrices using Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). PERMANOVA were done with 999 permutations. For all analyses, the threshold significance level was set at 0.05.

We used an indicator value index and 999 permutations (multipatt, {indicspecies}) (Caceres and Legendre 2009) to identify OTUs associated with the different host species. P-values were corrected for multiple comparisons using Benjamini and Hochberg's method (Benjamini and Hochberg 1995) (p.adjust, {stats}).

3 Results

3.1 Bacterial composition

At the phylum level, the composition of bacteria was similar in all *Biomphalaria* samples (Figure 1), with Proteobacteria being the predominant phylum for the different strains, in which the Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Comamonadaceae and Xanthomonadaceae families were the most represented. This is consistent with the results found by Portet et al. (2018). *P. metidjensis* composition also displayed a high proportion of Proteobacteria, in particular Alphaproteobacteria, represented by Rhodobacteraceae (Table S1). In the case of *B. truncatus*, more pronounced differences were visible at the phylum level, where Proteobacteria and Tenericutes were dominant (Figure 1), with the latter represented mainly by Mycoplasmataceae, and more specifically by the genus *Mycoplasma* (Table S1).

The core microbiota was determined as all bacterial families that were either present in 100% of individuals or absent from a maximum of one individual. The core microbiota was composed of 44 families, for all strains included (Table S2). The core microbiota composition varied between strains; whereas seven bacterial families were common to all strains, where *Cloacibacterium* (a Flavobacteriaceae genus) were found as part of the core microbiota in all *Biomphalaria* strains and species, except for *B. glabrata* BS90, which was absent in the core microbiota of *P. metidjensis* and *B. truncatus*.

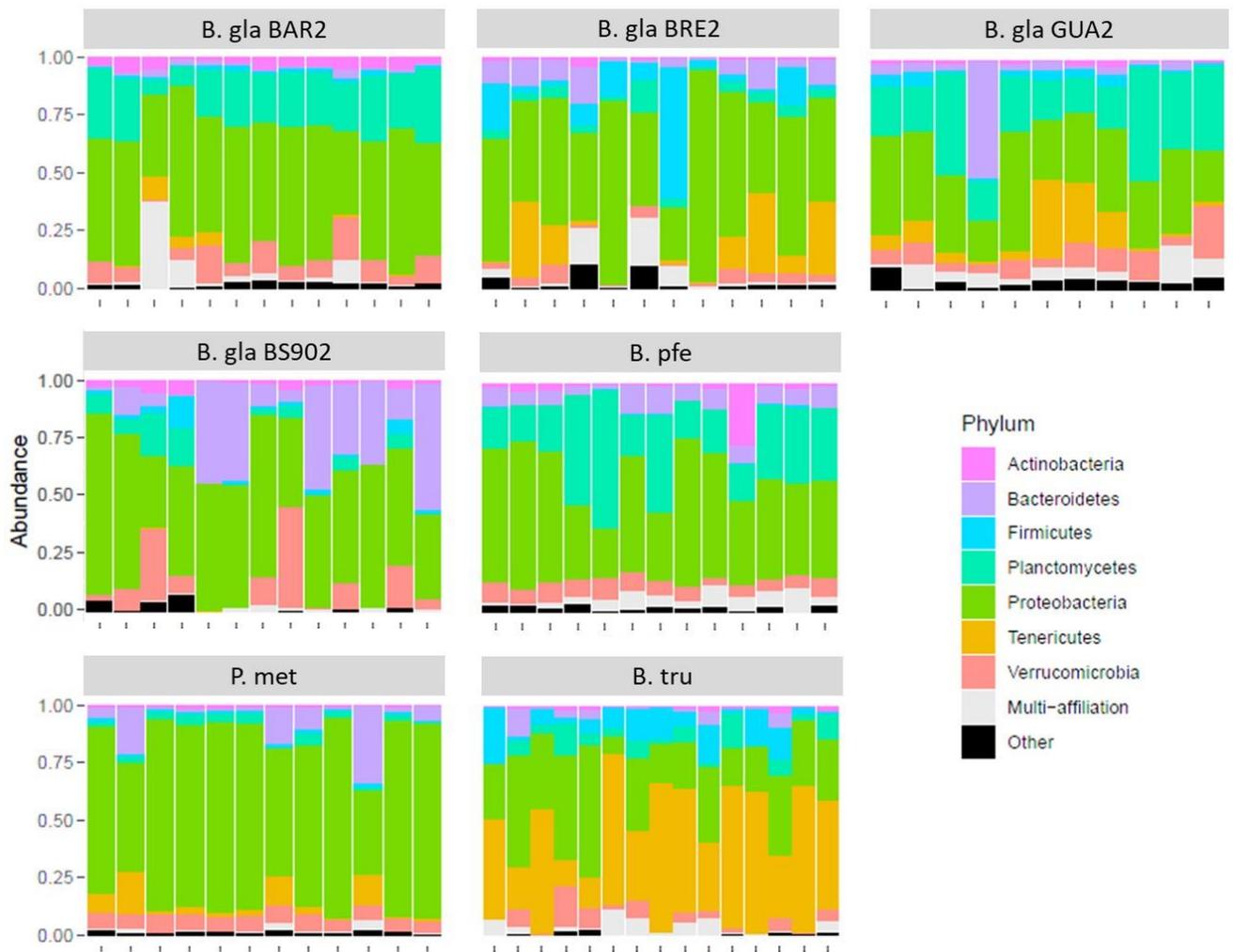


Figure 1: Relative composition for the eight most abundant phyla in the microbiota for each strain of mollusc

3.2 Beta-diversity, ordination and clustering

An ordination using PCoA was performed on Bray-Curtis (BC) distance matrix to visualize the similarities between individuals according to their bacterial composition (Figure 2). The first two axes explained 30% of the variability observed. Individuals tended to group according to host species. *Biomphalaria* strains were grouped at the exception of the *B. glabrata* BS902 strain. Individuals of the two other species, *Planorbarius metidjensis* and *Bulinus truncatus* were separated from *Biomphalaria* individuals.

The hierarchical clustering analysis based on BC distance on the core microbiota confirmed a grouping between individuals of the same strain or species. Moreover, the dendrogram of bacterial communities reflected host phylogeny (Figure. 3). *B. truncatus* and *P. metidjensis* were separated from *Biomphalaria* species, and *B. pfeifferi* was separated from *B. glabrata* strains. The microbiota specificity according to host genetic background was confirmed by Manova on Bray-Curtis dissimilarity matrix on core microbiota ($p < 0.001$).

The core microbiota beta-diversity was analysed using the same approach with a PCoA ordination based on the Bray-Curtis dissimilarity index (Figure. 3). Individuals belonging to the same strain tend to cluster together and *Biomphalaria* strains were grouped, except for, again, the BS902 strain. In addition, individuals from the two other species, *Planorbarius*

metidjensis and *Bulinus truncatus* were separated from *Biomphalaria* individuals. This analysis of the core microbiota composition confirmed the pattern obtained for the whole microbiota with specific core microbiota associations for individuals belonging to the same phylogenetic group (strain, species or genus), suggesting a phyllosymbiosis pattern, driven by host species among snail intermediate hosts of schistosomiasis.

We used indicator value index and permutation tests to identify OTUs significantly associated with each host species. In average, each species had 37 specific OTUs belonging to 88 genera (Table S3). Although the 88 genera were mostly (77%) specific of each host species, this analysis highlighted that specific OTUs belonging to 5 genera (*Pirellula*, *Planctomyces*, *Candidates Odysella*, *Mesorhizobium*, and *Pseudomonas*) were found in more than 50% of host species. Strikingly, specific OTUs from *Mesorhizobium* and *Pseudomonas* showed identical distribution within host species (presence in BRE, BS90, Pfe, and Plan), suggesting that these bacteria might cooperate within host microbiome.

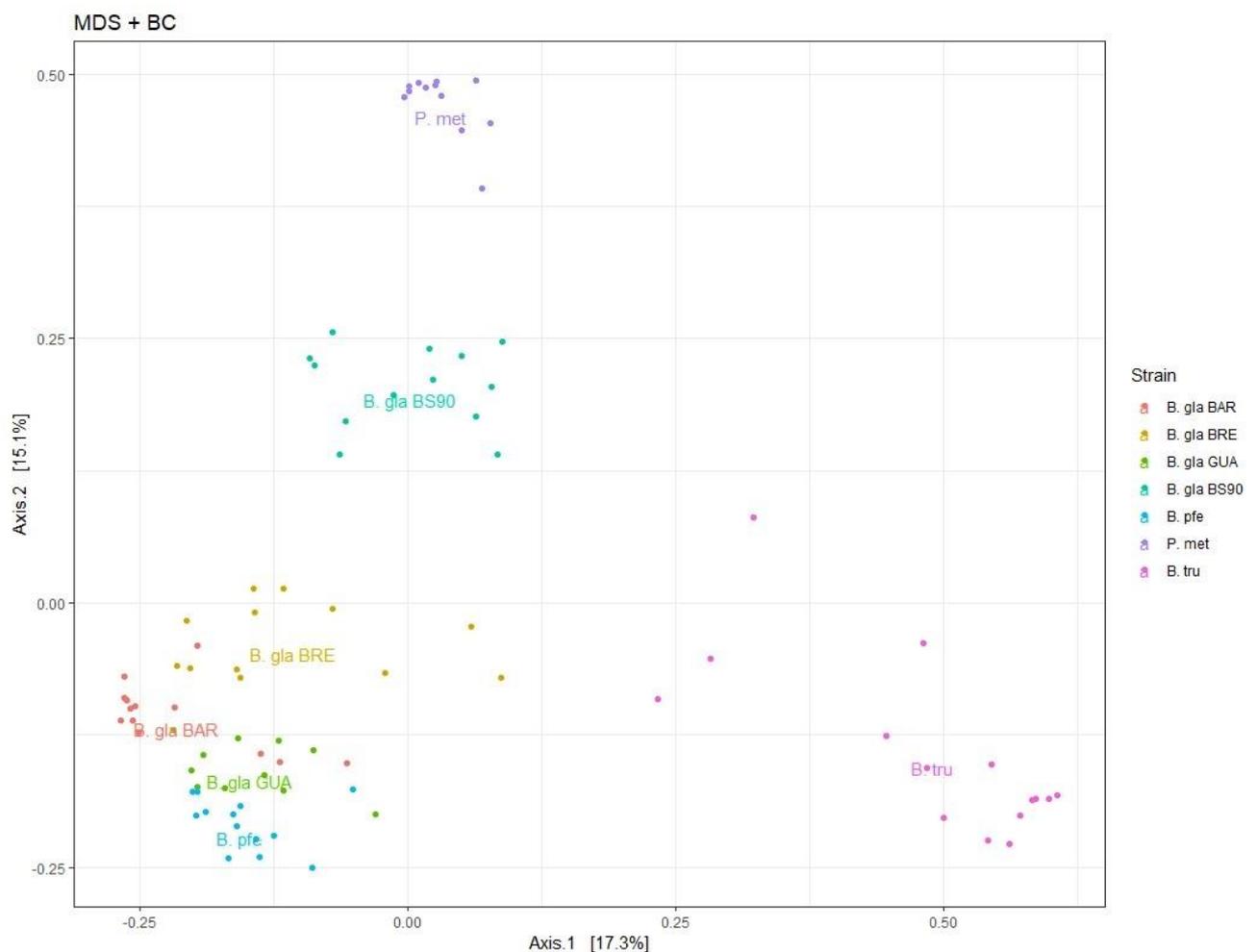


Figure 2: Principal Coordinate Analysis (PCoA) on Bray-Curtis dissimilarity matrix for bacterial microbiota composition. Each dot is an individual and each colour, a strain. The labels are displayed at the barycentre.

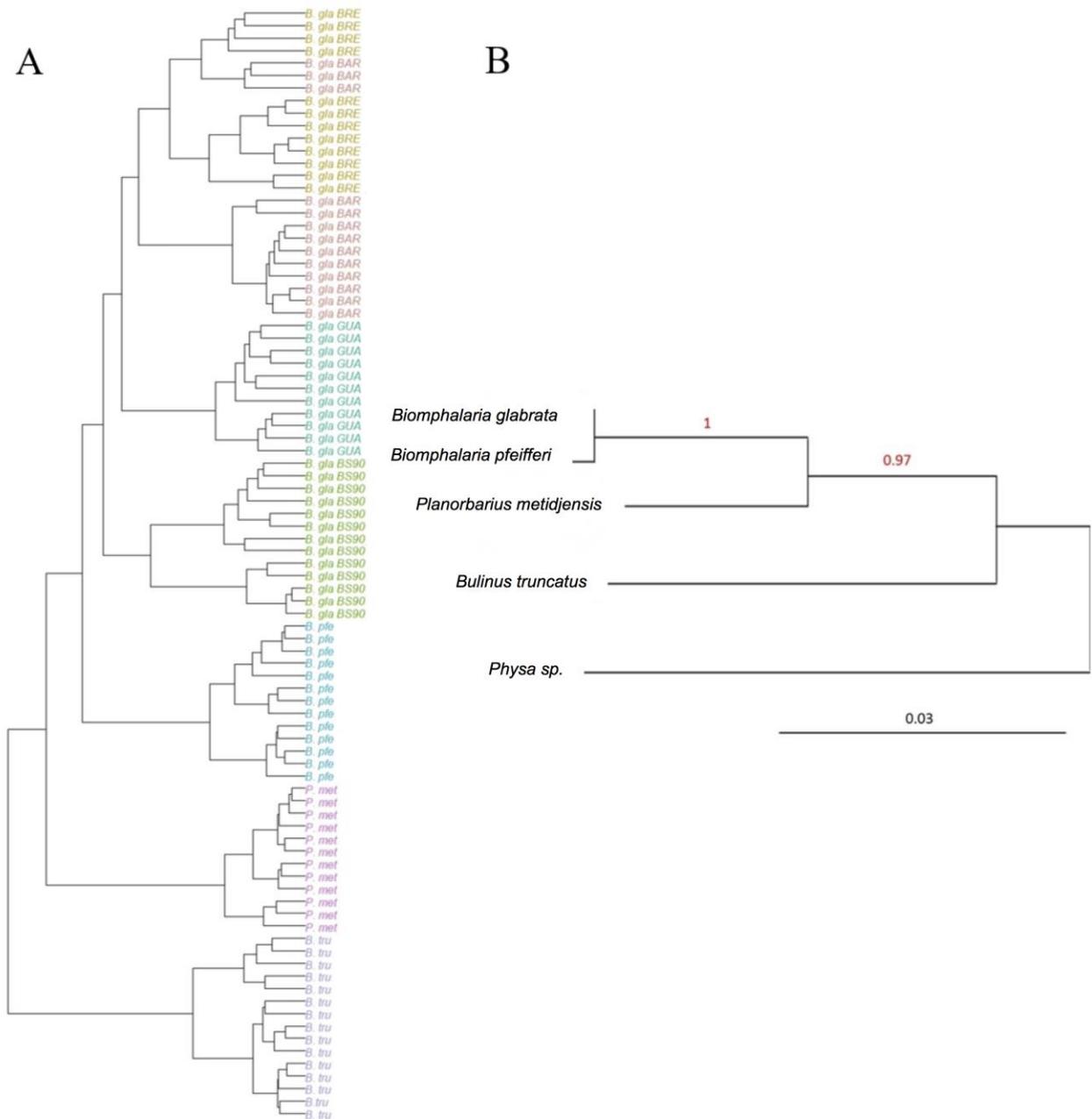


Figure 3: A) Hierarchical clustering based on Bray-Curtis dissimilarity matrix and Ward linkage for OTUs of the core microbiota. Each colour represents a strain. B) Phylogenetic tree of host species based on 28S rRNA gene sequence and using Maximum Likelihood with 500 bootstraps (%) for node support. *Physa sp.* was used as an outgroup. The red numbers are the bootstrap values for the nodes.

3.3 Common garden

Environmental conditions and/or host genetics can both affect microbiota composition. To investigate the main key drivers for core microbiota composition, we performed an additional experiment with all strains raised together in the same water for two months. However, we couldn't include *B. pfeifferi* in this analysis because most individuals did not survive until the end of the experiment as they escaped their basket and were predated.

The PCoA ordination revealed a similar microbiota specificity by strain to those observed in the first experiment with a grouping by strain then species (Figure S1), as confirmed by Manova analysis on host effect on Bray-Curtis dissimilarities between host strains ($p < 0.001$).

4 Discussion

To understand the host effect in shaping microbiota in Planorbidae schistosomiasis vector snails, we characterized the individual bacterial communities associated with several strains of *Biomphalaria glabrata*, *B. pfeifferi*, *P. metidjensis* and *B. truncatus* snails. Working on individuals reared in lab conditions favoured the control of most of the parameters that can influence microbiota composition.

In the present study, the whole microbiota was characterized using 16S amplicon sequencing. We identified 31207 OTUs among the six different snail strains. Most of OTUs were not assigned to the species level and 63% were assigned to the genus level. This corresponds to the limitation of the 16S V3V4 marker resolution. In addition, the blast+-based pipeline we use for taxonomic affiliation avoids false affiliation when a sequence matches with several sequences in the database. If several blast results have identical scores for a given OTU, and these taxonomies differ across hits, the OTU is set to “Multi-affiliation” (Escudié et al. 2017).

A few studies have characterized the cultivable flora of *B. glabrata* and have identified Aeromonadaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae and Pseudomonadaceae as being the most prevalent bacterial families in this species (Ducklow *et al.*, 1979; Ducklow *et al.*, 1981; Silva *et al.*, 2013). The dominant families described in the previous studies were also represented in our dataset. However, the relative composition of microbiota at the phylum level revealed that Proteobacteria were dominant for most of the different *Biomphalaria* strains, represented by three main families: Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria), Comamonadaceae (Betaproteobacteria) and Xanthomonadaceae (Gammaproteobacteria). Not all bacterial families can easily be cultivated; the MiSeq technology allows identifying the whole bacterial diversity. Our results are consistent with those found for *B. glabrata* BRE bacterial microbiota in Portet *et al.* (2018), in which these three families were the most abundant of the core microbiota. The microbiota of a Guadeloupian strain of *B. glabrata* was also described using a similar approach (Allan *et al.*, 2018) and similarly, the dominant phyla were Proteobacteria and Bacteroidetes.

Proteobacteria have been described as key factor in marine bivalve digestion, like the great scallop *Pecten maximus*, as they are involved in the degradation of major alimentary components contained in their diet (Lasa *et al.*, 2016). This phylum is also dominant in other molluscs, as is the case for oysters *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* and *C. sikamea* (Trabal *et al.*, 2012). As this is the first study to characterize the bacterial microbiota of *B. glabrata* BS902, *P. metidjensis*, *B. truncatus*, it is not possible to compare with previous results and to draw any definitive conclusions.

Interestingly, the bacterial families that comprise the core microbiota for each mollusc strain were also among the most abundant taxa in the whole microbiota, which is consistent with previous studies on this model (Portet *et al.*, 2018). In corals, for example, the OTUs belonging to core microbiota are among the rare taxa and are difficult to detect within the whole microbiota (Ainsworth *et al.*, 2015). Due to the high inter-individual variation, in some studies, the core microbiota in the coral model was defined by OTUs present in a limited proportion of individuals, 30% in Ainsworth *et al.* (2015) and 50% in Brener-Raffalli *et al.* (2018). In our study, the most impressive case of high abundance in core taxa concerns *B. truncatus*, with the

Mycoplasmataceae family, and more precisely the Genus *Mycoplasma*, that represents more than 47% of the whole microbiota. The Genus *Mycoplasma* was originally described as an obligate vertebrate parasite and the causative agent of human genital and respiratory diseases with a high tissue specificity (Razin *et al.*, 1998). This genus has been described in other models including algae and several invertebrates such as oysters (Clerissi *et al.*, 2018; King *et al.*, 2012), abalone (Huang *et al.*, 2010) and Sacoglossans (Davis *et al.*, 2013). It has also been described as being one of the most abundant microorganisms in the deep-sea bone-eating snail, *Rubyspira osteovora* (Aronson *et al.*, 2016). Its role in these organisms remains unclear but some authors hypothesized that they may help with digestion (Aronson *et al.*, 2016; Duperron *et al.*, 2012; Fraune & Zimmer, 2008), notably because of its presence in the digestive tract. In the present study, bacteria belonging to the genus *Cloacibacterium* have been found in all *Biomphalaria* strains and species, and *C. haliotis* has been described in another mollusc, the sea snail *Haliotis discus* (Hyun *et al.*, 2014).

The results of dissimilarity between strains revealed that the bacterial microbiota of *B. truncatus* individuals was distinct from other species with most of the Bray-Curtis distance values ranging between 0.8 and 0.99. The phylogenetic distance of this species from the others could explain this difference. Indeed, this is the only species, in this study, belonging to Bulinae sub-family, whereas all the others are classified in Planorbinae sub-family. Moreover, the bacterial microbiota of this species seems to be very specific, as suggested by the high abundance of *Mycoplasma*. Interestingly, individuals of the strain Bg BS90 also displayed strong dissimilarities with the other species and even the other strains of *B. glabrata*, with most of the dissimilarity values also ranging from 0.8 and 0.99.

As the different strains were maintained in separate tanks, we performed a common garden experiment to circumvent potential biases due to mollusc maintenance and tested whether the same microbial environment would lead to a homogeneous distribution of the bacterial communities between snail strains. This result confirmed a specificity of the microbiota by strain/species, suggesting that the importance of the host effect in microbiota composition is higher than the effect of rearing conditions. The microbiota can nevertheless vary during the host lifespan, with an initial recruitment of bacterial communities occurring during early development. It would be interesting to test the possibility of microbiota transfers from the environment in different developmental stages when the definitive flora is not yet fully established. A recent study showed a loss of microbial communities from one generation to the next in laboratory reared mosquitoes (Akorli *et al.*, 2019), which presents another avenue for our model to be further investigated.

In both individual and common garden experiments, almost every individual of each strain grouped together in the dendrogram, supporting the specificity according to the host. Additionally, the topology of microbiota dissimilarities was congruent with the mollusc phylogeny, despite a limited number of strains but that covers species, genera and sub-families of Planorbidae. This suggests a pattern of phylosymbiosis at the host species level among snail intermediate hosts of schistosomiasis. This has already been described in other models, for both vertebrates and invertebrates. In vertebrates, for example, a loose phylosymbiosis pattern was identified between 44 species of coral reef fishes and their skin microbiota (Chiarello *et al.*, 2018), possibly related to a plasticity in the immune system. Host immune genes and other factors like nutrient production by the host and vertical transmission have also been hypothesized to explain phylosymbiosis between several populations of American pika, *Ochotona princeps* (Kohl *et al.*, 2017). For invertebrates, this pattern was shown in three *Nasonia* species, in a controlled environment, with such a codiversification and coevolution that there is a lethality of hybrids from a breed between two *Nasonia* species (Brucker &

Bordenstein, 2013). This codiversification as a mechanism leading to phylosymbiosis has also been hypothesized in a study comparing microbiota composition of 15 *Cephalotes* species (Sanders *et al.*, 2014), whereas it would not be the main driver of this phenomenon in corals, in which phylosymbiosis would be led by other mechanisms like biogeography or host traits (Pollock *et al.*, 2018). Similar findings of phylosymbiosis driven by the host have been identified between two different species of *Hydra* (Fraune & Bosch, 2007) and many studies have shown that the host genetic background shape the microbiota in numerous models (Chaston *et al.*, 2016; Coon *et al.*, 2016; Paniagua Voirol *et al.*, 2018; Parker *et al.*, 2017; Sánchez-Cañizares *et al.*, 2017). In our model, this correlation between host and microbiota indicates that host phylogeny highly constrains the microbiota composition and structuration (Brooks *et al.*, 2016; Chiarello *et al.*, 2018). However, this pattern may not be ubiquitous and a few studies on *Drosophila* (Chandler *et al.*, 2011), mosquitos (Osei-Poku *et al.*, 2012) or flea beetles (Kelley & Dobler, 2011) identified no correlation between host phylogeny and microbiota composition. Nevertheless, we could not assess the phylosymbiosis pattern at a lower phylogenetic level (i.e. the strain) as we cannot determine the genetic distance between the different *Biomphalaria glabrata* strains because of inbreeding in the laboratory and high differentiation between strains.

In our case, the phylosymbiosis pattern could not be considered as a hallmark of coevolution because we focused on the whole bacterial community of a host, with very complex interactions, and not on a specific symbiont. Here, we defined coevolution according to O'Brien and collaborators (2019), as a "*reciprocal evolution of [...] a broad range of interactions such as predator-prey, host-symbiont and host-parasite interactions, or interactions among the members of a community of organisms such as a host and its associated microbiome*". O'Brien *et al.* noticed that hosts and their symbiont phylogenies are often mirrored, which can be interpreted as a parallel divergence called a codivergence. This codivergence has often led to obligatory symbiosis, as is the case between pea aphids and bacteria from the genus *Buchnera* (Baumann *et al.*, 2006) and is notably found in mutualistic symbiosis (O'Brien *et al.*, 2019). In this case, the protagonists have a very close interaction, with participation in each other's physiological mechanisms.

We considered the phylosymbiosis pattern toThe host-microbiota specificity illustrates the high interaction between the snails and their bacterial communities, suggesting a impact of the latter on its host fitness toward several functions like nutrition, development, reproduction and immunity. Given that, in this model, Planorbidae snails are intermediate hosts of *Schistosoma* parasites, it would be interesting to study the tripartite interaction between the trematodes, the molluscs and their microbiota.

Indeed, previous studies highlighted a variation in the compatibility phenotype between different combinations of *B. glabrata* strains and *S. mansoni* parasites (Galinier *et al.*, 2017; Theron *et al.*, 2014). Moreover, *P. metidjensis* and *B. truncatus* are not compatible with the same *Schistosoma* species. This compatibility polymorphism can be seen as a hallmark of differences in immune capacities. As the phylosymbiosis pattern suggests a strong link between host and microbiota, the hypothesis of a relationship between the snails' immune capacities and the composition of their microbiota can be made.

The protective role of whole microbiota (or gut microbiota), has indeed been shown in numerous models like the mosquitoes against dengue virus (Ramirez *et al.*, 2012) or the honey bees with the augmentation in antimicrobial peptide production (Li *et al.*, 2017). Another example is the microbiota of *Dysdercus fasciatus* that acts as a physical barrier to prevent the entry or attachment of a parasite (Onchuru *et al.*, 2018). Chiu and collaborators (2017) also

reviewed several examples of microbiota actions against pathogens, such as slowing or preventing the entry, installation, development and expansion of pathogens. In some models, the microbiota has a direct effect against their hosts' pathogens, producing effectors like ROS (Cirimotich *et al.*, 2011), or an indirect effect, promoting some immune pathway. Concerning the interaction between Planorbidae and *Schistosoma*, the immune mechanisms have been well studied, however, there are very few informations concerning the tripartite interactions. Some immune genes located in a Guadeloupe resistance to parasite complex (GRC) region have been shown previously to contribute in shaping microbiota (Allan *et al.*, 2018) highlighting a link between microbiota composition and host immunity.

The present study highlighted a strong host-microbiota specificity, which confirms the link between host genetics, immune capacity and microbiota composition. However, more information are needed to understand if there is a direct or indirect impact of microbiota on the host-parasite interaction.

The interaction between microorganisms and the host immune system can be complex. The microbiota stability can be affected upon parasite primo-infestation and challenge suggesting a tight control of immune system on bacterial composition (Portet *et al.*, 2018). The next step will be to compare the microbiota dynamics during an infection kinetic with several host/parasite combinations with different immunobiological interactions. Although a shift in microbiota composition during an infection associated with changes in snail immune gene expression was clearly established according to the host/parasite combination (sympatric/allopatric) (Portet *et al.*, 2018), further studies are needed to clarify the link between microbiota and snail host immunity. Phylosymbiosis pattern is a hallmark of tight interactions between host and microbiota, suggesting the role of microbial communities on different host physiological functions, including immunity. This study thus paves the way for future studies to decipher the role of microbiota in host fitness, including the development and transmission of parasites.

Declarations

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

Author Contributions: CH, BG, RG, DD and ET were involved in the study concept and design. CH was involved in sampling and data acquisition. CH, CC and ET performed data analysis. CH and ET drafted the manuscript and all authors contributed to critical revisions and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported by the DHOF program of the IHPE lab (<http://ihpe.univ-perp.fr/en/ihpe-transversal-holobiont/>). This study is set within the framework of the "Laboratoires d'Excellence (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41) and CeMEB (ANR-10-LABX-04-01).

Acknowledgments: We thank Nathalie Arancibia for and Jean-François Allienne for technical assistance. We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing help and computing resources thanks to Galaxy instance <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>.

Data Availability Statement: The datasets generated for this study can be found in the Sequence read Archive repository under BioProject PRJNA554540 (sequence data to be released upon publication).

References

- Ainsworth, T. D., Krause, L., Bridge, T., Torda, G., Raina, J.-B., Zakrzewski, M., Gates, R. D., Padilla-Gamiño, J. L., Spalding, H. L., Smith, C., Woolsey, E. S., Bourne, D. G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O., & Leggat, W. (2015). The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. *The ISME Journal*, 9, 2261–2274. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.39>
- Akorli, J., Namaali, P. A., Ametsi, G. W., Kwesi Egyirifa, R., Adjoa, N., & Pels, P. (2019). Generational conservation of composition and diversity of field-acquired midgut microbiota in *Anopheles gambiae* (sensu lato) during colonization in the laboratory. *Parasites & Vectors*, 12(27), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3287-0>
- Allan, E. R. O., Tennessen, J. A., Sharpton, T. J., & Blouin, M. S. (2018). Allelic variation in a single genomic region alters the microbiome of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Heredity*, 1–6. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy014>
- Aronson, H. S., Zellmer, A. J., & Goffredi, S. K. (2016). The specific and exclusive microbiome of the deep-sea bone-eating snail, *Rubyspira osteovora*. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw250>
- Baumann, P., Moran, N. A., & Baumann, L. (2006). The evolution and genetics of aphid endosymbionts. *BioScience*, 47(1), 12–20. <https://doi.org/10.2307/1313002>
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1995;289–300.
- Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biol*, 13(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002226>
- Brener-Raffalli, K., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Bonhomme, F., Pralong, M., Aurelle, D., Mitta, G., & Toulza, E. (2018). Thermal regime and host clade, rather than geography, drive *Symbiodinium* and bacterial assemblages in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* sensu lato. *Microbiome*, 6(39), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0423-6>
- Brooks, A. W., Kohl, K. D., Brucker, R. M., van Opstal, E. J., Bordenstein, S. R., & Relman, D. (2016). Phyllosymbiosis: relationships and functional effects of microbial communities across host evolutionary history. *PLoS Biol*, 14(11), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000225>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2013). The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science*, 341(6146), 667–669. <https://doi.org/10.1126/science.1240659>
- Brucker, Robert M., & Bordenstein, S. R. (2011). The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution*, 66(2), 349–362. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x>
- Burns, A. R., Stephens, Z., Stagaman, K., Wong, S., Rawls, J. F., Guillemin, K., & Bohannan, B. J. (2015). Contribution of neutral processes to the assembly of gut microbial communities in

the zebrafish over host development. *The ISME Journal*, 10, 655–664. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.142>

Cáceres MD, Legendre P. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*. 2009;90:3566–3574.

Chandler, J. A., Lang, J. M., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Kopp, A. (2011). Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genetics*, 7(9), e1002272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002272>

Chaston, J. M., Dobson, A. J., Newell, P. D., & Douglas, A. E. (2016). Host genetic control of the microbiota mediates the *Drosophila* nutritional phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 671–679. <https://doi.org/10.1128/AEM.03301-15>

Chiarello, M., Auguet, J. C., Bettarel, Y., Bouvier, C., Claverie, T., Graham, N. A. J., Rieuvilleneuve, F., Sucré, E., Bouvier, T., & Villéger, S. (2018). Skin microbiome of coral reef fish is highly variable and driven by host phylogeny and diet. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0530-4>

Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M. E., Schaeffer, T., Delhaes, L., & Pradeu, T. (2017). Protective microbiota: From localized to long-reaching co-immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(1678). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01678>

Chu, H., & Mazmanian, S. K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat Immunol*, 14(7), 668–675. <https://doi.org/10.1038/ni.2635>

Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M., & Dimopoulos, G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332(6031), 855–858. <https://doi.org/10.1126/science.1201618>

Clerissi, C., de Lorgeril, J., Petton, B., Lucasson, A., Gueguen, Y., Mitta, G., & Toulza, E. (2018). Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/378125>

Coon, K. L., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2016). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molecular Ecology*, 25(22), 5806–5826. <https://doi.org/10.1111/mec.13877>

Davis, J., Fricke, W. F., Hamann, M. T., Esquenazi, E., Dorrestein, P. C., & Hill, R. T. (2013). Characterization of the bacterial community of the chemically defended Hawaiian sacoglossan *Elysia rufescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 7073–7081. <https://doi.org/10.1128/AEM.01568-13>

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.-M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36, 465–469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>

Dereeper, Alexis, Audic, S., Claverie, J.-M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, 10(8), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>

Ducklow, H. W., Boyle, P. J., Mangel, P. W., Strong, C., & Mitchell, R. (1979). Bacterial flora of the schistosome vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), 667–672.

Ducklow, H. W., Clausen, K., & Mitchell, R. (1981). Ecology of bacterial communities in the schistosomiasis vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Microbial Ecology*, 7(3), 253–274. <https://doi.org/10.1007/BF02010308>

Duperron, S., Pottier, M. A., Léger, N., Gaudron, S. M., Puillandre, N., Le Prieur, S., Sigwart, J. D., Ravaux, J., & Zbinden, M. (2012). A tale of two chitons: Is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology*, 83(3), 552–567. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12014>

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2017). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

Franzenburg, S., Walter, J., Künzel, S., Wang, J., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., & Fraune, S. (2013). Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 110(39), E3730–E3738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304960110>

Fraune, S., & Bosch, T. C. G. (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *PNAS*, 104(32), 13146–13151. Retrieved from www.pnas.org/cgi/content/full/

Fraune, S., & Bosch, T. C. G. (2010). Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays*, 32(7), 571–580. <https://doi.org/10.1002/bies.200900192>

Fraune, S., & Zimmer, M. (2008). Host-specificity of environmentally transmitted *Mycoplasma*-like isopod symbionts. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2497–2504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01672.x>

Galinier, R., Roger, E., Moné, Y., Duval, D., Portet, A., Pinaud, S., Chaparro, C., Grunau, C., Genthon, C., Dubois, E., Rognon, A., Arancibia, N., Dejean, B., Théron, A., Gourbal, B., & Mitta, G. (2017). A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005398>

Hahn, M. A., & Dheilly, N. M. (2016). Experimental models to study the role of microbes in host-parasite interactions. *Frontiers in Microbiology*, 7(1300), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01300>

Hotez, P. J., Alvarado, M., Basá, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S. J., Brown, S. A., Buckle, G., Budke, C. M., Halasa, Y. A., Jasrasaria, R., Johns, N. E., Keiser, J., King, C. H., Lozano, R., Murdoch, M. E., O'hanlon, S., Bastien, S., Pion, D. S., Pullan, R. L., Ramaiah, K. D., Roberts, T., Shepard, D. S., Smith, J. L., Stolk, W. A., Undurraga, E. A., Utzinger, J., Wang, M., Murray, C. J. L., & Naghavi, M. (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002865>

- Huang, Z. Bin, Guo, F., Zhao, J., Li, W. D., & Ke, C. H. (2010). Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture Research*, 41(11), e760–e769. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02577.x>
- Hyun, D.-W., Shin, N.-R., Kim, M.-S., Kim, Y., Kim, S., Sei, J. O., Whon, T. W., & Bae, J.-W. (2014). *Cloacibacterium haliotis* sp. nov., isolated from the gut of an abalone, *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 72–77. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054585-0>
- Kelley, S. T., & Dobler, S. (2011). Comparative analysis of microbial diversity in *Longitarsus* flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetica*, 139(5), 541–550. <https://doi.org/10.1007/s10709-010-9498-0>
- King, G. M., Judd, C., Kuske, C. R., & Smith, C. (2012). Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. *PloS One*, 7(12), e51475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051475>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Kohl, K. D., Denise Dearing, M., Bordenstein, S. R., & Author, C. (2018). Microbial communities exhibit host-species distinguishability and phyllosymbiosis along the length of the gastrointestinal tract. *Mol Ecol*, 27(8), 1874–1883. <https://doi.org/10.1111/mec.14460>
- Kohl, K. D., Varner, J., Wilkening, J. L., & Dearing, M. D. (2017). Gut microbial communities of American pikas (*Ochotona princeps*): Evidence for phyllosymbiosis and adaptations to novel diets. *Journal of Animal Ecology*, 87(2), 323–330. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12692>
- Lasa, A., Mira, A., Camelo-Castillo, A., Belda-Ferre, P., & Romalde, J. L. (2016). Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-pyrosequencing. *International Microbiology*, 19, 93–99. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.267>
- Lee, Y. K., & Mazmanian, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science (New York, N.Y.)*, 330(6012), 1768–1773. <https://doi.org/10.1126/science.1195568>
- Li, J. H., Evans, J. D., Li, W. F., Zhao, Y. Z., DeGrandi-Hoffman, G., Huang, S. K., Li, Z. G., Hamilton, M., & Chen, Y. P. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS ONE*, 12(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187505>
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(21), 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R., & Moran, N. A. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15394–15399. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906424106>
- McFall-Ngai, M. J. (2002). Unseen forces: the influence of bacteria on animal development. *Developmental Biology*, 242, 1–14. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2001.0522>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, 8(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- O'Brien, P. A., Webster, N. S., Miller, D. J., & Bourne, D. G. (2019). Host-microbe coevolution: applying evidence from model systems to complex marine invertebrate holobionts. *MBio*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1128/mbio.02241-18>
- Oksanen, J., Blanchet, G. F., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, H. M. H., Szoecs, E., and Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Onchuru, T. O., Martinez, A. J., & Kaltenpoth, M. (2018). The cotton stainer's gut microbiota suppresses infection of a cotransmitted trypanosomatid parasite. *Molecular Ecology*, 27(16), 3408–3419. <https://doi.org/10.1111/mec.14788>
- Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J., & Jiggins, F. M. (2012). Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Molecular Ecology*, 21(20), 5138–5150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05759.x>
- Paniagua Voirol, L. R., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., & Fatouros, N. E. (2018). Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology*, 9(556), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00556>
- Parker, B. J., Mclean, A. H. C., Hrček, J., Gerardo, N. M., Charles, H., & Godfray, J. (2017). Establishment and maintenance of aphid endosymbionts after horizontal transfer is dependent on host genotype. *Biology Letters*, 13, 1–5. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0016>
- Perlman, S. J., Kelly, S. E., & Hunter, M. S. (2008). Population biology of cytoplasmic incompatibility: maintenance and spread of *Cardinium* symbionts in a parasitic wasp. *Genetics*, 178(2), 1003–1011. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.083071>
- 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), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361>

- Pollock, F. J., Mcminds, R., Smith, S., Bourne, D. G., Willis, B. L., Medina, M., Thurber, R. V., & Zaneveld, J. R. (2018). Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. *Nature Communications*, 9(4921). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07275-x>
- 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>
- Portet, A., Toulza, E., Lokmer, A., Huot, C., Duval, D., Galinier, R., & Gourbal, B. (2018). Dysbiosis of the *Biomphalaria glabrata* vector snail microbiota following infection by *Schistosoma* parasites. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/386623>
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>
- Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* (Vol. 62). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98941/pdf/mr001094.pdf>
- Roder, C., Bayer, T., Aranda, M., Kruse, M., & Voolstra, C. R. (2015). Microbiome structure of the fungid coral *Ctenactis echinata* aligns with environmental differences. *Molecular Ecology*, 24(13), 3501–3511. <https://doi.org/10.1111/mec.13251>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Poole, P. S., & Tkacz, A. (2017). Understanding the holobiont: the interdependence of plants and their microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.07.001>
- Sanders, J. G., Powell, S., Kronauer, D. J. C., Vasconcelos, H. L., Frederickson, M. E., & Pierce, N. E. (2014). Stability and phylogenetic correlation in gut microbiota: lessons from ants and apes. *Molecular Ecology*, 23(6), 1268–1283. <https://doi.org/10.1111/mec.12611>
- Saraiva, R. G., Kang, S., Simões, M. L., Angleró-Rodríguez, Y. I., & Dimopoulos, G. (2016). Mosquito gut antiparasitic and antiviral immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.01.015>
- Silva, T. M., Melo, E. S., Lopes, A. C. S., Veras, D. L., Duarte, C. R., Alves, L. C., & Brayner, F. A. (2013). Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 57(1), 19–25. <https://doi.org/10.1111/lam.12068>
- Theron, A., Rognon, A., Gourbal, B., & Mitta, G. (2014). Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: A new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.025>

Trabal, N., Mazón-Suástegui, J. M., Vázquez-Juárez, R., Asencio-Valle, F., Morales-Bojórquez, E., & Romero, J. (2012). Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis*) in different growth phases at two cultivation sites. *Microbial Ecology*, 64, 555–569. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0039-5>

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>

WHO. (2019). Schistosomiasis. Retrieved from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>

Supplementary files

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.03092/full#supplementary-material>

Table S1: OTU table with taxonomic affiliation and read numbers for each sample.

Table S2: Core microbiota by strain/species at the family level (representing at least 0.6% of the total sequence read number by strain). The families highlighted in blue are common to all the strains.

Table S3: OTUs significantly associated with each single host species using indicpecies.

Figure S1: Principal Coordinate Analysis (PCoA) of every individual from each strain in the common garden experiment. Each dot is an individual and each colour a strain. The labels are displayed at the barycentre.

III. Chapitre 2 : Dynamique du microbiote au cours d'une cinétique d'infestation

A. Primo-infection et challenge immunitaire en infestation sympatrique/allopatrique : la réponse du microbiote

La dynamique du microbiote de la souche brésilienne BgBRE a été analysée au cours d'une infestation parasitaire, dans une étude à laquelle je suis associée (Portet *et al.*, 2018). Pour cela, nous avons choisi d'observer les variations des communautés bactériennes dans une interaction sympatrique (souche de parasite du Brésil, SmBRE) et allopatrique (souche de parasite du Venezuela, SmVEN), toutes deux présentant le même profil de forte compatibilité (100% de prévalence). La comparaison de ces deux combinaisons est intéressante car elles engendrent une réponse immunitaire différente : une forte immunosuppression (inhibition de la réponse immunitaire) est induite lors d'une infestation sympatrique, alors que le parasite allopatrique engendre une réponse inefficace (Portet *et al.*, 2019). Après un premier contact entre les mollusques et les parasites (primo-infestation), nous avons testé les effets sur le microbiote d'une réponse, cette fois, exclusivement humorale. Pour cela, nous avons mis les individus primo-infestés à nouveau en contact avec des parasites (challenge immunitaire), cette fois uniquement avec la souche sympatrique de parasite (Portet *et al.*, 2018). Dans le cas d'une réinfestation, la réponse immunitaire induite a été démontrée comme étant humorale, que l'infestation soit homologue (même souche utilisé pour la première et la seconde infestation) ou hétérologue (souche différente que pour la première infestation) (Pinaud *et al.*, 2016; Portet *et al.*, 2019).

Lorsqu'une réponse immunitaire est induite, le niveau basal de l'immunité des mollusques est modifié. Or, si l'hypothèse de Hooper est exacte et que l'immunité de l'hôte maintient l'homéostasie du microbiote (Hooper *et al.*, 2012), alors ce dernier sera perturbé, les communautés à l'état naïf seront différentes en condition d'infestation. Lors de l'immunosuppression, engendrée par l'infestation de la souche sympatrique, le niveau basal de l'immunité de l'hôte est, là aussi, modifié. Les communautés bactériennes seront alors modifiées, dans le cas d'un contrôle de l'homéostasie par l'hôte.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que le microbiote était affecté par les différents types d'infestation. Cependant, la primo-infestation et le challenge induisent

des dysbioses différentes, qui reflètent des réponses immunitaires différentes (immunosuppression/réponse cellulaire vs réponse humorale). Selon de précédents travaux, les deux types de challenge (homologue et hétérologue) induisent tous deux une réponse humorale similaire (Pinaud *et al.*, 2016; Portet *et al.*, 2019), et justement, l'étude concernant la dynamique du microbiote au cours d'une infestation a souligné des changements identiques de composition microbienne quel que soit le type de challenge (Portet *et al.*, 2018). Nous avons également remarqué une résilience du microbiote 25 jours après l'infestation, à l'exception de certains phyla. En effet, les Verrucomicrobia étaient toujours plus abondants 25 jours post-infestation, en comparaison avec les naïfs. Ce phylum a été récemment décrit comme ayant des propriétés anti-inflammatoire et immuno-stimulatrices (Fujio-Vejar *et al.*, 2017). Nous avons donc émis l'hypothèse que leur forte abondance pourrait être liée à la restauration du microbiote (Portet *et al.*, 2018). Vingt-cinq jours après l'infestation, la réponse est terminée et l'immunité revient à l'état basal. Cette résilience du microbiote coïncide justement avec ce retour à l'état basal, ce qui suggère fortement que son homéostasie est bel et bien contrôlée par l'hôte. La modification du niveau immunitaire basal et ses conséquences sur le maintien de l'homéostasie du microbiote pourraient également engendrer des conséquences sur l'homéostasie de l'hôte et sa fitness (Contijoch *et al.*, 2019; Warne *et al.*, 2019).

Le niveau d'expression de gènes codants pour des protéines et peptides antimicrobiens a été analysé, afin de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la dysbiose observée. Seule la famille des Biomphamacines semble potentiellement liée à la réponse du microbiote face à une infestation. Si l'on considère comme vraie l'hypothèse du maintien de l'homéostasie par l'hôte, alors ces AMP pourraient justement jouer un rôle dans ce maintien, et c'est la variation dans leur niveau d'expression qui induirait la dysbiose. Par ailleurs, le contrôle de l'homéostasie du microbiote par des AMP a déjà été démontré dans différents modèles, dont notamment les hydres sécrétant des arminines (Franzenburg *et al.*, 2013). Cependant, il est probable que d'autres gènes et processus immunitaires sont impliqués dans cette homéostasie, une étude plus approfondie des variations du niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'immunité est donc nécessaire. Nous avons justement à disposition des transcriptomes qui vont nous permettre d'approfondir l'analyse des profils d'expression de différents gènes candidats impliqués dans la réponse immunitaire.

Cette étude a ouvert la voie à la description de la dynamique du microbiote bactérien au cours d'une cinétique d'infestation, dans des combinaisons sympatriques et allopatriques. En revanche, il n'existe, à notre connaissance, encore aucun travail ayant

décrit cette dynamique en comparant des combinaisons hôte/parasite présentant différents niveaux de compatibilité. L'un des axes de ma thèse a donc consisté à étudier la réponse du microbiote dans ce contexte, afin d'analyser l'impact des infestations parasitaires plus ou moins compatibles, et d'ouvrir de nouvelles perspectives concernant le lien entre le microbiote et le phénotype de compatibilité entre *B. glabrata* et son parasite au travers de la réponse immunitaire.

B. Combinaisons sympatrique/allopatriques et compatibilité : les effets sur le microbiote

Pour cet axe, je me suis intéressée à la même problématique que l'étude précédente, en faisant cette fois varier les souches de mollusques et de parasites, de sorte à analyser la dynamique du microbiote dans plusieurs combinaisons sympatriques/allopatriques, aux profils de compatibilité contrastés. La mise en regard des résultats obtenus avec les différentes réponses immunitaires (immunosuppression pour sympatriques ; prolifération cellulaires pour allopatriques) induites permettra une meilleure compréhension du rôle de l'hôte sur le maintien de l'homéostasie du microbiote. L'analyse des résultats permettra d'aborder le lien entre le microbiote et la compatibilité des combinaisons.

1. Plan d'expérimentation

a) Infestation et échantillonnage

Trois souches de mollusques ont été choisies pour l'étude de la dynamique du microbiote :

- La souche BgBRE (Recife, Brésil, par A. Théron, 1975) permettant une comparaison avec les travaux précédents (Portet *et al.*, 2018),
- La souche BgBAR (Belo Horizonte, Brésil, par G. Oliveira, 2013)) dont les profils de compatibilités avec les différentes souches de parasite sont plus restreints que la précédente,
- La souche BgBS90 (Salvador, Brazil 1960) qui a été expérimentalement sélectionnée, dont le phénotype de compatibilité est encore plus restreint que BgBAR et dont le microbiote naïf diffère de celui des autres souches de *B. glabrata*, d'après les résultats obtenus dans la première partie.

En tout, 560 individus par souches, de diamètre compris entre 5 et 7 mm, ont été maintenus en bacs contenant de l'eau de forage. Ces 560 individus par souche ont été séparés en quatre groupes pour les souches BgBRE et BgBAR : 140 ont été infestés avec 10 larves des souches SmBRE, SmLE (souches de parasites respectivement sympatriques des

mollusques), et SmGH2. Les 140 restants ont été gardés naïfs comme contrôles négatifs. Les individus de BgBS90 ont été, eux, séparés en trois groupes : 140 ont été infestés avec la souche SmBRE et 280 avec la souche SmLE car la compatibilité de cette combinaison est de 50%, nous nous sommes donc assurés d'avoir un échantillonnage d'individus infestés équivalent pour toutes les souches. Nous ne disposons pas de parasites considérés comme sympatriques à la souche BgBS90. Ces différentes souches présentent un profil théorique de compatibilité différent (voir Figure 7, I. B.), nous permettant ainsi d'étudier la dynamique du microbiote au cours d'une cinétique d'infestation dans des combinaisons sympatriques/allopatriques et compatibles/incompatibles.

Pour cela, les mollusques ont été placés individuellement dans des piluliers, en présence des parasites pendant 24h, puis placés dans des bacs séparés par condition. Avant chaque point de prélèvement, ils ont été mis à jeun 48h par retrait de la salade et changement de l'eau des bacs, puis, une fois les échantillons prélevés, les individus restant étaient nourris.

Le jour de l'infestation, 12 individus naïfs ont été prélevés pour chaque souche de mollusques, en nettoyant la coquille au préalable avec un coton-tige imbibé d'eau de Javel, en les retirant de la coquille et en les congelant individuellement dans de l'azote liquide puis en les conservant à -80°C jusqu'à extraction. L'échantillonnage s'est ensuite fait sur six points de cinétique : 24h, 48h, 96h, 7 jours, 15 jours et 25 jours post infestation. A chaque fois, 12 individus contrôles par souche ont été prélevés ainsi que 14 individus de chaque combinaison hôte/parasite. De même, à chaque point de prélèvement, 500mL de l'eau des bacs ont été prélevés (complétés après prélèvement par 500mL d'eau de forage) puis filtrés à 45, 10, 0.8 et 0.2µm. L'ADN des échantillons a ensuite été extrait selon le protocole de de Lorgeril *et al.* (*in prep.*).

b) Statut d'infestation des mollusques

Afin de vérifier la prévalence des différentes combinaisons, les individus restant après le dernier point d'échantillonnage ont été maintenus jusqu'à émission cercarienne (40 jours post-infestation). Les individus ont alors été placés individuellement dans des piluliers sous la lumière chauffante pour que les larves cercaires émergent de la coquille. Les prévalences obtenues ont été comparées aux théoriques (Galinié *et al.*, 2017a ; Théron *et al.*, 2014).

c) Extraction d'ADN 16S et séquençage

L'ADN a été extrait avec le kit d'extracton Nucleospin® tissue (Macherey-Nagel) puis quantifié par photofluorescence (Epoch®) pour vérifier sa pureté et son rendement.

Pour tous les échantillons, des bibliothèques du gène 16S rRNA (régions V3-V4) (Klindworth *et al.*, 2013) ont été générées en utilisant les amorces PCR 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') et 805R (3'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-5') selon la procédure en deux étapes standard d'Illumina. Les bibliothèques ont été séquencées en "paired-ends" avec une longueur de read de 250 pb, sur deux différentes flow cells en utilisant le système MiSeq (Illumina) de la plateforme GenSeq, à l'Université des Sciences de Montpellier.

d) *Analyses des séquences 16S*

La pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) implémentée à galaxy (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr/galaxy/>) a été utilisée pour le traitement des données (Escudié *et al.*, 2017). En bref, les reads en "paired-ends" ont été assemblés avec FLASH (Magoč & Salzberg, 2011), puis, après le débruitage et le retrait des amorces et des adaptateurs avec CUTADAPT (M. Martin, 2011), un clustering *de novo* a été fait avec SWARM, qui utilise un seuil local de clustering avec une distance d'agrégation de $d = 3$ après le débruitage (Mahé *et al.*, 2014). Les chimères ont été retirées avec VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016) puis le jeu de données a été filtré pour retirer les singletons. Une affiliation a alors été faite avec Blast+ en utilisant la base de données Silva (version 128, Septembre 2016) pour les amplicons du gène 16S rRNA. Enfin, des tables d'OTUs ont été produites au format BIOM pour la suite des analyses.

Les packages phyloseq 1.24.2 (Mcmurdie & Holmes, 2013) et vegan 2.5-4 (Oksanen *et al.*, 2019) avec RStudio (R Core Team (2017)). Les séquences non-bactériennes ainsi que les singletons ont été éliminés du jeu de données. Les données ont ensuite été raréfiées (au nombre de reads minimum pour chaque condition comparée), puis les dissimilarités de beta-diversité ont été caractérisées en faisant des PCoA (Analyses en Coordonnées Principales) et des Clustering Hiérarchiques sur la matrice de distance de Bray-Curtis (allant de 0 pour les individus aux communautés identiques à 1 pour ceux dont les communautés sont différentes).

e) *Analyses statistiques*

La dynamique des communautés bactériennes entre les différentes conditions a été déterminée grâce aux matrices de dissimilarité, en utilisant des PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis Of Variance) avec 999 permutations. Pour toutes les analyses, le niveau de significativité a été placé à 0,05.

2. Résultats

a) Prévalences et choix des combinaisons

Afin de nous assurer du statut d'infestation de nos échantillons, et étant donné que l'élevage a été renouvelé il y a quelques temps, nous avons maintenu des individus de chaque condition jusqu'à émission cercarienne, soit 40 jours après infestation. Les pourcentages d'individus infestés ont alors été calculés et reportés dans le tableau 3.

Les résultats ont révélé des différences entre prévalence attendue et prévalence observée, (Theron *et al.*, 2014). En effet, bien que certaines prévalences restent équivalentes à celles attendues (comme les combinaisons BgBRE/SmBRE ou BgBS90/SmBRE), certaines sont complètement différentes. C'est le cas de la combinaison entre les mollusques BgBAR et les parasites SmBRE, combinaison très incompatible à l'origine qui, à présent, est compatible à 57,5%. De même, la seule souche de parasite (SmLE) qui arrivait à s'établir dans la moitié des individus de BgBS90 a aujourd'hui une compatibilité de moins de 15% (Tableau 3). Ces deux combinaisons au phénotype de compatibilité très différent de celui attendu, et dont la détermination du statut d'infestation sera très compliquée, ont donc été exclues des analyses.

Ces différences peuvent être liées au fait que les attendues ont été calculées selon des infestations à 20 miracidia alors que les observées ont été calculées avec 10. Cependant, on pourrait s'attendre à ce que toutes les prévalences soient, dans ce cas, plus faibles chez les observées, ce qui n'est pas le cas, notamment dans la combinaison BgBAR/SmBRE. Il se peut donc que les souches de mollusques de remplacement, lors du renouvellement de l'élevage, aient des profils de compatibilité différents et qu'il soit nécessaire de les déterminer les profils de compatibilité de chaque combinaison du laboratoire.

Tableau 3 : Comparaison des prévalences attendues et observées dans des combinaisons hôte/parasite différentes (la souche de parasite sympatrique de la souche de mollusque est indiquée en gras)

Souche mollusque	Souche parasite	% infestés attendus	% infestés observés
BgBRE	SmBRE	100%	95%
	SmLE	100%	100%
	SmGH2	5%	0%

BgBAR	SmBRE	10%	57,5%
	SmLE	100%	87%
	SmGH2	0%	5,6%
BS90	SmBRE	0%	0%
	SmLE	53%	14,7%

b) Dynamique du microbiote

La comparaison de la composition du microbiote à l'état naïf a révélé des différences entre les souches de mollusques, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus dans le premier axe (voir II. C. 2.). En effet, la PCoA d'après l'indice de Bray-Curtis montre que chaque souche est séparée des autres (Figure 12), suggérant une spécificité du microbiote allant jusqu'à la souche de *B. glabrata*.

les individus de chaque souche sont séparés des autres d'après le

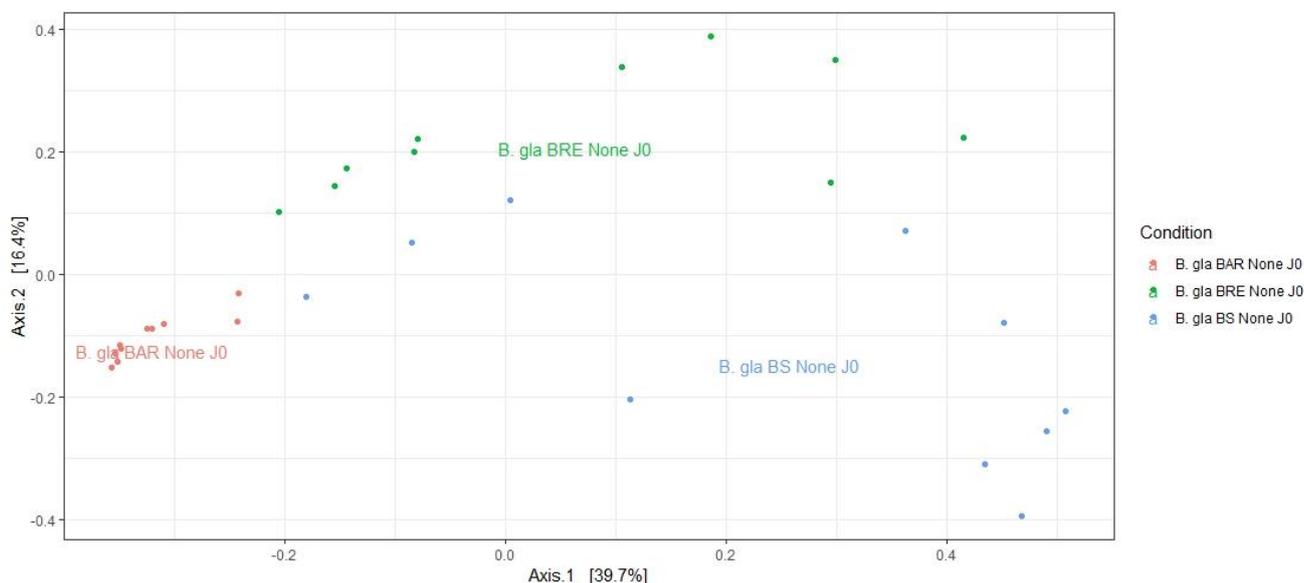


Figure 12 : Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis pour la composition du microbiote bactérien à l'état naïf. Chaque point est un individu, chaque couleur une souche. Les noms sont placés au niveau du barycentre.

L'analyse de la dynamique du microbiote au cours de la cinétique d'infestation, pour chaque souche a mis plusieurs choses en avant. Tout d'abord, concernant les souches BgBAR et BgBRE, une forte dysbiose est observée aux temps précoces après l'infestation

(24-48h) (Figure 13). La composition du microbiote est alors drastiquement modifiée en comparaison à celui des individus naïfs.

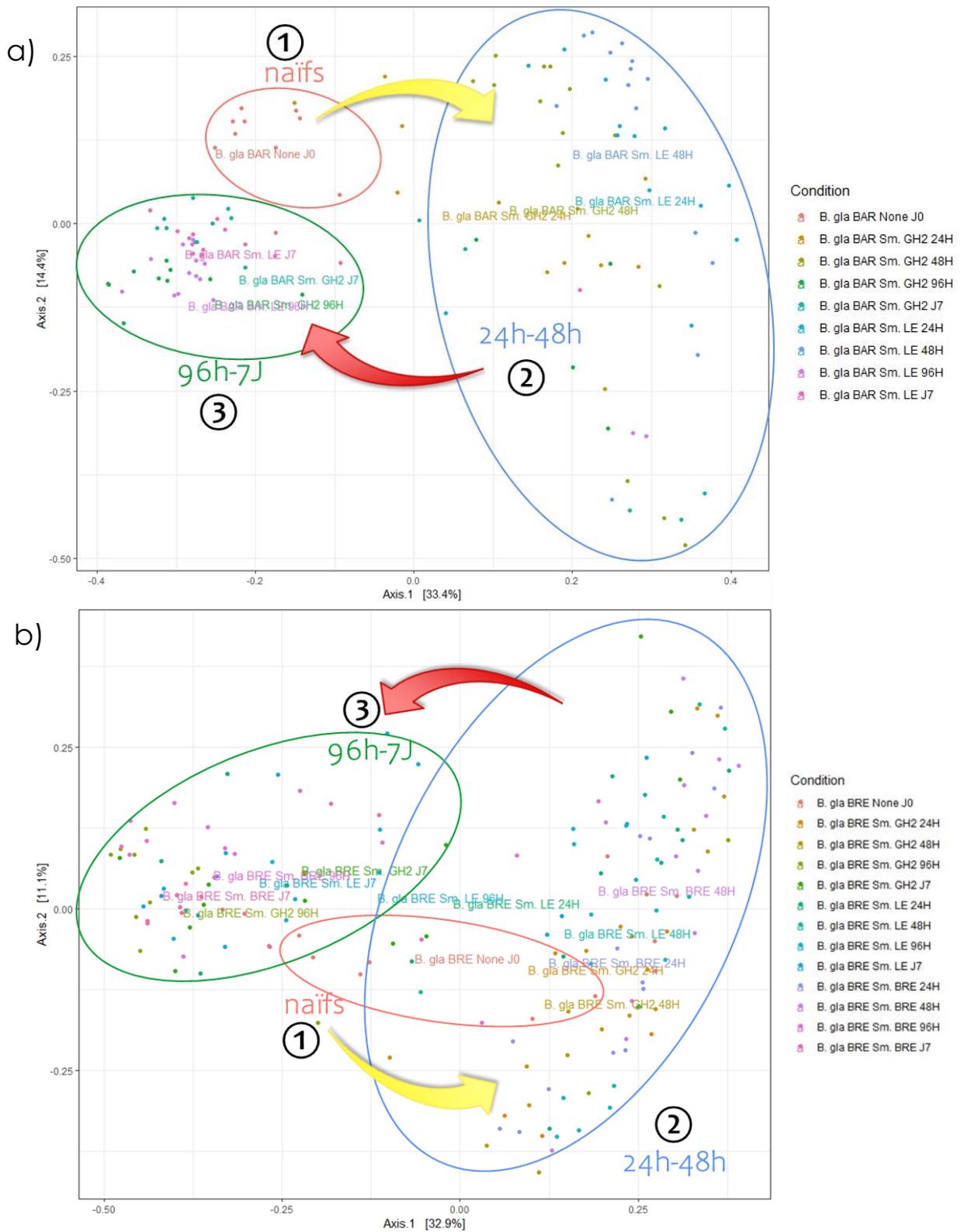


Figure 13 : Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis pour la composition du microbiote bactérien au cours d'une dynamique d'infestation chez a) BgBAR et b) BgBRE, infestées par plusieurs souches de parasites.

Aux temps intermédiaires, entre 96 heures et sept jours, le microbiote est à nouveau modifié pour revenir à une composition proche de celle à l'état naïf. Cet état de « résilience » se rapproche de celui qui a été observé dans l'étude précédente, bien qu'il soit plus précoce (Portet *et al.*, 2018). Ces modifications de la composition du microbiote se produisent quelle que soit le parasite utilisé pour l'infestation : il n'y a pas d'effet souche (Figure 13).

En ce qui concerne la souche BgBS90, les résultats sont très différents. Aucun patron n'a pu être observé avec aucune séparation claire entre les différents pas de temps ou entre les individus naïfs et les individus infestés (Figure 14).

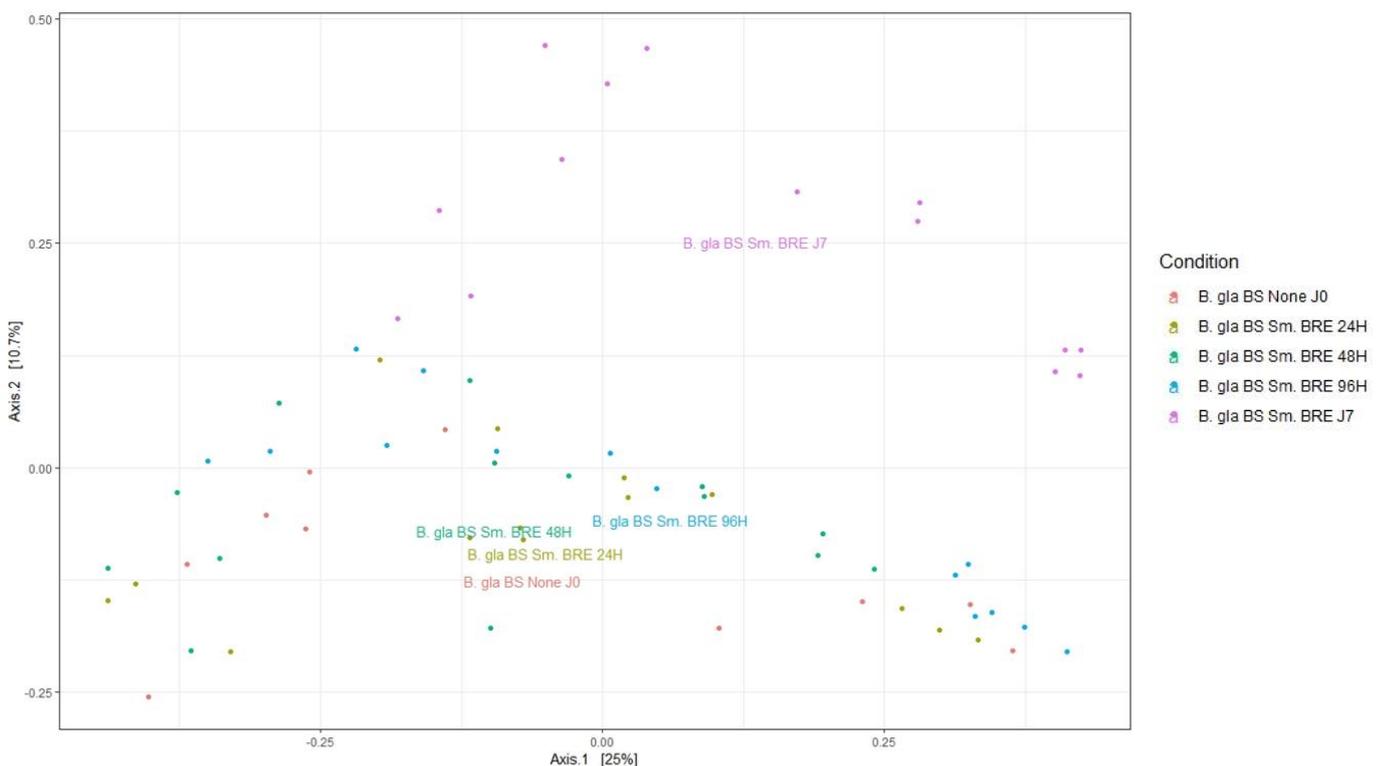


Figure 14 : Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis pour la composition du microbiote bactérien au cours d'une dynamique d'infestation chez BgBS90, infestée par SmBRE.

Ces résultats sont intéressants, sachant que la souche BgBS90 est particulière puisque c'est celle qui présente le profil le plus incompatible, quelle que soit la souche de parasite avec laquelle elle est infestée. Lorsque l'on s'intéresse à la composition relative du microbiote des différentes souches, on s'aperçoit que la famille des Proteobacteria, qui représente moins de 50% à l'état naïf, prolifère aux temps précoces post-infestation (24-48h), correspondant à la dysbiose observée (Figure 15 a) et b)). La proportion de ce phylum bactérien revient ensuite à environ 50% du microbiote total, ce qui s'accorde avec l'état de « résilience » observée sur la PCoA.

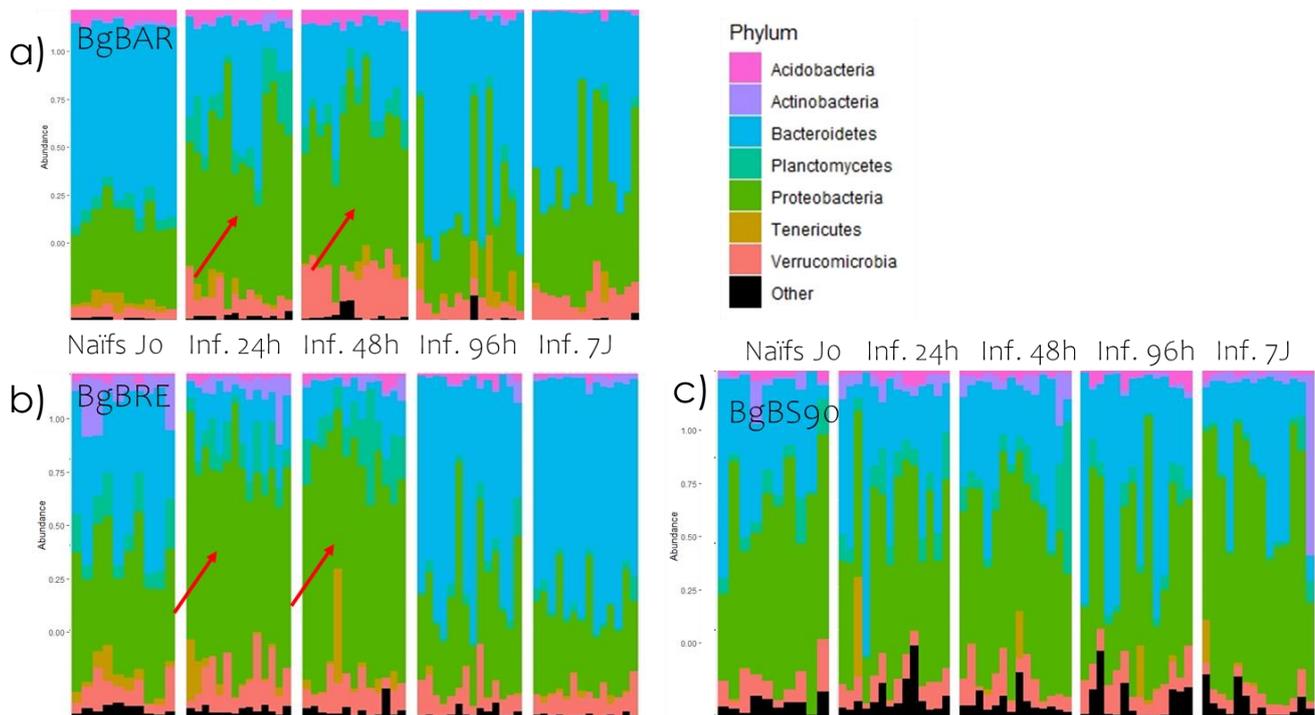


Figure 15 : Composition relative des huit phyla dominants dans les trois souches de mollusques a) BgBAR, b) BgBRE et c) BgBS90, au cours de la cinétique d'infestation. Chaque couleur correspond à un phylum, chaque barre correspond à un individu.

Concernant la souche BgBS90, la proportion de Proteobacteria à l'état naïf est plus élevée que celui des deux autres souches, allant jusqu'à environ 75% de la charge bactérienne totale (Figure 15 c)). Ces proportions sont conservées au cours de la cinétique d'infestation, aux temps précoces et intermédiaires, ce qui est cohérent avec l'absence de séparation des individus par conditions sur la PCoA. Il est envisageable que des familles bactériennes appartenant à ce phylum soit impliquées dans la résistance anti-schistosome. Ceci justifierait que la souche la plus incompatible en présente une proportion élevée dès l'état naïf, qui ne varie donc pas en conditions d'infestation. De plus, la prolifération des Proteobacteria au temps précoces de l'infestation chez BgBRE et BgBAR, soit au moment où la réponse immunitaire est à son paroxysme, pourrait corroborer l'hypothèse de leur implication dans cette réponse immunitaire. Le pic de la réponse immunitaire aux temps précoces pourrait également justifier la dysbiose observée chez BgBAR et BgBRE. En effet, si l'on considère la théorie de Hooper selon laquelle le système immunitaire applique une pression constante sur le microbiote (Hooper *et al.*, 2012), la mise en place de la réponse anti-schistosome modifierait l'homéostasie. La pression appliquée sur le microbiote serait alors modifiée, permettant la prolifération de certains taxa. Le retour à un niveau basal de l'immunité correspondrait alors à la « résilience » du microbiote aux temps intermédiaires. Ceci pourrait correspondre aux schémas de la

composition du microbiote observé chez BgBAR et BgBRE. Concernant BgBS90 qui ne suit pas le même schéma, il est envisageable que la réponse immunitaire mise en place soit moins forte mais plus efficace, ou plus spécifique aux parasites, ce qui expliquerait l'absence de modification drastique de la composition bactérienne au cours de la cinétique d'infestation. Un suivi de l'expression de gènes immunitaires cibles de chaque souche au cours de la cinétique permettrait d'approfondir ce postulat. L'hypothèse de départ de ma thèse étant que le microbiote jouait un rôle dans le phénotype de compatibilité, je me suis focalisée sur ce lien. Afin de l'éclaircir, j'ai participé à une étude menée par David Duval sur la comparaison de la composition bactérienne entre des sous-populations de mollusques sélectionnées pour un phénotype de compatibilité donné.

C. Sélection de phénotype de compatibilité : les effets sur le microbiote

Pour cette étude, deux sous-populations de mollusques, appartenant à la souche BgBAR ont été sélectionnées pour être soit très sensible à l'infestation à SmVEN (95%) soit très résistante (environ 12%). Ces deux populations ont donc une origine commune mais des capacités immunitaires différentes. L'objectif de cette étude était de déterminer si le microbiote était spécifique au profil de compatibilité malgré un fonds génétique commun.

Des individus de la souche BgBAR, non matures sexuellement ont, tout d'abord, été individuellement isolés et considérés comme la génération parentale (P). Ces individus se sont alors reproduits par autofécondation, produisant des individus G1. Ceux-ci ont ensuite été infestés par la souche vénézuélienne de *S. mansoni*, SmVEN. Leur statut d'infestation a été vérifié à la loupe binoculaire (présence/absence de sporocystes) puis des bacs regroupant les individus résistants d'un côté et sensibles de l'autre ont été mis en place. Les mollusques ont alors pu se reproduire par allofécondation, permettant un brassage génétique. Les descendants non matures de la G1, les individus G2, ont alors été isolés comme précédemment, et ainsi de suite jusqu'à la génération G5. Tous les individus de cette génération ont alors été mis en bac commun, quel que soit le phénotype de compatibilité sur lequel ils ont été sélectionnés. Près d'un an et demi après la dernière étape de sélection, la compatibilité de tous les individus a été vérifiée et les résultats ont révélé que les phénotypes résistants et sensibles étaient stables dans le temps. Les premiers présentaient une compatibilité d'environ 12% et les autres de près de 95%. Ainsi, malgré un fonds génétique commun, une sélection a pu être faite sur des capacités immunitaires différentes face au même parasite.

Au cours de ma thèse, j'ai effectué une expérience de Jardin Commun au cours de laquelle des individus naïfs de la population d'origine BgBAR, de la sous-population sensible et de la sous-population résistante ont été mis dans un bac d'élevage commun, séparés par des paniers. Des individus sensibles et résistants, cette fois infestés par la souche SmVEN des parasites ont également été ajoutés. L'expérience a été maintenue 96h après l'infestation, puis les individus ont été échantillonnés, leur ADN extrait et leur microbiote analysé.

Le premier résultat intéressant a été de constater que la composition du microbiote à l'état naïf variait d'une population à une autre (Figure 16).

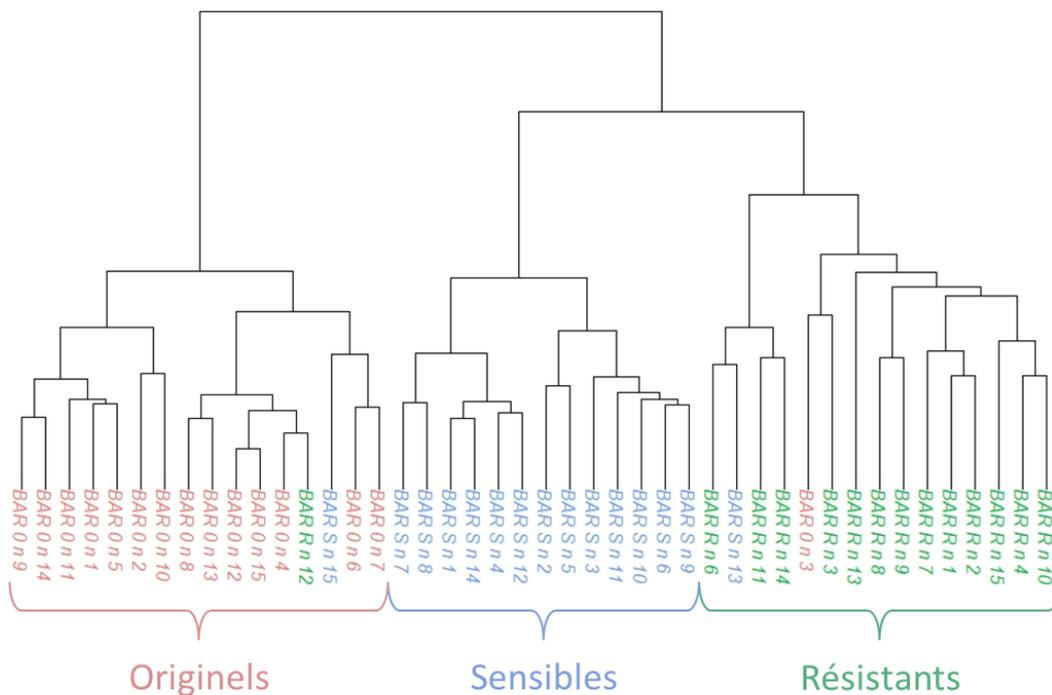


Figure 16 : Clustering hiérarchique basé sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis pour la composition du microbiote bactérien de la souche BgBAR d'origine (rouge), la population sensible (bleu) et la population résistante (vert).

Les individus des trois populations sont, en effet, parfaitement séparés selon leur composition bactérienne, montrant une spécificité de microbiote en fonction des capacités immunitaires de leur hôte.

La comparaison de la composition du microbiote des individus naïfs et infestés de la population résistante n'a, en revanche, montré aucune différence 96h après l'infestation (Figure 17 a)). Une tendance à la spécificité du microbiote selon le statut d'infestation est observable dans la population sensible (Figure 17 b)).

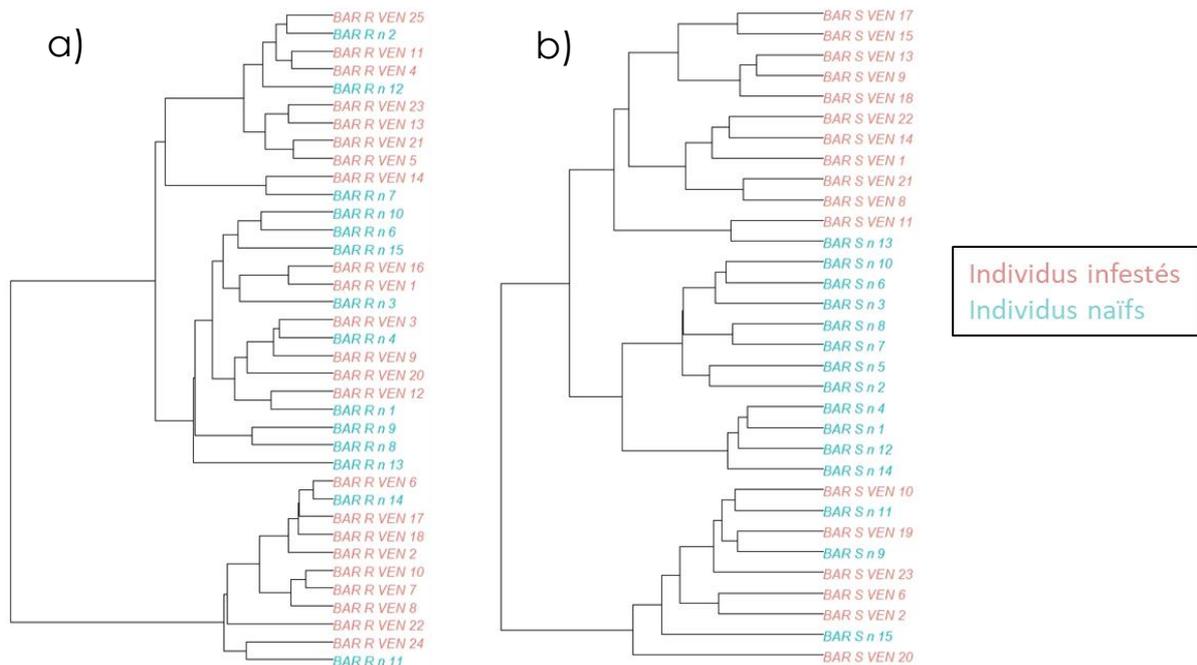


Figure 17 : Clustering hiérarchique basé sur la matrice de dissimilarité de Bray-Curtis pour la composition du microbiote bactérien de les populations a) résistante et b) sensible en condition naïve (bleu) et infestée (rouge).

Il semble donc que la sélection des individus sur leurs capacités immunitaires ait impactée le microbiote. En revanche, l'effet du statut d'infestation sur la composition bactérienne reste à éclaircir. Il est possible que tous les individus d'une population ne présentent pas le même phénotype, ce qui pourrait expliquer ces résultats non tranchés.

Ces résultats préliminaires mériteraient d'être approfondis afin d'explorer plus précisément le lien entre composition du microbiote et capacités immunitaires. Pour cela, une analyse menée sur le core microbiote, soit la portion la plus stable du microbiote pourrait être plus informative. De même, cette expérience serait intéressante à répéter sur des temps plus précoces post-infestation, étant donné les résultats précédents, démontrant que la dysbiose chez BgBAR se produisait entre 24 et 48h après contact avec le parasite (voir III. B. 2. b)). D'autres populations sensibles et résistantes pourraient également être sélectionnées à partir d'une souche d'origine au phénotype différent de BgBAR, comme la souche BgGUA, naturellement très compatible ou la souche BgBS90, très incompatible. Un lien potentiel entre la composition du microbiote et les capacités immunitaires de l'hôte a tout de même été mis en avant, grâce aux différences observées entre les phénotypes.

D. Conclusion

Les résultats des différentes études menées dans cet axe montrent qu'une dysbiose se produit au cours d'une cinétique d'infestation. Elle semble correspondre aux différentes

étapes de la réponse immunitaire de l'hôte : une réponse précoce très forte, qui correspond à un changement drastique dans la composition bactérienne, puis un retour progressif à l'état basal, correspondant à l'état de « résilience » du microbiote.

Selon qu'il s'agit d'une première infestation ou d'un challenge immunitaire, le microbiote n'est pas modifié de la même manière, ce qui se justifie par un type de réponse immunitaire différent dans les deux cas : une réponse majoritairement cellulaire est mise en place lors d'une primo-infestation alors qu'elle est principalement humorale lors d'un challenge (Pinaud *et al.*, 2016). Malgré une réponse immunitaire différente entre souche sympatrique et allopatrique (Portet *et al.*, 2019), les travaux auxquels j'ai participé au début de ma thèse (voir II. C. 1.) ainsi que ceux que j'ai mené pour le deuxième axe (voir III. B.) ont démontré que l'effet de la souche de parasite est moindre. En revanche, un fort effet du temps post-infestation sur la composition du microbiote a été souligné dans les deux études.

La souche BgBS90, connue pour sa très forte incompatibilité à toutes les souches de parasites, quant à elle, semble suivre un schéma différent, aucune différence claire n'ayant été mise en avant entre les individus naïfs et infestés. Les caractéristiques atypiques de cette souche justifieraient un approfondissement de la compréhension des mécanismes immunitaires qu'elle met en place par un suivi de l'expression de gènes immunitaires cibles par RNAseq.

Les résultats des travaux menés sur le microbiote de populations sensibles et résistantes raffermissent l'hypothèse d'un lien entre capacités immunitaires et composition bactériennes. Cependant, la compréhension de ce lien, et plus précisément du rôle potentiel du microbiote dans la réponse immunitaire anti-parasite des mollusques reste à creuser. C'est à l'approfondissement de cette question que j'ai donc consacré la dernière partie de ma thèse.

IV. Chapitre 3 : Exploration du lien de cause à effet entre microbiote et compatibilité

A. Introduction

Le dernier axe, et objectif principal de ma thèse, se focalise sur la compréhension du lien entre le microbiote des mollusques et l'interaction de ces derniers avec le parasite, notamment du point de vue de l'immunité. L'étude de l'effet de la perturbation du microbiote par des traitements antibiotiques sur la compatibilité d'une combinaison hôte/parasite pourrait mettre un tel lien en évidence.

L'impact du microbiote sur l'immunité de son hôte et les interactions hôte/parasite a déjà été démontré dans de nombreux modèles (voir I.E.2.). Si c'est également le cas pour notre modèle, l'interaction entre *B. glabrata* et *S. mansoni*, une perturbation du microbiote devrait induire des changements dans la compatibilité des combinaisons hôte/parasite de cette interaction. Il existe plusieurs méthodes pour perturber le microbiote. Par exemple, dans certains modèles, il est possible de créer des individus axéniques que l'on peut ensuite coloniser avec une flore choisie : c'est le cas des drosophiles pour qui la déchoronisation des œufs (retrait de la pellicule superficielle des œufs, le chorion) permet l'élimination des microorganismes transmis par la mère (technique développée par Koyle et ses collaborateurs en 2016 (Koyle *et al.*, 2016).

La façon la plus courante de perturber le microbiote bactérien, en limitant les effets délétères sur l'hôte, reste l'utilisation de traitements antibiotiques. L'interprétation des résultats obtenus suite à des cures d'antibiotiques doit être prudente, car la perturbation du microbiote peut avoir des conséquences directes sur la *fitness* de l'hôte, que ce soient des conséquences à court terme et réversibles ou des conséquences définitives. Par ailleurs, l'utilisation d'antibiotiques est souvent utilisée pour la mise en lumière d'un tel rôle du microbiote (voir I. D. et E. 2.)

C'est ainsi que l'impact des communautés bactériennes sur le taux de fécondité des reines de deux espèces de termites (*Zootermopsis angusticollis* et *Reticulitermes flavipes*), et celui sur la vitesse de croissance des colonies ont pu être mis en évidence (Rosengaus *et al.*, 2011). Cette étude a également révélé que le traitement à la rifampicine perturbait définitivement le microbiote intestinal des animaux, réduisant la diversité des microorganismes présents ainsi que leur *fitness* à long terme avec une réduction de leurs capacités reproductives. Ces deux conséquences semblent liées étant donné que les auteurs ont remarqué le développement de microorganismes pathogènes opportunistes

qui occupaient la niche, limitant les capacités de l'hôte à rétablir sa flore initiale (Rosengaus *et al.*, 2011). La fécondité a également été diminuée chez les tiques, *Rhipicephalus haemaphysaloides*, en présence de kanamycine ou de tétracycline, deux antibiotiques qui réduisent notamment la densité d'endosymbiotes du genre *Coxiella*, indiquant le lien entre ceux-ci et les capacités reproductrices de l'hôte (Li *et al.*, 2018). Un cocktail de gentamicine, streptomycine et pénicilline améliore le développement de *Plasmodium berghei* chez *Anopheles stephensi* (Kalappa *et al.*, 2018). La capacité des cafards, *Blattella germanica* à détoxifier les polluants, tels que des insecticides a été attribuée à son microbiote, grâce à la dysbiose induite par la doxycycline (Pietri *et al.*, 2018) Les traitements à la ciprofloxacine et au sulfamide réduisent fortement la richesse du microbiote bactérien de la crevette blanche du Pacifique (*Litopenaeus vannamei*), avec pour conséquence une diminution de fonctions métaboliques et cellulaires, soulignant l'importance du microbiote dans ces fonctions (Zeng *et al.*, 2019). L'inoculation de pénicilline et de streptomycine à des abeilles réduit leur capacité à se défendre contre les parasites du genre *Nosema*, suite à l'élimination du microbiote (Li *et al.*, 2017)

De récents travaux ont analysé les effets des différents traitements (cocktail pénicilline/streptomycine, pénicilline, streptomycine, gentamicine et ampicilline), inoculés à différentes doses, sur les mollusques *B. glabrata*, afin d'étudier les potentiels effets délétères sur leur *fitness* (Allan & Blouin, 2017). Cette étude s'est concentrée sur des observations comportementales, telles que le taux de déplacement, les comportements reproductifs et d'alimentation des escargots. Selon leurs conclusions, l'ampicilline n'affecte aucunement l'écologie de l'hôte, alors que la streptomycine et la pénicilline semblent réduire l'activité des mollusques, mais ce, de manière temporaire, leur activité normale étant rétablie environ 72h après arrêt des traitements. En revanche, aucune information concernant la composition des communautés bactériennes avant ou après ces traitements n'était disponible. Cette étude nous a néanmoins servi de base pour analyser l'effet de la perturbation du microbiote, en nous procurant des éléments sur les effets de certains traitements antibiotiques sur la *fitness* des mollusques.

La compréhension des mécanismes sous-jacents au phénotype de compatibilité entre les parasites du genre *Schistosoma* et ses hôtes intermédiaire est au cœur de la compréhension de cette interaction. De nombreuses études ont eu pour objectif de décrypter ces mécanismes, cependant, il se sont avérés d'une grande complexité, mettant en jeu de nombreux facteurs (génétiques, moléculaires, épigénétiques...) (Bouchut *et al.*, 2008; Coustau *et al.*, 2015; Mitta *et al.* 2017). Cette diversité de facteurs ainsi que les nombreuses études ayant révélé un impact du microbiote sur la protection

antipathogènes et antiparasites (voir I. E. 2.) nous ont permis d'émettre l'hypothèse que le microbiote de notre modèle pouvait également jouer un rôle dans l'interaction avec le parasite. De plus, nous avons observé un lien entre microbiote et l'immunité de l'hôte lors des travaux sur sa dynamique au cours d'une infestation (Portet *et al.*, 2018). Cependant, la causalité reste à établir. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons commencé par étudier ce rôle dans une seule souche de mollusques, la souche brésilienne BgBAR. Cette souche présente un profil de compatibilité variable, très compatible avec sa souche sympatrique (très forte immunosuppression) (Portet *et al.*, 2019), très peu avec certaines souches allopatriques (réponse immunitaire efficace). Pour vérifier une éventuelle causalité de la perturbation du microbiote sur l'immunité des hôtes, nous avons induit une dysbiose par des traitements antibiotiques. Ensuite, nous avons infesté ces mollusques avec leurs parasites sympatriques ou avec deux souches allopatriques. Le phénotype de compatibilité a alors été analysé par la détermination de la prévalence et de l'intensité de l'infestation.

B. Plan expérimental

1. Matériel biologique

Une souche de *B. glabrata* originaire du Brésil, BgBAR a été utilisée dans le cadre de cette étude, la taille des individus étant comprise entre sept et neuf millimètres, taille à laquelle ils peuvent être infestés par les parasites. Trois souches de *S. mansoni* ont été utilisées dans le cadre des infestations, aux profils de compatibilité vis-à-vis des mollusques, déterminés au cours de l'expérience de dynamique du microbiote, contrastés : la souche sympatrique de BgBAR, SmLE présente une compatibilité forte, entre 90 et 100%, la souche allopatrique SmBRE, au phénotype intermédiaire (entre 45 et 55%) et la souche allopatrique SmGH2, dont la compatibilité est très faible, entre 5 et 10%.

2. Conditions d'élevage et traitements antibiotiques

En tout, 477 mollusques ont été utilisés dans cette expérience, séparés en trois bacs (Figure 18) : 139 dans un bac pour le contrôle sans antibiotique et deux bacs contenant 169 mollusques chacun pour les traitements antibiotiques, les trois bacs ayant été remplis avec de l'eau filtrée à 0,2µm pour réduire les apports bactériens de l'environnement et homogénéiser les conditions expérimentales. Les mollusques traités ont été mis en contact avec de l'ampicilline à 100mg/L (Sigma Aldrich) ou de la streptomycine à 100mg/L (Sigma Aldrich), ajoutées directement dans l'eau des bacs (5L), pendant trois jours. Ces traitements ont déjà montré leur innocuité sur les mollusques et ont donc été choisis pour cette raison (Allan & Blouin, 2017). Toutes les 24h, l'eau additionnée de la dose

d'antibiotiques était renouvelée, afin d'éviter une baisse de l'efficacité de ces derniers. Les individus ont été mis à jeun toute la durée du traitement antibiotique afin d'éviter les variations des communautés bactériennes liées à l'alimentation, ainsi que les éventuels problèmes de digestion liés à la perturbation du microbiote gastro-intestinal. Des mesures de fitness ont été faites afin de confirmer les résultats d'Allan & Blouin dans notre étude : la mobilité et l'activité d'environ 60 mollusques par condition de traitement (traités et contrôles) ont été suivies régulièrement pendant les trois jours de traitements et la survie d'environ 40 mollusques par condition d'infestation (traités, contrôles pour chaque souche de parasite) a été mesurée toutes les 24h pendant toute la durée de l'expérience. Ont été considérés comme actifs les individus se déplaçant, se nourrissant, se reproduisant ou attachés à une surface de bac, et inactifs les individus immobiles au fond du bac et rentrés dans leur coquille. Les individus étaient comptabilisés comme morts lorsqu'ils étaient immobiles, rentrés dans leur coquille sur le côté et que leur cœur ne battait plus (observable à travers la coquille).

De précédentes études ont démontré un effet toxique de traitements chimiques sur les parasites, les rendant moins performants à l'infestation et pouvant aller jusqu'à les tuer (Moné *et al.*, 2010a; Warren & Weisberger, 1966; Warren & Weisberger, 1967). Pour vérifier la toxicité de nos traitements sur les miracidia, et ainsi nous assurer que les variations de compatibilité que nous pourrions observer ne sont pas liées à des différences d'efficacité des parasites, 90 mollusques supplémentaires (30 non traités et 60 traités à l'un ou l'autre antibiotique) ont donc été ajoutés au protocole expérimental.

3. Infestation des mollusques par les parasites

Chaque escargot a été mis en contact avec 10 larves miracidia de la souche SmLE (sympatrique, très compatible), SmBRE (allopatrique, moyennement compatible) ou SmGH2 (allopatrique, très incompatible) (récupérées de foies frais de souris), pendant quatre heures, dans des piluliers contenant cinq millilitres d'eau. Au bout de quatre heures de contact, les escargots ont été replacés dans des bacs communs, par condition, jusqu'à échantillonnage.

4. Echantillonnage et extraction

A la fin des 72h de traitements antibiotiques, sept individus de chaque condition (traités et contrôles) ont été échantillonnés (Figure 18). La coquille nettoyée au préalable à l'aide d'un coton tige imbibé de Javel, puis les mollusques sont sortis de la coquille après section du muscle abducteur. Ils ont alors été congelés individuellement dans des petites barquettes d'aluminium en azote liquide, puis placés à -80°C pour conservation avant extraction. Ces sept individus ont été utilisés par la suite pour vérifier la dysbiose du microbiote induite par les traitements (Figure 18).

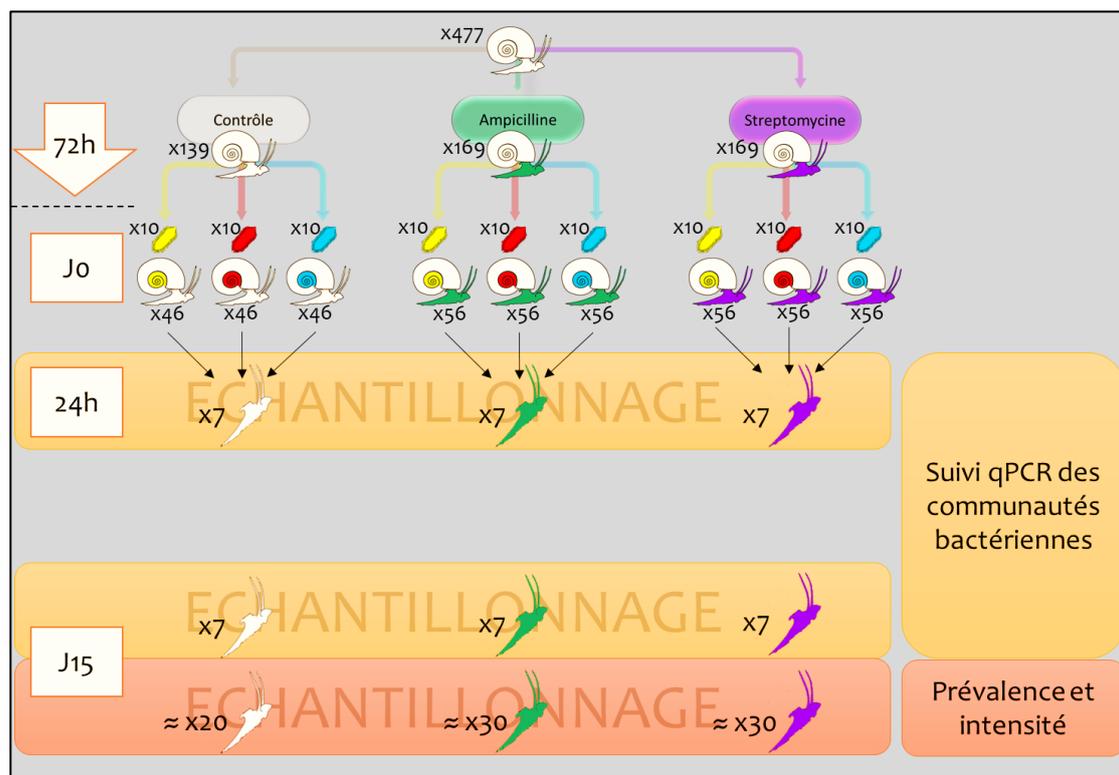


Figure 18 : Plan expérimental pour étudier le lien de cause à effet du microbiote sur la compatibilité des mollusques aux parasites. Les chiffres représentent le nombre d'individus par condition, et échantillonnés par conditions et points de cinétique, ainsi que le nombre de miracidia utilisées pour les infestations. Les flèches et carrés blancs sont les durées de traitement et temps d'échantillonnage. Chaque couleur de miracidia correspond à une souche différente de parasite : jaune pour SmlE, rouge pour SmbRE et bleu pour SmGH2.

De la même manière que précédemment décrit, sept mollusques de chaque condition ont été prélevés 24h après exposition aux parasites afin d'étudier la réponse du microbiote au parasite après la dysbiose induite par les traitements antibiotiques (Figure 18). La survie des individus a été suivie pendant quinze jours après infestation parasitaire, puis, à J15, sept individus de chaque condition ont été prélevés pour analyser les communautés bactériennes au cours de la cinétique d'infestation et tester leur résilience, les individus restants ont été disséqués dans le but de déterminer la prévalence (nombre d'individus

dont l'infestation a été efficace) et l'intensité (nombre de sporocystes par mollusques) de l'infestation (Figure 18).

L'ADN des échantillons a ensuite été extrait avec le kit *Nucleospin® Tissu Extraction* de Macherey-Nagel, avec une phase préalable de broyage mécanique additionnelle de 30 secondes à 7000Hz dans un MagNA Lyser Instrument® (Roche) à l'aide de billes de zirconium. Il a ensuite été quantifié par spectrophotométrie à l'aide du système d'analyse d'acide nucléique multivolume Epoch™ de BioTek et sa pureté a été vérifiée en mesurant les absorbances à 260nm et 280nm puis en calculant le rapport de densité optique 260nm/280nm. Les échantillons extraits ont ensuite été conservés à -20°C jusqu'à analyse par qPCR.

5. Suivi de la composition du microbiote de *B. glabrata* post traitements antibiotiques par Q-RT-PCR

La quantification du microbiote bactérien total et de certains phyla distincts a été faite par qPCR avec plusieurs couples d'amorces spécifiques à ces phyla déterminés selon la littérature (Bacchetti De Gregoris *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2008; Weisburg *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2015) (Tableau 4). Les phyla spécifiques à suivre ont été choisis selon les plus abondants trouvés dans les études précédentes sur la caractérisation du microbiote de *Biomphalaria glabrata* (Huot *et al.*, 2020; Portet *et al.*, 2018).

La réaction PCR a été faite avec le kit Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue d'Eurogentec (5µL de Takyon MasterMix 1X, 1µL de chaque amorce (concentration finale à 100nM), 2µL d'ADN de chaque échantillon (10ng/µL) et 1µL d'eau ultra pure), puis les échantillons ont été mis en plaque 384 puits en triplicats techniques. Ils ont alors été soumis à une amplification par PCR avec une dénaturation initiale à 95°C pendant trois minutes, de 45 cycles de 15 secondes à 95°C et d'une minute à 60°C. Afin de vérifier la présence de contaminants dans les produits PCR, des témoins négatifs ont été rajoutés pour chaque couple d'amorces. L'analyse des quantités des différents phyla bactériens a été faite par le logiciel LightCycler480©.

Tableau 4 : Amorces spécifiques de taxa bactériens analysés dans le cas de l'étude de la dysbiose suite aux traitements antibiotiques. Tm : Température de fusion des amorces. [1] Yang *et al.*, 2015 ; [2] Guo *et al.*, 2008 ; [3] Bachetti de Gregoris *et al.*, 2011 ; [4] Weisburg *et al.*, 1991.

Groupes cibles	Amorces	Séquences (5'-3')	Longueur d'amplicon	Tm	Source
Bacteroidetes	Bac960F Bac1100R	GTTTAATTCGATGATACGCGAG TTAASCCGACACCTCACGG	122 pb		[1]
Firmicutes	Firm934F Firm1060R	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	189 pb		[2]
Verrucomicrobia	Act664F Act941R	TGTAGCGGTGGAATGCGC AATTAAGCCACATGCTCCGCT	97 pb		[1]
Actinobacteria	Ver1165F Ver1263R	TCAKGTCAGTATGGCCCTTAT CAGTTTTYAGGATTTCTCCGCC	277 pb		[1]
Tenericutes	Ten662F Ten862R	ATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAA CMTACTGCGTACGTACTACT	200 pb		[1]
βproteobacteria	Beta979F Beta1130R	AACGCGAAAAACCTTACCTACC TGCCCTTCGTAGCAACTAGTG	174 pb		[1]
γproteobacteria	Gamma877F Gamma1066R	GCTAACGCATTAAGTRYCCCG GCCATGRCGACCTGTCT	126 pb		[1]
αproteobacteria	Alpha682F Alpha908R	CNAGTGTAGAGGTGAAATT CCCCGTCAATTCCTTGAGTT	180 pb		[3]
16S Universel qPCR	926F 1062R	AAACTCAAAGAATTGACGG CTCACRRACGAGCTGAC	136 pb		[3]
16S PCR	27F 1525R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAGGAGGTGWTCARCC	1550 pb		[4]

6. Mesures des indices de prévalence et d'intensité

Quinze jours après infestation, les mollusques survivants pour chaque condition ont été fixés au Raillet-Henri modifié (930mL H₂O distillée, 50mL Formol 40%, 6g NaCl 5%, 20mL acide acétique) après avoir été retirés de leur coquille. La vérification de présence et le comptage de sporocystes primaires (Sp1) s'est faite visuellement, à l'aide d'une loupe binoculaire. Le nombre d'individus présentant des Sp1 a permis la détermination de la prévalence et la moyenne de Sp1 par individu, et la détermination de l'intensité.

7. Analyses statistiques

Les courbes de Kaplan-Meier de survie ont été construites à l'aide du package *survival* de Rstudio (Therneau & Grambsch, 2000), puis les différences entre les courbes ont été testées par Log-rank. Le test exact de Fisher a été utilisé pour tester les différences de prévalences entre les conditions. Les intensités et abondances des fragments d'ADN ont été testées par des tests de Student ou de Mann-Whitney, après vérification de la normalité des données par des tests de Shapiro-Wilk.

C. Résultats

1. Analyse de la toxicité des antibiotiques sur les mollusques et les parasites

Afin de s'assurer que les résultats observés ne sont pas biaisés par un effet délétère des antibiotiques sur l'un ou l'autre des protagonistes de l'interaction hôte/parasite, le comportement des mollusques, leur survie et la capacité d'infestation des parasites (prévalence et intensité de l'infestation) ont été mesurées pendant et/ou après le traitement.

Pendant les trois jours de traitements, les observations des mollusques de manière régulière n'ont fait état d'aucune modification du comportement de déplacements ou d'alimentation des individus. L'analyse d'autres traits d'histoire de vie est cependant nécessaire pour pouvoir conclure sur les effets des antibiotiques pour la *fitness*.

La survie des mollusques semble augmenter en présence d'antibiotiques par rapport à celle des individus contrôles, dans chacune des combinaisons hôte/parasite (Figure 19). En effet, la survie est améliorée d'environ 20% en présence d'antibiotiques en comparaison aux contrôles, dans l'interaction BgBAR/SmLE (test Log-rank : $p < 0.05$), BgBAR/SmBRE (test Log-rank : $p < 0.05$) et BgBAR/SmGH2 (test Log-rank : $p < 0.05$ pour ampicilline et $p < 0.01$ pour streptomycine). Ces résultats nous ont conduits à conclure que les antibiotiques n'avaient pas d'effet délétère sur les mollusques.

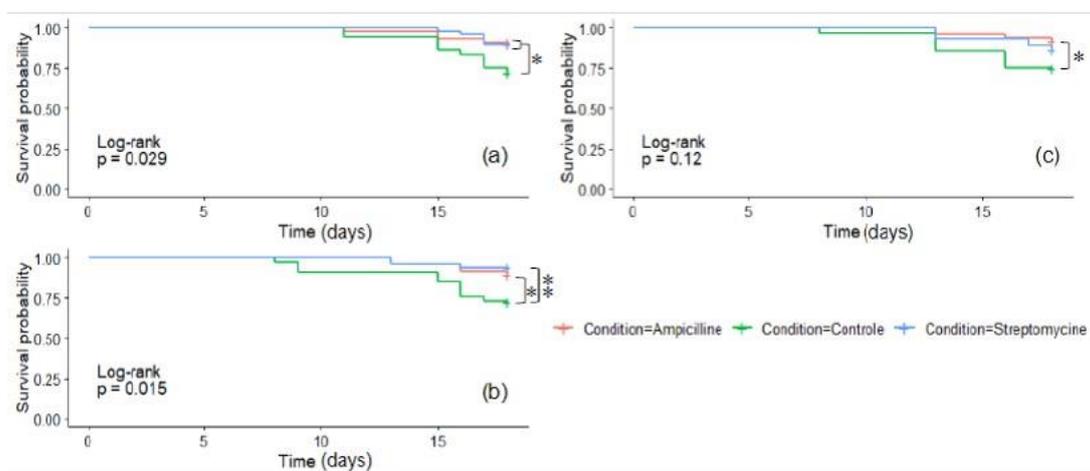


Figure 19 : Survie des mollusques traités aux antibiotiques. Courbes de survie sur 18 jours. Vert : contrôles (N = 30) ; Rouge : traités amplicilline (N = 40) ; Bleu : traités streptomycine (N = 40). Infestations à jour 3 avec 10 miracidia : (a) BgBAR x SmLE ; (b) BgBAR x SmBRE ; (c) BgBAR x SmGH2. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (test Log-rank)

La toxicité des traitements a également été testée sur la souche SmLE des parasites, afin de vérifier que leur capacité d'infestation n'a pas été altérée. Ainsi, 15 jours après infestation et suite à la mise en contact des larves miracidia avec les antibiotiques, la prévalence et l'intensité de l'infestation ont été mesurées. Bien que des variations aient été observées entre les conditions, celles-ci n'avaient aucune valeur significative ni en termes de prévalence, ni d'intensité (Figure 20). Les traitements n'affectent donc pas les capacités d'infestation des parasites de la souche SmLE. A partir de ces résultats, nous avons fait l'hypothèse qu'il en était de même pour les souches SmBRE et SmGH2, bien que cela n'ait pas été testé expérimentalement.

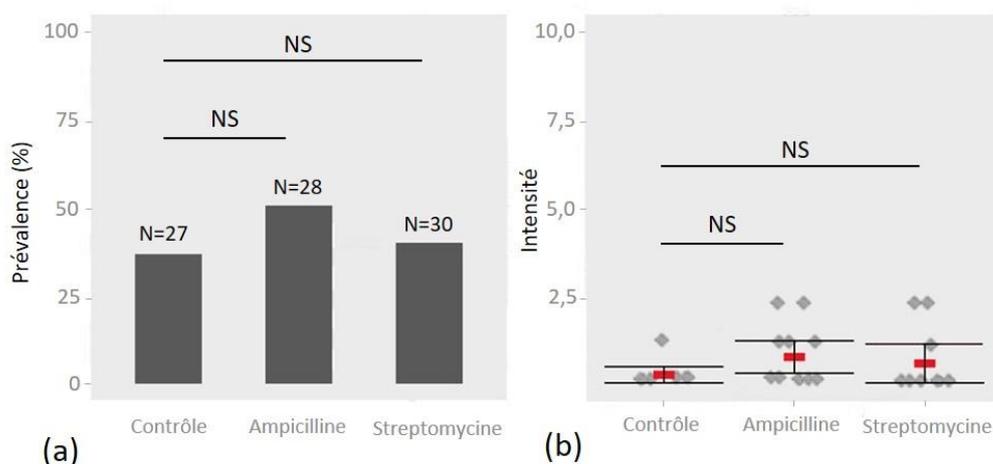


Figure 20 : Effets des traitements antibiotiques sur les capacités d'infestation de la souche SmLE. (a) prévalence ; (b) intensité de l'infestation avec la souche SmLE en conditions contrôle ou traitement antibiotique. N : nombre d'individus. NS : Non Significatif (Mann-Whitney). Les barres d'erreur en (b) représentent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

2. Effet des antibiotiques sur les communautés bactériennes

Les tests préliminaires effectués sur les différents couples d'amorces ont conduit à l'élimination de certaines d'entre elles. En effet, les amorces spécifiques des Tenericutes, des Actinobacteria, des Firmicutes et des β -proteobacteria ont été retirées de l'analyse, car soit aucune amplification n'a pu être observée ou encore l'efficacité PCR n'était pas optimale. Seules les amorces pour le 16S universel, les α -proteobacteria, les Bacteroidetes, les γ -proteobacteria et les Verrucomicrobia ont donc été conservées dans le cadre de cette étude.

La comparaison des quantifications des différents phyla bactériens entre conditions de traitement a montré que la streptomycine avait un effet très fort sur la composition microbienne, l'effet de l'ampicilline, bien qu'impactant certains phyla, a été beaucoup moins important. En effet, en présence de streptomycine, la charge bactérienne totale, décrite par les amorces 16S universelles, a fortement baissé, passant d'environ 18 000 copies à environ 6000 (Student : $p < 0.05$) (Figure 21). Bien qu'une tendance à la baisse ait également été constatée en présence d'ampicilline, celle-ci n'était pas significative. Cette diminution de la charge bactérienne s'observe pour tous les phyla spécifiques étudiés (Student : $p < 0.05$ ou $p < 0.01$ pour les Bacteroidetes), exceptées les α -proteobacteria, en présence de streptomycine. L'ampicilline ne réduit significativement la charge que des γ -proteobacteria (Student : $p < 0.05$) et des Verrucomicrobia (Student : $p < 0.01$).

Les antibiotiques, et en particulier la streptomycine, provoquent donc bien une dysbiose des communautés bactériennes de mollusques au bout de trois jours d'exposition. Etant donné les effets moins importants de l'ampicilline, les effets de cette dernière sur les prévalences et intensités d'infestation seront plus difficiles à interpréter.

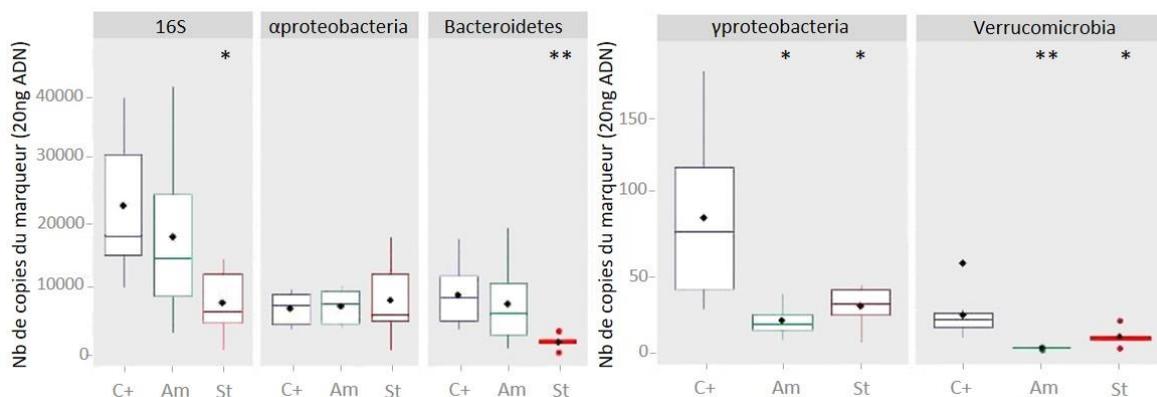


Figure 21 : Abondance des différents groupes bactériens par condition. Abondance en nombre de copies de leur région spécifique du 16S. Points au centre des boxplots : moyenne (Student). C+ : contrôle ; Am : traitement ampicilline ; St : traitement streptomycine. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (test Log-rank)

3. Effet des traitements antibiotiques sur la compatibilité

a) Combinaison sympatrique : BgBAR / SmLE

La prévalence et l'intensité de l'infestation ont été mesurées 15 jours après infestation. Le nombre d'individus présentant des Sp1, soit la prévalence, dans la combinaison sympatrique BgBAR/SmLE à compatibilité forte n'a pas varié en conditions traitées par rapport aux contrôles (Figure 22a). Autrement dit, les traitements antibiotiques n'ont pas d'effet sur la prévalence. En effet, sur plus d'une trentaine d'individus disséqués, entre 90 et 95% présentaient des Sp1 de *S. mansoni*, après chaque traitement antibiotique, contre 100% des 19 individus contrôles.

En revanche, en ce qui concerne l'intensité d'infestation (nombre moyen de Sp1 par individus infestés observés lors de la dissection), une diminution en présence d'ampicilline (Mann-Whitney : $p < 0.05$) et de streptomycine (Mann-Whitney : $p < 0.01$) a pu être mise en évidence (Figure 22b). En effet, une moyenne de 3.3 Sp1 en présence d'ampicilline et de 2.9 en présence de streptomycine contre 4.4 en conditions contrôles a été déterminée. Les antibiotiques réduisent donc le nombre de Sp1 qui réussissent à s'implanter au sein des mollusques, dans la combinaison BgBAR/SmLE.

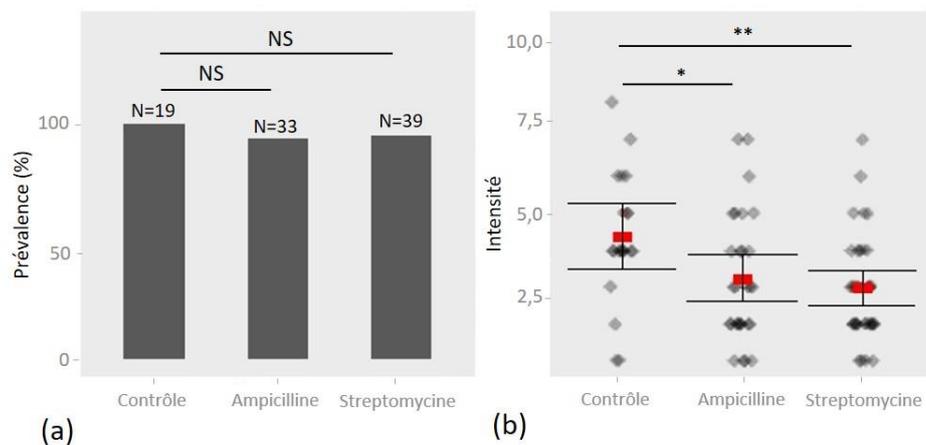


Figure 22 : Compatibilité BgBAR/SmLE en conditions antibiotiques et contrôle. (a) prévalence ; (b) intensité. NS : non significatif. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Mann-Withney). Les barres d'erreur en (b) représentent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

b) Combinaison allopatrique : BgBAR / SmBRE

Dans le cas de la combinaison allopatrique à compatibilité moyenne BgBAR/SmBRE, une augmentation de la prévalence est observée en présence de streptomycine, en comparaison aux individus non traités (Figure 23a). En effet, environ 75% des 37 individus disséqués présentaient des spocystes Sp1, contre environ 40% des 17 individus contrôles. Une tendance à l'augmentation de la prévalence est également observée après

traitement à l'ampicilline, cependant elle reste non significativement différente des individus contrôles.

L'intensité d'infestation, quant à elle, ne subit pas de modification après traitement aux antibiotiques, le nombre moyen de Sp1 observés étant entre 2 et 2.5 par individus pour chaque condition (Figure 23b). La streptomycine augmente donc la prévalence dans la combinaison BgBAR/SmLE, sans affecter l'intensité de l'infestation.

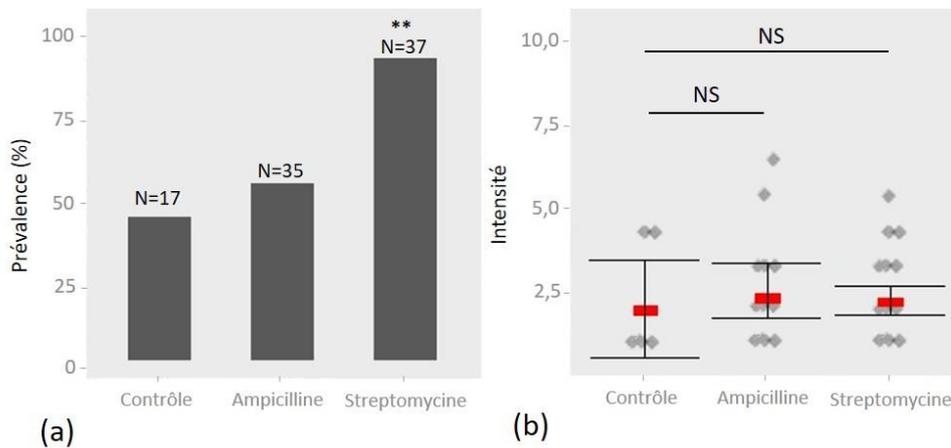


Figure 23 : Compatibilité BgBAR/SmBRE en conditions antibiotiques et contrôle. (a) prévalence ; (b) intensité. NS : non significatif. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Mann-Withney). Les barres d'erreur en (b) représentent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

c) Combinaison allopatrique : BgBAR / Sm GH2

Enfin, la dysbiose induite par les traitements antibiotiques dans le cas de la combinaison allopatrique à faible compatibilité n'a impacté ni la prévalence ni l'intensité de l'infestation (Figure 24a et b). Les traitements antibiotiques et la dysbiose qu'ils induisent ne semblent donc pas affecter l'infestation de BgBAR par SmGH2.

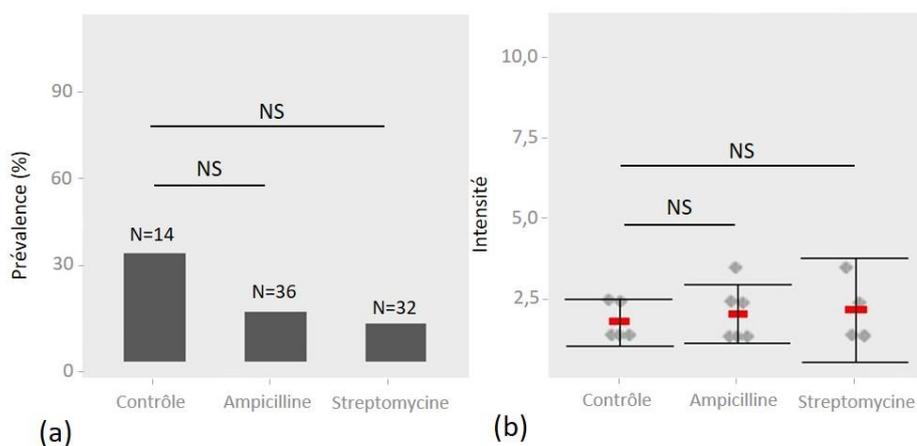


Figure 24 : Compatibilité BgBAR/SmGH2 en conditions antibiotiques et contrôle. (a) prévalence ; (b) intensité. NS : non significatif. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ (Mann-Withney). Les barres d'erreur en (b) représentent l'intervalle de confiance à 95% de la moyenne.

D. Discussion

Le microbiote est désormais considéré comme une entité essentielle à prendre en compte dans l'étude d'un organisme, et des interactions qu'il peut avoir avec d'autres, comme les interactions hôtes/parasites. Son impact et son rôle dans diverses fonctions biologiques de l'hôte a, en effet, été démontré dans de nombreux modèles et notamment son lien avec l'immunité. Ainsi, il peut participer à la reconnaissance de pathogènes ou parasites ou induire la production d'effecteurs immunitaires par son hôte, ou encore agir directement contre les agents infectieux (voir I. E. 2.).

L'objectif de cette étude a été de déterminer si un rapport de causalité existait entre la composition du microbiote de *B. glabrata* et l'immunité antiparasitaire contre le parasite *S. mansoni*. Pour ce faire, les effets de traitements antibiotiques sur la compatibilité entre l'hôte et le parasite ont été analysés.

Effet des antibiotiques

Le suivi des survies de mollusques pendant et après traitements antibiotiques a confirmé que ces derniers n'ont pas eu d'effet délétère. Les travaux d'Allan et Blouin (Allan & Blouin, 2017) avaient déjà montré une altération de l'activité des mollusques après traitements antibiotiques, cependant, aucune donnée de survie n'a été fournie. Les auteurs ont montré que le traitement à l'ampicilline était un des seuls à n'altérer aucunement l'activité des mollusques (déplacements, alimentation), c'est pourquoi il a été choisi pour notre expérimentation. Cependant, son effet sur le microbiote n'étant pas garanti, un autre antibiotique, la streptomycine, a également été utilisé dans nos travaux. En effet, d'après l'étude d'Allan et Blouin, ce traitement semble avoir un impact plus fort que l'ampicilline, ayant engendré une réduction de l'activité des mollusques de manière temporaire (Allan & Blouin, 2017). L'ampicilline est un antibiotique appartenant à la famille des β -lactamines qui possède une fonction inhibitrice de la formation de la paroi bactérienne, en bloquant une enzyme essentielle à ce mécanisme, conduisant à la lyse bactérienne. La streptomycine, quant à elle, appartient à la famille des aminosides. Elle inhibe la synthèse de protéines en se liant au ribosome ce qui altère la traduction, induisant des erreurs de lecture du code génétique qui synthétisent alors des protéines anormales, conduisant à la mort cellulaire.

La quantification des ADN bactériens révèle que l'ampicilline, conformément à l'hypothèse qui avait été faite suite aux résultats d'Allan et Blouin, a un effet très négligeable sur la charge bactérienne totale. Bien qu'elle réduise significativement la charge de deux des phyla spécifiques étudiés (γ -proteobacteria et Verrucomicrobia), ni

les autres phyla spécifiques, ni la charge bactérienne totale ne sont impactés. La streptomycine a, quant à elle, fortement réduit la charge bactérienne totale, tout comme celle des Bacteroidetes, des γ -proteobacteria et des Verrucomicrobia. Son action est donc plus efficace pour perturber les communautés bactériennes. Il serait intéressant d'étudier d'autres phyla spécifiques, car ceux qui ont été choisis initialement ne couvrent pas forcément les taxa majoritaires qui composent l'ensemble du microbiote. Pour cela, la mise au point d'amorces spécifiques pour la qPCR peut être envisagée, ainsi que l'analyse barcoding des communautés bactériennes. Celle-ci n'a pas été faite car il s'agissait-là d'une étude préliminaire explorant le lien de cause à effet du microbiote dans la lutte antiparasitaire. Les α -proteobacteria ne sont pas affectées par les traitements antibiotiques, la proportion de ce phylum restant aux alentours de 35% du microbiote total entre le contrôle et les conditions traitées. Il est possible que ce taxon bactérien soit sensible à un autre type d'antibiotique, ou alors à un cocktail d'antibiotiques.

Etant donné qu'un effet toxique de traitements par des xénobiotiques sur *Schistosoma* a déjà été démontré (Moné *et al.*, 2010b), les effets de la streptomycine et de l'ampicilline ont été testés sur la souche SmLE. En effet, bien que les parasites ne soient pas directement en contact avec les traitements au moment de l'infestation, les mollusques y ont été confrontés pendant 72h. Les produits peuvent donc être rémanents dans les tissus, notamment le manteau, avec lequel les parasites sont en contact. Ainsi, la prévalence et l'intensité d'infestation ont été mesurées après contact des larves miracidia avec les antibiotiques. Aucun effet sur ces mesures n'a été constaté en comparaison aux larves n'ayant pas été exposées, permettant de conclure que les antibiotiques ne diminuaient pas la capacité d'infestation des parasites. Bien que seule la souche SmLE a été utilisée pour ces tests, nous avons fait l'hypothèse qu'il en était de même avec les deux autres souches de parasites utilisées dans l'expérience. Il serait cependant intéressant de faire ces tests sur SmBRE et SmGH2 afin de s'assurer que les résultats de prévalence et d'intensité obtenus pour ces souches ne sont pas liés à une modification de la capacité d'infestation de ces souches.

Effet de la dysbiose sur les infestations parasitaires

L'objectif premier de l'étude a été d'analyser les effets d'une dysbiose sur la compatibilité entre les mollusques et plusieurs souches de parasites, afin de mettre en évidence ou non un lien entre le microbiote et les capacités immunitaires de leur hôte. Ainsi, une fois la dysbiose, provoquée par les antibiotiques, confirmée, les prévalences et intensités d'infestation des différentes combinaisons hôte/parasite ont été mesurées.

La combinaison entre BgBAR et SmLE reste toujours très compatible, avec une prévalence inchangée après traitements antibiotiques en comparaison aux contrôles. En revanche, l'intensité d'infestation, soit le nombre moyen de Sp1 implantés par individus, a été réduite après la dysbiose induite par les antibiotiques. Cette combinaison implique des individus ayant évolué en sympatrie, en l'occurrence dans des zones géographiques communes. On peut alors parler de coévolution locale, ce qui explique la forte compatibilité de l'interaction, liée à des adaptations spécifiques (Buckling & Rainey, 2002; Kaltz & Shykoff, 1998).

Les deux souches allopatriques de BgBAR, SmBRE et SmGH2, n'ont pas coévolué avec leur hôte, et présentent des compatibilités plus restreintes que la combinaison sympatrique. Ceci est directement lié aux capacités de virulence ou d'infectivité des parasites, mais également aux interactions immunobiologiques totalement différentes entre les combinaisons. En effet, une étude récente a démontré une forte immunosuppression chez les mollusques infestés par leur souche sympatrique, traduisant d'une parfaite adaptation des parasites à leurs hôtes et leur permettant de s'implanter facilement (Portet *et al.*, 2019). A l'inverse, cette même étude a montré une activation de la réponse immunitaire en présence de souches allopatriques, et ce sont dès lors, la virulence et l'infectivité des parasites qui vont déterminer leur capacité à s'implanter et se développer dans les mollusques (Portet *et al.*, 2019).

Ces différences de réponses immunitaires pourraient être liées au microbiote de l'hôte. En effet, un niveau basal de l'immunité de l'hôte peut être consacré au maintien de la stabilité du microbiote (Hooper *et al.*, 2012), et ce dernier peut jouer un rôle dans le développement du système immunitaire de son hôte, voire participer activement à sa protection antipathogène et antiparasite (voir I. E. 2.). Une perturbation des communautés microbiennes pourrait donc avoir un impact fort sur le statut immunitaire de l'hôte. Or, les traitements antibiotiques réalisés dans cette étude entraînent une dysbiose, ce qui peut engendrer un changement drastique dans la réponse immunitaire des mollusques dans le cas où le microbiote impacte cette immunité (voir I. E. 2.) Ce changement pourrait à son tour perturber les capacités immunitaires de son parasite sympatrique, jusqu'ici parfaitement adapté (immunosuppression et forte compatibilité), qui ne pourrait alors plus appliquer les mêmes stratégies d'implantation que dans un hôte au microbiote normal. La baisse d'infectivité, constatée en conditions de traitements antibiotiques, pourrait être expliquée par cette perturbation. La prévalence qui, elle, n'est pas modifiée, pourrait tenir au fait que la souche SmLE est une souche très virulente qui, malgré tout, réussit à s'implanter.

La souche allopatrique SmBRE, à l'inverse, pourrait tirer profit de cette modification du microbiote. Ses capacités de virulence ont été décrites comme plus fortes que la souche SmGH2 (Moné *et al.*, 2010a), ce qui expliquerait la meilleure prévalence observée en présence de streptomycine, la modification des capacités immunitaires de son hôte par l'antibiotique et la dysbiose, pouvant alors lui être favorable. La souche allopatrique SmGH2, quant à elle, ne présente aucune modification de prévalence ou d'intensité, ce qui peut s'expliquer par les faibles virulence et infectivité naturelles de cette souche. La perturbation des capacités immunitaires des mollusques, liée à une dysbiose par les traitements antibiotiques, n'est alors pas suffisante pour pallier aux faibles capacités de ces parasites à contourner le système immunitaire (Moné *et al.*, 2010a).

Les résultats de cette étude préliminaire semblent aller dans le sens de l'hypothèse d'un lien entre la composition du microbiote et les capacités immunitaires de son hôte. En effet, la dysbiose par les traitements antibiotiques a bel et bien été confirmée sur la charge totale de 16S et sur certains taxa bactériens spécifiques. C'est cette dysbiose qui induirait des modifications de la réponse immunitaire, soulignant un lien direct entre le microbiote et le système immunitaire. Cette hypothèse doit cependant être vérifiée par de nouvelles expérimentations en multipliant les combinaisons hôtes/parasites, qu'elles soient sympatriques ou allopatriques et avec différents niveaux de compatibilité. De plus, des analyses par qPCR ou RNAseq, ciblant des gènes impliqués dans l'immunité du mollusque permettraient notamment de confirmer la perturbation du système immunitaire de l'hôte suite à une dysbiose (elle-même à confirmer par analyse barcoding), et ainsi de valider l'hypothèse que c'est cette perturbation qui induit une modification des prévalences et intensités d'infestation. Une autre hypothèse serait que les modifications du niveau basal de l'immunité, par la présence des parasites, altérerait l'homéostasie (selon la théorie de Hooper (Hooper *et al.*, 2012) ce qui induirait alors la dysbiose observée.

L'utilisation de cocktails d'antibiotiques pourrait perturber le microbiote de manière drastique, et ainsi donner des résultats plus contrastés qui permettraient de conclure sur le lien entre microbiote et immunité. Cependant, les antibiotiques peuvent également perturber la physiologie des mollusques, de manière plus ou moins subtile, et ainsi modifier indirectement le phénotype de compatibilité. L'utilisation d'autres techniques doit donc être envisagée, comme par exemple la technique du RNAi utilisée sur des gènes codant pour des AMP. La Biomphamacine semble être un bon candidat (voir II. C. 1.), et son inactivation pourrait induire des modifications mesurables du microbiote, permettant ainsi l'étude du lien de causalité entre microbiote et immunité sans traitement exogène.

V. Discussion Générale

Les objectifs de mon travail de thèse étaient de caractériser le microbiote de différentes souches et espèces de Planorbidae, hôtes intermédiaires du parasite responsable de la bilharziose, *Schistosoma spp.*, et de déterminer le rôle de ce microbiote dans l'interaction hôte-parasite.

Ce modèle est d'un intérêt particulier car les différentes combinaisons entre souches de mollusques et de parasites présentent un polymorphisme dans leur phénotype de compatibilité : les mollusques sont plus ou moins résistants aux différentes souches de parasites elles-mêmes plus ou moins virulentes pour une combinaison donnée. Ceci se traduit par une prévalence et une intensité des infestations variables entre les combinaisons (Galinier *et al.*, 2017a; Theron *et al.*, 2014). Ce phénotype a été largement étudié et les mécanismes sous-jacents sont au centre de nombreuses études, mais il apparaît très complexe et met en jeu de nombreux facteurs, ce qui rend difficile sa compréhension (Bouchut *et al.*, 2008; Coustau *et al.*, 2015; Galinier *et al.*, 2017a; Mitta *et al.*, 2012, 2017). Pourtant, la clarification de l'interaction entre les mollusques et les parasites pourrait permettre le développement d'outils de médiation vectorielle et la réduction de la transmission à l'Homme, par exemple en bloquant le cycle du parasite au niveau de son hôte intermédiaire.

Alors que beaucoup d'efforts ont été consacrés aux analyses cellulaires et moléculaires ((épi)génomiques, transcriptomiques et protéomiques), une composante n'a jamais été étudiée de manière exhaustive dans ce modèle : le microbiote. Le microbiote est aujourd'hui considéré comme une part indissociable d'un organisme, formant avec lui un ensemble appelé holobionte. L'étude de cet holobionte est donc essentielle pour avoir une vision plus complète d'un organisme et comprendre les interactions qu'il peut avoir avec son environnement et d'autres organismes. En effet, les communautés microbiennes peuvent influencer les fonctions biologiques d'un hôte, notamment sa fonction immunitaire, et ainsi potentiellement impacter les interactions hôtes-parasites. Dans le cas de notre modèle, l'étude du microbiote pourrait donc apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du phénotype de compatibilité. Des données concernant notamment la flore cultivable sont disponibles dans la littérature (voir I. F. 1. c)) (Ducklow *et al.*, 1979, 1981; Silva *et al.*, 2013). Ces travaux ont été menés uniquement sur la flore cultivable des mollusques, or, la majorité des bactéries ne peut pas être cultivée *in vitro*. Les techniques de séquençage ont ouvert de nouvelles possibilités pour l'étude des communautés bactériennes, d'abord le séquençage Sanger, puis, beaucoup plus récemment, le séquençage haut débit. Ainsi, en 2018, le séquençage de la boucle V3-V4

de l'ARNr 16S par MiSeq (Illumina) a permis l'étude du microbiote bactérien d'une souche guadeloupéenne de *B. glabrata* (Allan *et al.*, 2018). C'est également cette technique qui a été utilisée pour caractériser le microbiote d'une souche brésilienne de *B. glabrata* (Portet *et al.*, 2018). L'ensemble de mon travail de thèse est la première étude à caractériser le microbiote bactérien de plusieurs souches et espèces de Planorbidae, hôtes intermédiaires du schistosome, mais également la composante eucaryote.

Concernant l'étude des communautés protistes, celle-ci est complexe, car il s'agit d'organismes eucaryotes, qui partagent donc le marqueur de l'ADN 18S avec leur hôte. De plus, comme nous travaillons sur des animaux entiers, l'ADN 18S de l'hôte est bien plus abondant que celui des communautés protistes associées, qui sont alors masquées. Pour pallier à cela, il a fallu développer des techniques pour réduire voire supprimer l'amplification de l'information génétique de l'hôte de nos échantillons. Deux types d'amorces ont alors été développées : les amorces spécifiques des communautés protistes, 18SV1V2SP, et les amorces bloquantes, réduisant l'amplification de l'ADN 18S des mollusques, 18SV4BP. Toutes deux ont rempli leur objectif, avec une suppression complète de l'information génétique de l'hôte dans le cas des amorces spécifiques, cependant, la forte amplification des Embryophyceae (plus d'un million de séquences) correspondant à de la laitue (nourriture du mollusque) a partiellement masqué celle des communautés protistes symbiotiques. C'est ce qu'ont démontré les amplicons obtenus avec l'utilisation des amorces bloquantes, qui, bien que n'empêchant pas entièrement l'amplification de l'ADN des mollusques, permettent l'identification d'une plus grande proportion de séquences de protistes présents chez ces derniers. Les principaux taxa identifiés sont les Amoebozoa et les Alveolata. Dans cette étude, les communautés bactériennes ont également été analysées et les résultats ont révélé une corrélation entre les communautés protistes et bactériennes en termes de richesse spécifique et de beta-diversité. Plus précisément, les regroupements des mollusques selon leur microbiote protiste et bactérien se superposent, ce qui peut traduire d'une interaction entre les communautés, notamment dans des cycles biogéochimiques. En effet, une étude a publié un modèle de consommation/production du carbone dans une zone pélagique de l'Arctique et prend justement en compte les interactions des microorganismes protistes et bactériens (Thingstad *et al.*, 2008). Dans cette étude, les hôtes ne semblent pas influencer la structuration des communautés protistes, contrairement à celle des bactéries, suggérant que les premières sont plus impactées par l'environnement, dont l'effet fort a également été démontré dans cette étude. Il se peut que les microorganismes eucaryotes se nourrissent de ces communautés bactériennes (Raven *et al.*, 2005), ou soient associés à des communautés bactériennes et/ou virales qui leur sont propres (Boyer *et al.*, 2009;

Moliner *et al.*, 2010), ce qui expliquerait cette corrélation. Par ailleurs, des travaux antérieurs ont également identifié une espèce de protistes au sein des mollusques, *Capsaspora owczarzaki* appartenant au règne des Filastrea, groupe d'opisthokontes proche de la racine (Suga *et al.*, 2013). Ces organismes unicellulaires amoéboïdes sont capables de détruire les sporocystes de schistosomes dans les tissus des mollusques (Owczarzak *et al.*, 1980; Stibbs *et al.*, 1979). Bien que *C. owczarzaki* n'ait pas été retrouvé parmi les communautés protistes amplifiées, un genre phylogénétiquement proche d'opisthokonte unicellulaire, *Anurofeca*, de la famille des Amoebidiaceae, a été identifié. Cette famille avait déjà été identifiée dans certains individus dans une étude précédente (Hertel *et al.*, 2004). La régulation des population d'anoures *Bufo calami* par ces protistes a déjà été démontrée, par séquestration de nutriments dans le système digestif (Beebee & Wong, 1992), cependant, aucune interaction de ce genre n'a, à ce jour, été démontrée chez *Biomphalaria*. La proximité phylogénétique de ces protistes avec le prédateur de sporocystes de schistosomes, *C. owczarzaki* est une voie intéressante à suivre, dans le contexte du phénotype de résistance au parasite. En effet, bien qu'aucune étude ne fasse état de cette même capacité à prédater les sporocystes chez *Anurofeca*, il serait intéressant de la tester. La mesure de la prévalence de ce taxon dans les différentes souches de *B. glabrata*, serait une piste à explorer afin d'établir si une corrélation existe entre sa présence et le phénotype de compatibilité des escargots. Cette première étude des communautés protistes associées à plusieurs souches de notre modèle reste, cependant, préliminaire, et une analyse plus approfondie, avec un plus grand nombre de réplicats est à envisager, dès lors que les amorces spécifiques sont mises au point et efficaces.

La partie caractérisation du microbiote bactérien a été plus exhaustive car le nombre de réplicats biologiques nous permet de conclure de manière plus catégorique, et les outils utilisés sont au point et utilisés depuis longtemps. En effet, la boucle V3V4 de l'ARNr 16S est utilisée comme marqueur dans de nombreuses études. Les taxa bactériens les plus abondants étaient principalement représentés par les familles des Rhodobacteraceae, des Commamonadaceae et des Xanthomonadaceae, toutes trois appartenant aux Proteobacteria, et par les Flavobacteraceae (Bacteroidetes). Bien que Allan et ses collaborateurs ne soient pas rentrés dans les détails de la composition bactérienne de la souche guadeloupéenne de *B. glabrata* dans leur étude (Allan *et al.*, 2018), les mêmes familles dominantes ont été décrites dans des souches brésiliennes, au cours de notre étude en séquençage massif (Portet *et al.*, 2018) tout comme lors des travaux antérieurs en cultivable (Silva *et al.*, 2013). La correspondance avec les travaux d'Anaïs Portet, auxquels j'ai été associée, était attendue car il s'agit d'individus du même élevage, donc

maintenus dans les mêmes conditions, et échantillonnés à environ un an d'intervalle. En revanche, l'étude sur la flore cultivable a porté sur des individus originaires d'une autre localité du Brésil et maintenus dans un autre laboratoire.

L'analyse des communautés bactériennes des différentes souches et espèces de Planorbidae a révélé l'existence d'un core microbiote par souche (défini par les familles étant absentes au maximum d'un individu de la souche). Celui-ci représente donc la part stable des communautés bactériennes. La composition de ce core microbiote était cependant variable entre les souches étudiées, ce qui traduit d'une structuration par l'hôte. Les familles formant le core étaient également parmi les plus abondantes de l'ensemble du microbiote, ce qui suggère une importance de ces familles dans l'holobionte : leur abondance peut être l'indication d'un rôle potentiel dans la physiologie de l'hôte. L'exemple le plus fort est celui des individus *Bulinus truncatus* pour qui la famille des Mycoplasmatacea représente à elle seule presque 50% du microbiote total. Un membre de cette famille a déjà été décrit des mollusques comme *Achatina fulicula* (Pawar *et al.*, 2012) et les huîtres (de Lorgeril et Lucasson *et al.*, 2018; Fernandez-Piquer *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012). Une amélioration de la *fitness* a été suggérée chez ces dernières, une corrélation entre la présence de ces bactéries et la réduction de la mortalité face à une infection virale ayant été mise en évidence (de Lorgeril, Lucasson *et al.*, 2018), tout comme chez les isopodes qui survivent mieux, malgré un apport insuffisant en nutriments, lorsqu'ils portent des *Mycoplasma-like* (Fraune & Zimmer, 2008). De futurs travaux portant sur le lien entre les Mycoplasmataceae et différents traits d'histoire de vie de *B. truncatus* pourraient être intéressants, notamment l'exploration du lien entre cette famille bactérienne et l'immunité antiparasitaire. En effet, la corrélation entre la présence d'une espèce appartenant à cette famille et l'amélioration de la survie chez l'huître face à un pathogène suggère une implication, directe ou indirecte, de cette famille dans l'immunité de son hôte. Bien que les mollusques hôtes soient très différents, l'exploration de ce lien reste une voie intéressante à explorer. Dans tous les cas, l'interaction entre les mollusques et leur core microbiote est encore peu documentée, car peu d'études ont caractérisé cette part invariable du microbiote (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018).

Le patron de phylosymbiose obtenu entre les souches de mollusques et leur microbiote (et même leur core microbiote) suggère un effet fort de l'hôte dans la structuration de ce dernier. Ce patron décrit la correspondance de la phylogénie de l'hôte, déterminée par l'évolution, et du dendrogramme de la composition des communautés bactériennes, pouvant notamment être liée à l'écologie (Brucker & Bordenstein, 2011; Brucker & Bordenstein, 2012; Franzenburg *et al.*, 2013; Fraune & Bosch, 2007). Le terme de

coévolution ne s'applique pas directement à la relation entre un hôte et son microbiote, car la composition de ce dernier est complexe et diverse, et les interactions entre les différents taxa, avec l'hôte et avec l'environnement ne sont généralement pas clairement établies. La phylosymbiose correspond plutôt dans ce cas à une éco-évolution entre les deux parties, n'impliquant pas nécessairement de coévolution, de cospéciation, de co-cladogénèse ou de co-cladodiversification, ces termes impliquant l'émergence de nouvelles espèces à partir d'un ancêtre commun (Brucker & Bordenstein, 2011; Brucker & Bordenstein, 2012; De Vienne *et al.*, 2013). Brucker et Bordenstein ont précisé que la phylosymbiose "*does not presume that microbial communities are stable or even vertically transmitted from generation to generation*" ("ne présume pas que les communautés microbiennes soient stables ni même transmises verticalement d'une génération à l'autre"), mais plutôt que le niveau de divergence génétique des hôtes est associé au taux de divergence de leurs communautés associées (Brucker & Bordenstein, 2011; Brucker & Bordenstein, 2012). Un patron de phylosymbiose a été décrit entre différentes espèces de guêpes parasitoïdes du genre *Nasonia*, et entre plusieurs espèces d'*Hydra* (Brucker & Bordenstein, 2013; Fraune & Bosch, 2007). Dans la littérature ce patron de phylosymbiose est notamment soutenu par les observations d'une plus forte variabilité interspécifique qu'intraspécifique, et d'une réduction de la survie et/ou des performances lors de transplants interspécifiques de microbiote, même entre espèces proches (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2018). Le patron de phylosymbiose se retrouve avec le core microbiote de nos Planorbidae, ce qui est une indication supplémentaire d'une possible éco-évolution entre l'hôte et ses symbiotes. Mener une étude similaire sur un plus grand nombre d'espèces sera nécessaire à une meilleure compréhension de la relation éco-évolutive qu'elles entretiennent avec leur microbiote. Morgan et ses collaborateurs ont établi l'arbre phylogénétique des Planorbidae (Morgan *et al.*, 2002), l'étude du patron de phylosymbiose à partir des membres de l'ensemble des espèces de cette phylogénie serait intéressant dans ce contexte. Dans certains modèles, une partie du microbiote peut être transmise sur des centaines, voire des milliers de générations. Kwong et Moran ont estimé que le microbiote très spécialisé des abeilles avait co-évolué avec son hôte depuis des millions d'années (Kwong & Moran, 2016). Cependant, il s'agit, dans le cas des abeilles mellifères, d'un microbiote réduit, composé de moins de 10 taxa bactériens, et les études sur ce modèle sont nombreuses. De plus, le comportement de trophallaxie pourrait contribuer à la stabilisation du microbiote, ce qui pourrait expliquer une si forte spécialisation. Quoi qu'il en soit, le microbiote de notre modèle est loin d'être si bien caractérisé et même son acquisition et sa transmission sont encore inconnues. En effet, nous ne disposons encore d'aucune information sur l'évolution des communautés

bactériennes au cours de la vie des mollusques. Il serait intéressant d'analyser ces communautés le long de la vie de ces derniers, et de tester la possibilité de transferts verticaux et horizontaux de microorganismes.

L'expérience de jardin commun a par ailleurs permis de tester la robustesse du patron de phyllosymbiose et de la spécificité inter-souche des communautés bactériennes dans un environnement commun. Bien que les résultats aient confirmé sa spécificité, la variabilité interindividuelle du microbiote des individus d'une même souche, en dépit du manque d'analyses statistiques, semble plus faible que celle en bacs séparés par souche et donc potentiellement liée aux différences de conditions de maintien. Il est possible que la densité d'individus dans les paniers ait favorisé les transferts de bactéries, ce qui pourrait expliquer une homogénéisation du microbiote de ces individus. Afin de tester cette hypothèse, une nouvelle expérience de jardin commun pourrait être menée, sur un pas de temps plus long ou encore les pontes d'une souche pourraient être isolées puis les juvéniles maintenus dans des bacs ayant contenu des souches différentes. Si la spécificité de ce microbiote demeure dans ces expériences, alors l'effet hôte serait bien le facteur majeur, dans nos conditions expérimentales, déterminant la composition des communautés bactériennes. Il faut cependant garder à l'esprit que cette étude a été faite sur des individus de laboratoire et ne permet, en aucun cas, de conclure sur la composition du microbiote des mollusques sauvages. L'hypothèse d'une éco-évolution entre les escargots et leur microbiote ne pourra être confirmée que si le patron de phyllosymbiose se retrouve entre souches directement prélevées sur le terrain. C'est, par ailleurs, l'objectif d'un projet annexe auquel je suis associé (voir conclusions et perspectives).

Lors de l'expérience en bacs séparés par souche, les individus ont été maintenus à jeun pendant une semaine. Or, l'alimentation a déjà été montrée comme facteur déterminant dans l'acquisition et la dynamique du microbiote dans plusieurs modèles, comme par exemple les drosophiles (Chandler *et al.*, 2011). Une diète prolongée perturbe fortement leur microbiote, ce qui a des incidences notamment sur leurs comportements de reproduction (Sharon *et al.*, 2011). Dans mon étude, j'ai maintenu un bac d'individus contrôles, de la souche BgBRE, qui ont été nourris *ad libitum* jusqu'à échantillonnage (une semaine). Les premières analyses ont révélé une homogénéisation du microbiote chez les individus nourris, avec une plus grande proportion de Tenericutes que chez les individus à jeun. Ceci peut suggérer que la salade utilisée pour nourrir les mollusques contient des organismes appartenant à ce clade. Cela peut également suggérer que des bactéries appartenant aux Tenericutes sont impliquées dans la digestion des aliments.

Comme certains travaux l'ont révélé, certains taxons bactériens peuvent être spécifiques des différents compartiments de l'hôte. C'est le cas du microbiote endémique de l'hémolymphe de certains crustacés (Wang & Wang, 2015). Nombreuses sont les études qui se sont focalisées sur le microbiote du système digestif de leurs modèles, cependant, nous avons choisi de travailler sur le microbiote de l'animal entier. La question de la spécificité tissulaire de ce microbiote demeure donc et pourrait être indicative de l'impact potentiel qu'il a sur les fonctions biologiques de l'hôte. C'est pour cette raison que des individus de la souche BgBRE ont également été maintenus, dans les mêmes conditions que les autres (à jeun pendant une semaine, même densité d'individus), et qu'au moment de l'échantillonnage, ils ont été disséqués sous la loupe binoculaire, et certains de leurs organes ont été individualisés. Nous avons choisi de garder séparément la radula, qui sert à la prise alimentaire des mollusques et qui est à l'extrémité du tube digestif. Ce dernier a également été individualisé, l'œsophage, l'estomac et l'intestin ensemble, séparés de la glande digestive. Le pied, qui est la partie la plus en contact avec l'environnement et qui est recouvert de mucus a également été séparé des autres organes. Le reste des organes a été groupé par individus et congelé. Les premiers résultats ont montré une composition bactérienne similaire entre les différents compartiments, excepté la radula pour laquelle les Bacteroidetes sont beaucoup plus abondantes. La radula étant impliquée dans la prise alimentaire et en contact avec l'environnement, ceci peut suggérer que ce taxon bactérien est particulièrement abondant dans l'environnement ou encore qu'il joue un rôle dans la prise alimentaire et la digestion.

Ces résultats ouvrent la voie de la compréhension de l'interaction entre les mollusques hôtes intermédiaires de *Schistosoma spp.* et leur microbiote. Il s'agit de la première étape essentielle au décryptage de l'interaction tripartite entre le parasite, les mollusques et les microorganismes symbiotiques de ces derniers. En effet, les différents protagonistes interagissent les uns avec les autres, ce qui peut avoir une incidence sur l'ensemble de l'interaction.

Le système immunitaire de l'hôte peut, effectivement, interagir avec son microbiote. Notamment, l'équilibre homéostatique entre l'hôte et le microbiote, de sorte à éviter que ce dernier ne devienne délétère (exemple des coraux et des Symbiodiniaceae (Baker et al., 2018)) peut être maintenu soit par un contrôle par le système immunitaire de l'hôte (Hooper et al., 2012), soit par une tolérance de ce système immunitaire (Pradeu & Vivier, 2017). Dans notre modèle, la dysbiose induite par la perturbation du système immunitaire suite à une infestation (Pinaud et al., 2016; Portet et al., 2018, 2019), puis la résilience du microbiote une fois le système immunitaire basal de l'hôte rétabli suggère un contrôle de

ce dernier sur le maintien de l'homéostasie. Il est possible que l'infestation détourne l'attention du système immunitaire qui maintient l'homéostasie des communautés microbiennes. Celles-ci peuvent alors échapper à sa pression et être modifiées. Le retour du système à un niveau basal, suivi par une résilience du microbiote, suggère qu'il est alors replacé sous le contrôle du système immunitaire (Portet *et al.*, 2018). En somme, le système immunitaire ne serait plus capable de maintenir l'homéostasie après un stress biotique, ce qui engendrerait une dysbiose, et l'ensemble peut entraîner un déséquilibre pouvant affecter la *fitness* de l'hôte (Contijoch *et al.*, 2019).

Le microbiote peut également interagir avec l'immunité de son hôte en produisant des effecteurs immunitaires, comme par exemple des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des peptides antimicrobiens (AMP) (voir I. E. 2.).

Le microbiote et les pathogènes ou parasites peuvent également interférer de plusieurs manières. Ils peuvent agir en synergie, le microbiote en place aidant, par exemple, le parasite à s'établir. Il peut également améliorer son infectivité, comme l'a montré une étude sur le virus o'nyong-nyong pour qui la flore d'*Anopheles sp.* est nécessaire pour maximiser son infectivité (Carissimo *et al.*, 2014). La co-occurrence de symbiotes de tiques avec la présence de pathogènes laisse également supposer qu'une synergie existe entre les deux parties, bien que cela reste encore à confirmer (Moutailler *et al.*, 2016). A l'inverse, les deux protagonistes peuvent avoir des effets antagonistes, comme le microbiote d'*Anopheles sp.* qui réduit la tolérance du système immunitaire de son hôte face à une infestation à *Plasmodium* en augmentant sa tolérance à sa propre présence (Habtewold *et al.*, 2017), ou l'endosymbiote *Wolbachia* capable d'améliorer la résistance des isopodes *Armadillidium vulgare* et *Porcellio dilatatus* face à une infection par des bactéries du genre *Listeria* ou *Salmonella* (Braquart-Varnier *et al.*, 2015). A l'inverse, les pathogènes ou parasites peuvent également manipuler, voire être délétère envers le microbiote, certains réduisant la charge bactérienne d'un organisme, comme le virus de la dengue chez *Aedes sp.* (Ramirez *et al.*, 2012). Les bactéries *Bacillus thuringiensis* sont également capables de modifier le microbiote, ce qui améliore la tolérance de l'hôte *A. aegypti* envers elles (Tetreau *et al.*, 2018).

Enfin, le système immunitaire de l'hôte et les pathogènes interagissent également avec les mécanismes associés à la réponse immunitaire, que le parasite cherche à contourner ou à contrer (voir I. B.). La réponse immunitaire de l'hôte peut également être médiée par le microbiote par une stimulation de celle-ci (voir I. E. 2.), ou par le maintien d'un niveau basal de l'immunité. Cela a été montré chez *Aedes sp.*, dont le microbiote maintiendrait la voie

Toll activée ce qui induirait alors une réponse plus rapide et plus efficace face au virus de la dengue (Ramirez et al., 2012; Xi et al., 2008).

Afin de déchiffrer l'interaction tripartite entre le parasite *Schistosoma*, son hôte intermédiaire *B. glabrata* et le microbiote bactérien de ce dernier, une partie de ma thèse a été consacrée à l'analyse de la dynamique du microbiote au cours d'une infestation. Nous avons choisi d'étudier cette dynamique en utilisant plusieurs combinaisons hôte-parasite présentant des profils de compatibilité différents, car ces différences suggèrent des capacités immunitaires variées entre les souches. Par exemple, la composition microbienne de la souche BS90 des mollusques très incompatible à l'infestation, à l'état naïf est très différente de celle des autres souches de *B. glabrata*. Il est possible que la réponse immunitaire de cette souche soit très efficace et que l'on observe une forte modification des communautés bactériennes au moment de l'infestation. A l'inverse, il se peut que la différence de composition du microbiote traduise d'un niveau immunitaire basal déjà très élevé, et que l'infestation ne provoque pas de modifications très fortes. Dans ce cas, le microbiote ne serait pas modifié par la présence des parasites.

Il s'agit ici de la première étude de la réponse du microbiote face à une infestation parasitaire en prenant le phénotype de compatibilité en compte. En effet, nos précédents travaux ont analysé cette réponse chez BgBRE mis au contact de sa souche sympatrique de parasite, et d'une souche allopatrique (Portet et al., 2018). Cette étude a montré une perturbation de la flore bactérienne au cours de l'infestation, différente selon les combinaisons. Dans le cadre de ma thèse l'analyse de la dynamique du microbiote dans des combinaisons sympatriques et allopatriques, cette fois en faisant varier à la fois la souche du parasite, mais aussi la souche des mollusques, a permis d'étudier l'impact de la co-évolution et les différences d'interactions immunobiologiques entre les deux protagonistes sur la perturbation bactérienne. En effet, nous savons que la nature sympatrique ou allopatrique des interactions influe sur le type de réponse immunitaire induite (Portet et al., 2019) et nous supposons que le système immunitaire joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie du microbiote (Pinaud et al., 2016; Portet et al., 2018, 2019). L'étude de la dynamique du microbiote bactérien au cours d'une cinétique d'infestation, dans des combinaisons sympatriques et allopatriques est donc un nouveau pas en avant dans la compréhension de l'interaction tripartite.

De nombreuses études ont démontré le rôle des symbiotes dans les interactions hôte/parasite de différents modèles (voir I. E. 2.). Dans notre modèle, nous cherchons à caractériser un lien éventuel de cause à effet entre le microbiote et la compatibilité des combinaisons hôte-parasite. Or, par exemple, les résultats de caractérisation ont

démontré la présence de bactéries appartenant au phylum des Actinobacteria, dont on sait qu'elles ont un rôle dans la production de molécules antimicrobiennes. Nous avons notamment identifié des séquences du genre *Streptomyces*, connu pour sa capacité à produire de nombreux métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes. Il ne s'agit là que d'un genre et d'un phylum bactérien, connus pour leurs produits antimicrobiens, mais il se peut également que parmi les communautés identifiées, d'autres taxa aient des capacités antimicrobiennes ou de compétition. Le rôle ou l'impact du microbiote d'un organisme a souvent été déterminé grâce à l'utilisation de traitements antibiotiques (voir I. E. 2.). L'induction d'une dysbiose du microbiote de *B. glabrata*, suivie d'une infestation parasitaire devrait donc permettre, grâce à l'analyse du phénotype de compatibilité, de définir un lien de cause à effet entre le microbiote et la réponse immunitaire de son hôte mollusque.

Ce lien pourrait être dû à des interactions longues entre les mollusques et le microbiote. En effet, ces interactions longues peuvent conduire à l'acquisition d'avantages sélectifs. Par ailleurs, il existe de nombreux exemples de transferts de gènes entre organismes, comme par exemple l'intégration de séquences de virus dans le génome de lépidoptères, qui serviraient de support à des transferts de gènes entre ces insectes, et des guêpes parasitoïdes dont ils sont la proie (Gasmi *et al.*, 2015). Dans le cas du modèle *B. glabrata*, les mollusques sont capables de synthétiser une toxine formant des pores β , la Biomphalysine, identifiée il y a quelques années au laboratoire (Galinier *et al.*, 2013) et efficace dans la lutte contre *S. mansoni*. Or, il se trouve que la structure de cette toxine est très similaire à des toxines naturellement exprimées chez des bactéries du genre *Clostridium* et *Aeromonas*, deux genres bactériens qui se retrouvent, par ailleurs, parmi les communautés bactériennes des escargots, suggérant qu'il y a potentiellement eu des transferts de gènes entre le microbiote et l'hôte mollusque (Pinaud *et al.*, *in prep.*). Outre les effets bénéfiques que le microbiote peut avoir, il existe des exemples dans lesquels les microorganismes associés à un hôte peuvent, au contraire, être délétères. L'endosymbiote du genre *Wolbachia* est bien connu pour sa prévalence inégalée dans le règne animal et ses capacités à fortement impacter la reproduction de ses hôtes, en induisant divers processus, tels que l'incompatibilité cytoplasmique, la féminisation des mâles, la mort sélective des mâles (*male-killing*) ou encore l'induction de la parthénogenèse chez les femelles infectées (Werren *et al.*, 2008). Ces bactéries sont également capables de moduler l'immunocompétence de leurs hôtes isopodes, en diminuant la quantité d'hémocytes produits par les femelles qu'elles infectent (Braquart-Varnier *et al.*, 2008). Le décryptage du rôle du microbiote bactérien dans notre modèle pourrait donc tout aussi bien nous révéler une synergie entre ces communautés bactériennes et les parasites,

améliorant ainsi leurs capacités d'infestation. Le parasite pourrait également, au cours de son intrusion dans le mollusque, entraîner avec lui des bactéries capables de l'aider à s'introduire dans les tissus.

Afin de tester le lien entre le microbiote et l'immunité antiparasitaire des mollusques, nous avons mis les mollusques de la souche BgBAR en contact avec des antibiotiques, puis analysé les prévalences et intensités des infestations parasitaires. Bien que les résultats préliminaires de cette partie de ma thèse ne soient pas très robustes (faibles effectifs d'échantillons, nécessité de mises au point pour les qPCR, peu de conditions différentes), les traitements antibiotiques et la dysbiose qu'ils induisent ont bel et bien un effet sur l'efficacité de l'infestation parasitaire. L'intensité de l'infestation par la souche sympatrique, SmLE, est, en effet, diminuée après les traitements antibiotiques et la dysbiose qu'elle induit, bien que la prévalence reste inchangée. La coévolution des deux protagonistes et les adaptations locales qu'elle a induites pourraient expliquer que la stratégie d'implantation du parasite soit déstabilisée face à un hôte dont l'immunité et les communautés bactériennes ont été modifiées. Malgré cela, cette souche est très virulente (Moné *et al.*, 2010a), ce qui explique que la prévalence ne soit pas modifiée. A l'inverse, la souche allopatrique SmBRE, qui n'a pas coévolué avec la souche de mollusque, pourrait profiter de la perturbation de l'immunité et du microbiote de l'hôte pour mieux s'implanter, ce qui expliquerait l'amélioration de la prévalence. Enfin, la souche SmGH2 a été décrite comme peu performante (Moné *et al.*, 2010a), et malgré sa coévolution avec sa propre souche sympatrique BgGUA et les adaptations spécifiques associées, moins de 50% des individus de ces mollusques sont infestés (Theron *et al.*, 2014). Les perturbations du microbiote et de l'immunité de l'hôte, par les traitements antibiotiques, ne semblent pas suffisantes à améliorer ses capacités d'infestation, la prévalence et l'intensité ne sont donc pas modifiées.

Ces différences peuvent être liées aux modifications du microbiote de l'hôte que les traitements induisent. La dysbiose par les traitements antibiotiques a, en effet, bel et bien été confirmée sur la charge totale de 16S et sur certains taxa bactériens spécifiques. Un effet direct des antibiotiques sur l'immunité de l'hôte pourrait également agir sur l'expression de gènes immunitaires par exemple.

L'analyse du différentiel d'expression de gènes impliqués dans l'immunité du mollusque permettrait également d'étudier la perturbation du système immunitaire suite aux traitements antibiotiques, et l'utilisation du système CRISPR-Cas9 ou de RNAi, de déterminer s'il s'agit d'un effet direct ou indirect du microbiote. Ces techniques pourraient notamment être utilisées pour modifier ou inactiver des gènes impliqués dans le contrôle bactérien,

comme les AMP. La Biomphamacyne semble un bon candidat, étant celle dont l'expression varie le plus au cours de la dysbiose (voir II. C. 1.) Les traitements pourraient également être plus forts, avec une augmentation des doses ou l'utilisation de cocktails et ainsi perturber le microbiote de manière plus drastique. Les familles bactériennes cultivables identifiées dans une étude précédente se sont notamment toutes révélées sensibles au meropenem (Silva *et al.*, 2013), ce traitement pourrait donc être envisagé. En parallèle et pour continuer le décryptage du lien entre le microbiote et l'immunité de l'hôte, une autre étude a consisté en l'analyse du microbiote en fonction du profil de compatibilité. Deux sous-populations de la souche BgBAR ont été sélectionnées en laboratoire, l'une sensible (90% de prévalence) et l'autre résistante (15% de prévalence) face à la souche SmVEN de parasite. La comparaison des communautés bactériennes de ces différentes populations, en comparaison avec la population d'origine (55%) a démontré une spécificité du microbiote au phénotype de compatibilité à l'état naïf. L'étude de la dynamique de ces communautés au cours d'une infestation n'a, en revanche, pas montré de dysbiose claire induite par la présence du parasite. Les analyses doivent être approfondies et la composition du microbiote étudiée plus précocement après l'infestation afin de déterminer si une dysbiose se met en place comme observé précédemment (voir III. B.). La spécificité observée pourrait être l'indication d'un lien entre la compatibilité et le microbiote. Il est possible que des familles bactériennes spécifiques soient essentielles à une immunité plus efficace contre le parasite. Il se peut également que le niveau basal de l'immunité soit différent entre les souches, impactant l'homéostasie avec le microbiote et donc sa composition. Enfin, l'hypothèse que la sélection des populations a induit la sélection d'un microbiote particulier n'est également pas à exclure. La sélection de phénotypes sensibles et résistants dans d'autres souches de mollusques et l'étude du niveau d'expression de gènes immunitaires, comme les AMP, permettraient d'approfondir ces résultats.

VI. Conclusion et perspectives

Tout au long de mes travaux de thèse, j'ai étudié le microbiote dans le contexte de l'interaction tripartie avec les hôtes intermédiaires et leurs parasites du genre *Schistosoma*, vecteur de la bilharziose. Les résultats que j'ai obtenus ont apporté de nouvelles clefs dans la compréhension de ce modèle et ouvrent de nouvelles voies à explorer dans la lutte contre ce parasite. En effet, si le rôle du microbiote dans la réponse immunitaire antiparasitaire des mollusques parvient à être clairement établi, des applications sont envisageables dans le développement d'outils de médiation vectorielle comme des transfections de microbiote de souches résistantes à des souches sensibles.

Il faut cependant garder à l'esprit que ces expériences ont été menées sur des animaux élevés en laboratoires depuis de nombreuses générations et que les résultats ne reflètent pas la réalité dans le milieu naturel. De nouvelles expérimentations doivent être envisagées à partir d'animaux échantillonnés directement du terrain pour envisager le développement d'applications dans la lutte contre le parasite. C'est justement le but d'une étude préliminaire à laquelle j'ai été associée, et dont l'objectif est de caractériser le microbiote bactérien d'individus de l'espèce *Bulinus truncatus* échantillonnés dans différentes zones de Corse. Cette première étude pourrait nous donner un aperçu de la composition et de la spécificité des communautés bactériennes entre différentes populations de Corse, ouvrant ainsi la voie à la compréhension des interactions tripartite parasite-hôte-microbiote dans le milieu naturel. L'étude menée par Ducklow et ses collaborateurs sur la souche guadeloupéenne de *B. glabrata* a démontré que les individus de laboratoire avaient une densité bactérienne plus forte que ceux échantillonnés sur le terrain (Ducklow et al., 1979). Les auteurs ont fait l'hypothèse d'une corrélation entre la densité de bactéries du microbiote et la densité d'individus par souche, ce qui suggère des transferts entre individus. Les résultats menés sur une souche brésilienne ont révélé des résultats similaires, avec une forte différence de diversité bactérienne entre individus de laboratoire et individus sauvages (Silva et al., 2013).

Certaines bactéries pathogènes transgéniques ont été développées, comme *Bacillus thuringiensis* intégrées dans des cultures pour agir comme insecticide naturel (grâce à des toxines qu'elles produisent) (Bravo et al., 2011). La sélection de bactéries transgéniques dont les gènes sont capables d'exprimer des produits délétères pour le schistosome est donc envisageable dans notre modèle, dans l'objectif de réduire la prévalence des infestations. Le développement d'outils de médiation vectorielle revêt, en effet, une grande importance, dans notre modèle donc l'un des protagonistes est le responsable de la deuxième zoonose mondiale. Cependant, il reste encore beaucoup à apprendre sur

l'interaction entre le schistosome, son hôte intermédiaire Planorbidae et le microbiote de ce dernier.

Nous avons choisi de nous focaliser sur le rôle du microbiote dans la réponse immunitaire de son hôte mollusque dans le contexte de l'interaction hôte/parasite. Il est pourtant possible que les communautés microbiennes soient impliquées dans une autre fonction physiologique, telle que l'assimilation de nutriments, le développement etc, qui auraient potentiellement un impact indirect sur l'immunité des mollusques. En effet, si certaines familles bactériennes améliorent la *fitness* de l'hôte par leur implication dans l'assimilation ou la production de nutriments par exemple, les capacités immunitaires de celui-ci pourraient alors s'en trouver améliorées, lui garantissant une meilleure défense contre les parasites. L'implication du microbiote dans le développement de son hôte a déjà été démontrée, notamment chez le moustique (Wang *et al.*, 2018). Dans ce modèle, le microbiote est également connu pour impacter les interactions hôtes-pathogènes (Engel & Moran, 2013; Jupatanakul *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication du microbiote dans le développement larvaire des mollusques et d'explorer l'existence d'une corrélation avec l'interaction hôte-parasite. L'étude de l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques des escargots, et leur variation suite à une dysbiose pourrait notamment permettre la mise en évidence de l'implication des microorganismes dans ces fonctions.

VII. Bibliographie

- Abdelrhman, K. F., Bacci, G., Marras, B., Nistri, A., Schintu, M., Ugolini, A., & Mengoni, A. (2017). Exploring the bacterial gut microbiota of supralittoral talitrid amphipods. *Research in Microbiology*, 168, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.009>
- Abu-Shakra, M., Buskila, D., & Shoenfeld, Y. (1999). Molecular mimicry between host and pathogen: examples from parasites and implication. In *Immunology Letters* (Vol. 67).
- Adamo, S. A. (1998). The Specificity of Behavioral Fever in the Cricket *Acheta domesticus*. *The Journal of Parasitology*, 84(3), 529–533.
- Adema, C. M., Hillier, L. W., Jones, C. S., Loker, E. S., Knight, M., Minx, P., Oliveira, G., Raghavan, N., Shedlock, A., Rodrigues do Amaral, L., Arican-Goktas, H. D., Assis, J. G., Baba, E. H., Baron, O. L., Bayne, C. J., Bickham-Wright, U., Biggar, K. K., Blouin, M., Bonning, B. C., ... Wilson, R. K. (2017). Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. *Nature Communication*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15451>
- 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 of the United States of America*, 94(16), 8691–8696. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8691>
- Adema, C M, Van Deutekom-Mulder, E. C., Van Der Knaap, W. P. W., & Sminia, W. T. (1994). Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology*, 109, 479–485. <https://doi.org/10.1017/S0031182000080732>
- Adema, Coen M, Hanington, P. C., Lun, C.-M., Rosenberg, G. H., Aragon, A. D., Stout, B. A., Richard, M. L. L., Gross, P. S., & Loker, E. S. (2010). Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Mol Immunol*, 47(4). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.10.019>
- Ahn, J. H., Hong, I. P., Bok, J. I., Kim, B. Y., Song, J., & Weon, H. Y. (2012). Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50(5), 735–745. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-2188-0>
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6, 562–565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Allan, E. R. O., & Blouin, M. S. (2017). The behavioral effects of antibiotic treatment on the snail

Biomphalaria glabrata. *PeerJ*, 5, e4171. <https://doi.org/10.7717/peerj.4171>

Allan, E. R. O., Tennessen, J. A., Sharpton, T. J., & Blouin, M. S. (2018). Allelic variation in a single genomic region alters the microbiome of the snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Heredity*, 1–6. <https://doi.org/10.1093/jhered/esy014>

Alonso, D., Muñoz, J., Gascón, J., Valls, M. E., & Corachan, M. (2006). Short report: Failure of standard treatment with praziquantel in two returned travelers with *Schistosoma haematobium* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(2), 342–344. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.342>

Altincicek, B., Knorr, E., & Vilcinskas, A. (2008). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.005>

Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Immanual, D., Prabhu, G., Vasan, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., & Vendan, S. E. (2010). Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science*, 10(107).

Arala-Chaves, M., & Sequeira, T. (2000). Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture*, 191, 247–258.

Ardila-Garcia, A. M., & Fast, N. M. (2012). Microsporidian Infection in a Free-Living Marine Nematode. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1544–1551. <https://doi.org/10.1128/EC.00228-12>

Attardo, G. M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U. H., Yildirim, S., & Aksoy, S. (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein production, symbiont populations and fecundity. *J Insect Physiol*, 54(8), 1236–1242. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.06.008>

Auguste, M., Lasa, A., Pallavicini, A., Gualdi, S., Vezzulli, L., & Canesi, L. (2019). Exposure to TiO₂ nanoparticles induces shifts in the microbiota composition of *Mytilus galloprovincialis* hemolymph. *Science of the Total Environment*, 670, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.133>

Augustin, R., Schröder, K., Murillo Rincón, A. P., Fraune, S., Anton-Erxleben, F., Herbst, E.-M., Wittlieb, J., Schwentner, M., Grötzinger, J., Wassenaar, T. M., & Bosch, T. C. G. (2017). A secreted antibacterial neuropeptide shapes the microbiome of *Hydra*. *Nature Communication*, 8(698). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00625-1>

Bacchetti De Gregoris, T., Aldred, N., Clare, A. S., & Burgess, J. G. (2011). Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), 351–356.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>

- Baker, D. M., Freeman, C. J., Wong, J. C. Y., Fogel, M. L., & Knowlton, N. (2018). Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *The ISME Journal*, *12*, 921–930. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0046-8>
- Bakula, M. (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *14*, 365–374.
- Balseiro, P., Moreira, R., Chamorro, R., Figueras, A., & Novoa, B. (2013). Immune responses during the larval stages of *Mytilus galloprovincialis*: Metamorphosis alters immunocompetence, body shape and behavior. *Fish & Shellfish Immunology*, *35*, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.044>
- Baron, O. L., van West, P., Industri, B., Ponchet, M., Dubreuil, G., Gourbal, B., Reichhart, J. M., & Coustau, C. (2013). Parental Transfer of the Antimicrobial Protein LBP/BPI Protects *Biomphalaria glabrata* Eggs against Oomycete Infections. *PLoS Pathogens*, *9*(12), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003792>
- Bathige, S. D. N. K., Umasuthan, N., Whang, I., Lim, B. S., Won, S. H., & Lee, J. (2014). Antibacterial activity and immune responses of a molluscan macrophage expressed gene-1 from disk abalone, *Haliotis discus discus*. *Fish and Shellfish Immunology*, *39*(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.012>
- Bayne, C. J., & Hahn, U. K. (2001). Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology*, *123*, S159–S167. <https://doi.org/10.1017/S0031182001008137>
- Bayne, C. J., & Owczarzak, A. (1975). In vitro cultivation of cells and microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, *266*, 513–552.
- Beard, C. B., Cordon-Rosales, C., & Durvasula, R. V. (2002). Bacterial symbionts of the Triatominae and their potential use in control of chagas disease transmission. *Annu. Rev. Entomol.*, *47*, 123–141.
- Beebee, T. J. C., & Wong, A. L.-C. (1992). Prototheca-mediated interference competition between anuran larvae operates by resource diversion. *Physiological Zoology*, *65*(4), 815–831. <https://doi.org/10.1086/physzool.65.4.30158541>
- Beier, M. S., Pumpuni, C. B., Beier, J. C., & Davis, J. R. (1994). Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, *31*(4), 561–565. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.4.561>

- Berg, M., Monnin, D., Cho, J., Nelson, L., Crits-Christoph, A., & Shapira, M. (2019). TGF β /BMP immune signaling affects abundance and function of *C. elegans* gut commensals. *Nature Communication*, 10(604). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08379-8>
- Bettarel, Y., Bouvier, T., Nguyen, H. K. im, & Thu, P. T. he. (2015). The versatile nature of coral-associated viruses. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3433–3439. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12579>
- Blackstone, N. W., & Golladay, J. M. (2018). Why Do Corals Bleach? Conflict and Conflict Mediation in a Host/Symbiont Community. *BioEssays*, 40(1800021), 1–10. <https://doi.org/10.1002/bies.201800021>
- Blanford, S., & Thomas, M. B. (1999). Host thermal biology: the key to understanding host–pathogen interactions and microbial pest control? *Agricultural and Forest Entomology*, 1, 195–202.
- Blankespoor, H. D., & van der Schalie, H. (1976). Attachment and penetration of miracidia observed by scanning electron microscopy. *Science*, 191, 291–293. <https://doi.org/10.1126/science.1246613>
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., & Andreas, D. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion in Immunology*, 1–16.
- Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., Shahbazkia, H. R., Awono-Ambene, P. H., Levashina, E. A., Christen, R., & Morlais, I. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002742. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002742>
- Botros, S., Sayed, H., Amer, N., El-Ghannam, M., Bennett, J. L., & Day, T. A. (2005). Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. *International Journal for Parasitology*, 35, 787–791. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.02.005>
- Bouchut, A., Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Coustau, C., & Mitta, G. (2008). The compatibility polymorphism in invertebrate host/trematodes interactions: research of molecular determinants. *Parasite*, 15, 304–309. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153304>
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S., Sun, S., Rossmann, M. G., Suzan-Monti, M., La Scola, B., Koonin, E. V, & Raoult, D. (2009). Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *PNAS*, 106(51), 21848–21853. www.pnas.org/cgi/content/full/

- 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(1388). <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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003286>
- Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol*, 41(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>
- Brener-Raffalli, K., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Bonhomme, F., Pratlong, M., Aurelle, D., Mitta, G., & Toulza, E. (2018). Thermal regime and host clade, rather than geography, drive Symbiodinium and bacterial assemblages in the scleractinian coral Pocillopora damicornis sensu lato. *Microbiome*, 6(39), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0423-6>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2011). The roles of host evolutionary relationships (genus: Nasonia) and development in structuring microbial diversity. *Evolution*, 66(2), 349–362. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2012). Speciation by symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, 27, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.03.011>
- Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2013). The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus Nasonia. *Science*, 341, 667–669. <https://doi.org/10.1126/science.1251997>
- Buchon, N., Broderick, N. A., & Lemaitre, B. (2013). Gut homeostasis in a microbial world: insights from Drosophila melanogaster. *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*, 11, 615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3074>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster—from microbial recognition to whole-organism physiology HHS Public Access. *Nat Rev Immunol*, 14(12), 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Buckling, A., & Rainey, P. B. (2002). The role of parasites in sympatric and allopatric host diversification. *Nature*, 420, 496–499. <https://doi.org/10.1038/nature01164>
- Bundey, S., Raymond, S., Dean, P., Roberts, S. K., Dillon, R. J., & Charnley, A. K. (2003). Eicosanoid involvement in the regulation of behavioral fever in the desert locust, Schistocerca gregaria. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52, 183–192.

<https://doi.org/10.1002/arch.10081>

- Burke, G. R., Walden, K. K. O., Whitfield, J. B., Robertson, H. M., & Strand, M. R. (2018). Whole genome sequence of the parasitoid wasp *Microplitis demolitor* that harbors an endogenous virus mutualist. *Genes | Genomes | Genetics*, *8*, 2875–2880.
<https://doi.org/10.1534/g3.118.200308>
- Butt, D., & Raftos, D. (2008). Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental and Comparative Immunology*, *32*, 299–306.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.06.006>
- Campos, R., Baillot Moreira, A. A., Sette, H., Fischer Chamone, D. A., & da Silva, L. C. (1976). Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *70*(3), 261–262.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(76\)90061-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(76)90061-4)
- Carissimo, G., Pondeville, E., Mcfarlane, M., Dietrich, I., Mitri, C., Bischoff, E., Antoniewski, C., Bourgouin, C., Failloux, A.-B., Kohl, A., & Vernick, K. D. (2014). Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *PNAS*, *112*, E176–E185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412984112>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, *198*, 116–126.
- Chandel, K., Mendki, M. J., Parikh, R. Y., Kulkarni, G., & Tikar, S. N. (2013). Midgut Microbial Community of *Culex quinquefasciatus* Mosquito Populations from India. *PLoS ONE*, *8*(11), 80453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080453>
- Chandler, J. A., Lang, J. M., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., & Kopp, A. (2011). Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genetics*, *7*(9), e1002272. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002272>
- Chandler, J. A., & Turelli, M. (2014). Comment on “The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*.” *Science*, *325*(6200).
<https://doi.org/10.1126/science.1251997>
- Charlier, P., Augias, A., Benmoussa, N., Rainsard, P., Froesch, P., Richardin, P., Froment, A., Bianucci, R., Appenzeller, O., Perciaccante, A., Lippi, D., & Prades, L. (2019). The mandible of Saint-Louis (1270 AD): Retrospective diagnosis and circumstances of death. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, *2018*, 2018–2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.05.007>
- Charlier, Philippe, Bouchet, F., Weil, R., & Bonnet, B. (2016). Schistosomiasis in the mummified

- viscera of Saint-Louis (1270 AD). *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 12(1), 113–114. <https://doi.org/10.1007/s12024-015-9722-4>
- Chaston, J. M., Dobson, A. J., Newell, P. D., & Douglas, A. E. (2016). Host genetic control of the microbiota mediates the *Drosophila* nutritional phenotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 671–679. <https://doi.org/10.1128/AEM.03301-15>
- Cheng, T. C. (1975). Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266, 343–379. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35116.x>
- Chu, H., & Mazmanian, S. K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat Immunol*, 14(7), 668–675. <https://doi.org/10.1038/ni.2635>
- Chudnovskiy, A., Mortha, A., Kana, V., Kennard, A., David Ramirez, J., Rahman, A., Remark, R., Mogno, I., Ng, R., Gnjjatic, S., David Amir, E., Solovyov, A., Greenbaum, B., Clemente, J., Faith, J., Belkaid, Y., Grigg, M. E., & Merad, M. (2016). Host-protozoan interactions protect from mucosal infections through activation of the inflammasome. *Cell*, 167(2), 444–456. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.076>
- Cioli, D. (2000). Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 13(6), 659–663. <https://doi.org/10.1097/00001432-200012000-00014>
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M., & Dimopoulos, G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, 332(6031), 855–858. <https://doi.org/10.1126/science.1201618>
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Garver, L. S., Sim, S., Dimopoulos, G., & Feinstone, W. H. (2010). Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev. Comp. Immunol.*, 34(4), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.005>
- Cirimotich, C. M., Ramirez, J. L., Dimopoulos, G., & Feinstone, W. H. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*, 10(4), 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.006>
- Clay, K., & Fuqua, C. (2010). *The tick microbiome: diversity, distribution and influence of the internal microbial community for a blood-feeding disease vector.*
- Clayton, A. M., Dong, Y., Dimopoulos, G., & Feinstone, W. H. (2014). The *Anopheles* Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection. *J Innate Immun*, 6, 169–181. <https://doi.org/10.1159/000353602>

- Combes, C. (1995). *Interaction Durables. Ecologie et évolution du parasitisme* (E. Masson (ed.)).
- Contijoch, E. J., Britton, G. J., Yang, C., Mogno, I., Li, Z., Ng, R., Llewellyn, S. R., Hira, S., Johnson, C., Rabinowitz, K. M., Barkan, R., Dotan, I., Hirten, R. P., Fu, S.-C., Luo, Y., Yang, N., Luong, T., Labrias, P. R., Lira, S., ... Faith, J. J. (2019). Gut microbiota density influences host physiology and is shaped by host and microbial factors. *ELife*.
<https://doi.org/10.7554/eLife.40553>
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E., & Promislow, D. E. L. (2007). Geographical Distribution and Diversity of Bacteria Associated with Natural Populations of *Drosophila melanogaster*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 73(11), 3470–3479. <https://doi.org/10.1128/AEM.02120-06>
- Coustau, C., Gourbal, B., Duval, D., Yoshino, T. P., Adema, C. M., & Mitta, G. (2015). Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.036>
- Coustau, C., & Théron, A. (2004). Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *TRENDS in Parasitology*, 20(5), 209–210. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.02.006>
- Couto, F. F. B., Coelho, P. M. Z., Araújo, N., Kusel, J. R., Katz, N., Jannotti-Passos, L. K., & Mattos, A. C. A. (2011). *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 106(2), 153–157.
- Cupit, P. M., & Cunningham, C. (2015). What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Issue 6, pp. 701–705). Future Science. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.11>
- Damian, R. T. (1997). Parasite immune evasion and exploitation : reflections and projections. *Parasitology*, 115, S169–S175. <https://doi.org/10.1017/S0031182097002357>
- David, M. R., Barbosa dos Santos, L. M., Paulo Vicente, A. C., & Maciel-de-Freitas, R. (2016). Effects of environment, dietary regime and ageing on the dengue vector microbiota: evidence of a core microbiota throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 111(9), 577–587. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160238>
- de Carvalho Augusto, R., Duval, D., & Grunau, C. (2019). Effects of the environment on developmental plasticity and infection success of *Schistosoma* parasites-an epigenetic perspective. *Frontiers in Microbiology*, 10(1475).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01475>

- De Gregorio, E., Spellman, P. T., Tzou, P., Rubin, G. M., & Lemaitre, B. (2002). The Toll and IMD pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, *21*(11), 2568–2579.
- de Lorgeril, J., Lucasson, A., Petton, B., Toulza, E., Montagnani, C., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Chaparro, C., Galinier, R., Escoubas, J.-M., Haffner, P., Dégremont, L., Charrière, G. M., Lafont, M., Delort, A., Chiarello, M., Faury, N., Rubio, T., Leroy, M. A., ... Mitta, G. (2018). Immune-suppression by OsHV-1 viral infection causes fatal bacteraemia in Pacific oysters. *Nature Communication*, *9*(4215). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06659-3>
- De Souza Dias, L. C., & Olivier, C. E. (1986). Failure at inducing resistance to schistosomicidal drugs in a Brazilian human strain of *Schistosoma mansoni*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, *28*(5), 352–357. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000500010>
- De Vienne, D. M., Refrégier, G., López-Villavicencio, M., Tellier, A., Hood, M. E., & Giraud, T. (2013). Cospeciation vs host-shift speciation: Methods for testing, evidence from natural associations and relation to coevolution. *New Phytologist*, *198*, 347–385. <https://doi.org/10.1111/nph.12150>
- De Vlas, S. J., Engels, D., Rabello, A. L. T., Oostburg, B. F. J., Van Lieshout, L., Polderman, A. M., Van Oortmarsen, G. J., Habbema, J. D. F., & Gryseels, B. (1996). Validation of a chart to estimate true *Schistosoma mansoni* prevalences from simple egg counts. 113–121. <https://doi.org/10.1017/S0031182096008207>
- Deleury, E., Dubreuil, G., Elangovan, N., Wajnberg, E., Reichhart, J. M., Gourbal, B., Duval, D., Baron, O. L., Gouzy, J., & Coustau, C. (2012). Specific versus non-specific immune responses in an invertebrate species evidenced by a comparative de novo sequencing study. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032512>
- Depaquit, J., Akhoundi, M., Haouchine, D., Mantelet, S., & Izri, A. (2019). No limit in interspecific hybridization in schistosomes: observation from a case report. *Parasite*, *26*(10). <https://doi.org/10.1051/parasite/2019010>
- Dheilly, N. M., Duval, D., Mouahid, G., Emans, R., Allienne, J. F., Galinier, R., Genthon, C., Dubois, E., Du Pasquier, L., Adema, C. M., Grunau, C., Mitta, G., & Gourbal, B. (2015). A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, *48*(1), 234–243. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Dikkeboom, R., Bayne, C. J., Van Der Knaap, W. P. W., & Tijnagel, J. M. G. H. (1988). Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by

- hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol Res*, 75, 148–154.
- Dillon, R. J., Vennard, C. T., Buckling, A., & Charnley, A. K. (2005). Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecology Letters*, 8, 1291–1298.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00828.x>
- Dinh, C., Farinholt, T., Hirose, S., Zuchenko, O., & Kuspa, A. (2018). Lectins modulate the microbiota of social amoebae. *Science*, 361(6400), 402–406.
<https://doi.org/10.1126/science.aar5723>
- Dittmer, J., Ome Lesobre, J., Moumen, B., & Bouchon, D. (2016). Host origin and tissue microhabitat shaping the microbiota of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *FEMS Microbiology Ecology*, 92. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw063>
- Doenhoff, M. J., Cioli, D., & Utzinger, J. (2008). Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. In *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 21, Issue 6, pp. 659–667). <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328318978f>
- Doenhoff, M. J., Kusel, J. R., Coles, G. C., & Cioli, D. (2002). Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 465–469. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90405-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90405-0)
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., Dimopoulos, G., & Feinstone, W. H. (2006). *Anopheles gambiae* Immune Responses to Human and Rodent Plasmodium Parasite Species. *PLoS Pathogens*, 2(6), 513–525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020052>
- Dong, Y., Manfredini, F., & Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathogens*, 5(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000423>
- Douglas, A. E. (1992). Requirement of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) for their symbiotic bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 65(2), 195–198.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1992.tb01643.x>
- Douglas, A. E., & Werren, J. H. (2016). Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *MBio Asm*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02099-15>
- Ducklow, H. W., Boyle, P. J., Mangel, P. W., Strong, C., & Mitchell, R. (1979). Bacterial flora of the schistosome vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), 667–672.
- Ducklow, H. W., Clausen, K., & Mitchell, R. (1981). Ecology of bacterial communities in the schistosomiasis vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Microbial Ecology*, 7(3), 253–274.
<https://doi.org/10.1007/BF02010308>

- Dunn, T. S., & Yoshino, T. P. (1988). *Schistosoma mansoni*: Origin and Expression of a Tegumental Surface Antigen on the Miracidium and Primary Sporocyst. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*, 67, 167–181.
- Duval, D., Galinier, R., Mouchid, G., Toulza, E., Allienne, J. F., Portela, J., Calvayrac, C., Rognon, A., Arancibia, N., Mitta, G., Théron, A., & Gourbal, B. (2015). A Novel Bacterial Pathogen of *Biomphalaria glabrata*: A Potential Weapon for Schistosomiasis Control? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003489>
- Early, A. M., Shanmugarajah, N., Buchon, N., & Clark, A. G. (2017). *Drosophila* genotype influences commensal bacterial levels. *PLoS One*, 12(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170332>
- Egerton, F. N. (2015). History of ecological sciences, part 52: symbiosis studies. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 96(1), 80–139.
- Eichler, S., & Schaub, G. A. (2002). Development of Symbionts in Triatomine Bugs and the Effects of Infections with Trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, 100, 17–27.
<https://doi.org/10.1006/expr.2001.4653>
- El Chamy, L., Leclerc, V., Caldelari, I., & Reichhart, J.-M. (2008). Danger signal and PAMP sensing define binary signaling pathways upstream of Toll. *Nat Immunol*, 9(10), 1165–1170. <https://doi.org/10.1038/ni.1643>
- Ellegaard, K. M., & Engel, P. (2016). Beyond 16S rRNA Community Profiling: Intra-Species Diversity in the Gut Microbiota. *Front. Microbiol.*, 7(1475).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01475>
- Engel, P., James, R. R., Koga, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., & Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52(4). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>
- Engel, Philipp, Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS*, 109(27), 11002–11007.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1202970109>
- Engel, Philipp, & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 699–735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Erban, T., Ledvinka, O., Kamler, M., Hortova, B., Nesvorna, M., Tyl, J., Titera, D., Markovic, M., & Hubert, J. (2017). Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ*, 5(e3816). <https://doi.org/10.7717/peerj.3816>

- Erban, T., Ledvinka, O., Kamler, M., Nesvorna, M., Hortova, B., Tyl, J., Titera, D., Markovic, M., & Hubert, J. (2017). Honeybee (*Apis mellifera*)- associated bacterial community affected by American foulbrood: detection of *Paenibacillus* larvae via microbiome analysis. *Scientific Reports*, 7(5084). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05076-8>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2017). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Fallon, P. G., & Doenhoff, M. J. (1994). Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxfamiquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(1), 83–88. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.83>
- Fallon, Padraic G. (1998). Schistosome resistance to praziquantel. In *Drug Resistance Updates* (Vol. 1, Issue 4, pp. 236–241). [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80004-6)
- Fernandes, C. F., & Shahani, K. M. (1990). Anticarcinogenic and immunological properties of dietary Lactobacilli. *Journal of Food Protection*, 53(8), 704–710. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.8.704>
- Fernandez-Piquer, J., Bowman, J. P., Ross, T., & Tamplin, M. L. (2011). Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 1134–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05287.x>
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2009). Antibiotics For Emerging Pathogens. *Science*, 325(5944), 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>
- Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z., & Rakoff-Nahoum, S. (2017). The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*, 548(7665), 43–51. <https://doi.org/10.1038/nature23292>
- Franzenburg, S., Walter, J., Künzel, S., Wang, J., Baines, J. F., Bosch, T. C. G., & Fraune, S. (2013). Distinct antimicrobial peptide expression determines host species-specific bacterial associations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 110(39), E3730–E3738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304960110>
- Fraune, S., Augustin, R., & Bosch, T. C. G. (2011). Embryo protection in contemporary immunology : Why bacteria matter. *Communicative & Integrative Biology*, 4(4), 369–372.
- Fraune, Sebastian, & Bosch, T. C. G. (2007). Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *PNAS*, 104(32), 13146–13151.

- Fraune, Sebastian, & Zimmer, M. (2008). Host-specificity of environmentally transmitted Mycoplasma-like isopod symbionts. *Environmental Microbiology*, *10*(10), 2497–2504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01672.x>
- Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, J. A., Navarrete, P., & Gotteland, M. (2017). The Gut Microbiota of Healthy Chilean Subjects Reveals a High Abundance of the Phylum Verrucomicrobia. *Front. Microbiol*, *8*, 1221. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01221>
- Galinier, R., Portela, J., Moné, Y., Allienne, J. F., Henri, H., Delbecq, S., Mitta, G., Gourbal, B., & Duval, D. (2013). Biomphalysin, a New β Pore-forming Toxin Involved in Biomphalaria glabrata Immune Defense against Schistosoma mansoni. *PLoS Pathogens*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003216>
- Galinier, R., Roger, E., Moné, Y., Duval, D., Portet, A., Pinaud, S., Chaparro, C., Grunau, C., Genthon, C., Dubois, E., Rognon, A., Arancibia, N., Dejean, B., Théron, A., Gourbal, B., & Mitta, G. (2017). A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between Biomphalaria glabrata and Schistosoma mansoni. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005398>
- Galinier, R., Tetreau, G., Portet, A., Pinaud, S., Duval, D., & Gourbal, B. (2017). First characterization of viruses from freshwater snails of the genus Biomphalaria, the intermediate host of the parasite Schistosoma mansoni. *Acta Tropica*, *167*, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.021>
- Gall, C. A., Reif, K. E., Scoles, G. A., Mason, K. L., Mousel, M., Noh, S. M., & Brayton, K. A. (2016). The bacterial microbiome of Dermacentor andersoni ticks influences pathogen susceptibility. *The ISME Journal*, *10*, 1846–1855. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.266>
- Garcia, A. B., Pierce, R. J., Gourbal, B., Werkmeister, E., Colinet, D., Reichhart, J.-M., Dissous, C., & Coustau, C. (2010). Involvement of the Cytokine MIF in the Snail Host Immune Response to the Parasite Schistosoma mansoni. *PLoS Pathogens*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001115>
- Gasmi, L., Boulain, H., Gauthier, J., Hua-Van, A., Musset, K., Jakubowska, A. K., Aury, J.-M., Volkoff, A.-N., Huguet, E., Herrero, S., & Drezen, J.-M. (2015). Recurrent domestication by Lepidoptera of genes from their parasites mediated by Bracoviruses. *PLoS Genetics*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005470>
- Gendrin, M., Turlure, F., Rodgers, F. H., Cohuet, A., Morlais, I., & Christophides, G. K. (2017). The Peptidoglycan Recognition Proteins PGRPLA and PGRPLB regulate Anopheles immunity

- to bacteria and affect infection by Plasmodium. *J Innate Immun*, 9, 333–342.
<https://doi.org/10.1159/000452797>
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42(611–643), 159–166.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.08.002> Psychological
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., Hoffmann, J. A., & Ferrandon, D. (2003). Dual Activation of the Drosophila Toll Pathway by Two Pattern Recognition Receptors. *Science*, 302, 2126–2130.
<https://doi.org/10.1126/science.1088697>
- Goodfellow, M., & Williams, S. T. (1983). ECOLOGY OF ACTINOMYCETES. In *Ann. Rev. Microbial* (Vol. 37).
- Gordon, J., Knowlton, N., Relman, D. A., Rohwer, F., & Youle, M. (2013). Superorganisms and holobionts. *Microbe*, 8(4), 152–153. <https://doi.org/10.1128/microbe.8.152.1>
- Gordy, M. A., Pila, E. A., & Hanington, P. C. (2015). The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 46(1), 39–49.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.03.005>
- Gouvras, A. N., Kariuki, C., Koukounari, A., Norton, A. J., Lange, C. N., Ileri, E., Fenwick, A., Mkoji, G. M., & Webster, J. P. (2013). The impact of single versus mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* infections on morbidity profiles amongst school-children in Taveta, Kenya. *Acta Tropica*, 128(2), 309–317.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.01.001>
- Grant, R. C., Harwood, S. J., & Wells, R. D. (1968). The Synthesis and Characterization of Poly d(I-C)-Poly d(I-C). *Journal of the American Chemical Society*, 90(16), 4474–4476.
<https://doi.org/10.1021/ja01018a060>
- Greenberg, R. M. (2013). New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. In *Parasitology* (Vol. 140, Issue 12, pp. 1534–1546).
<https://doi.org/10.1017/S0031182013000231>
- Guégan, M., Zouache, K., Démichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., Mavingui, P., & Valiente Moro, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0435-2>
- Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. *International Microbiology*, 16(3), 133–143.
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188>

- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., & Coustau, C. (2007). Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Developmental and Comparative Immunology*, *31*, 657–671. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.10.001>
- Guo, J., Wu, J., Chen, Y., Evans, J. D., Dai, R., Luo, W., & Li, J. (2015). Characterization of gut bacteria at different developmental stages of Asian honey bees, *Apis cerana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *127*, 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.03.010>
- Guo, X., Xia, X., Tang, R., Zhou, J., Zhao, H., & Wang, K. (2008). Development of a real-time PCR method for *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology*, *47*(5), 367–373. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02408.x>
- Habtewold, T., Groom, Z., & Christophides, G. K. (2017). Immune resistance and tolerance strategies in malaria vector and non-vector mosquitoes. *Parasites & Vectors*, *10*(186). <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2109-5>
- Haeder, S., Wirth, R., Herz, H., & Spiteller, D. (2009). Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. *PNAS*, *106*(12), 4742–4746.
- Hahn, U. K., Bender, R. C., & Bayne, C. J. (2000). Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. *Development and Comparative Immunology*, *24*, 531–541.
- Hahn, U. K., Bender, R. C., & Bayne, C. J. (2001). Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *The Journal of Parasitology*, *87*(2), 292–299. <https://doi.org/10.2307/3285134>
- Hanington, P. C., Forys, M. A., Dragoo, J. W., Zhang, S.-M., Adema, C. M., & Loker, E. S. (2010). Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011242107>
- Hanington, P. C., Lun, C.-M., Adema, M., & Loker, E. S. (2010a). Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Int J Parasitol*, *40*(7), 819–831. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.005>
- Hanington, P. C., Lun, C.-M., Adema, M., & Loker, E. S. (2010b). Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. *Int J Parasitol*, *40*(7), 819–831. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.12.005>

- Hansen, E. L. (1976). A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. In K. Maramorosch (Ed.), *Invertebrate Tissue Culture: Research Applications* (pp. 75–99). Elsevier.
- Harris, K. R. (1975). The Fine Structure of Encapsulation in *Biomphalaria Glabrata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266(1), 446–464. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb35123.x>
- Harris, K. R., & Cheng, T. C. (1975). The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*: light microscopy. *International Journal for Parasitology*, 5, 521–528.
- Hatcher, G. E., & Lambrecht, R. S. (1993). Augmentation of Macrophage Phagocytic Activity by Cell-Free Extracts of selected lactic Acid-Producing Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 76, 2485–2492. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77583-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77583-9)
- Hathaway, J. J. M., Adema, M., Stout, B. A., Mobarak, C. D., & Loker, E. S. (2010). Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca). *Developmental and Comparative Immunology*, 34, 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.001>
- Hernandez-Agreda, A., Gates, R. D., & Ainsworth, T. D. (2017). Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. *Trends in Microbiology*, 25(2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.003>
- Hertel, L. A., Barbosa, C. S., Santos, R. A. A. L., Loker, E. S., Hertel, L. A., Barbosa, S., Santos, R. A. A. L., & Loker, E. S. (2004). *Molecular Identification of Symbionts From the Pulmonate Snail Biomphalaria Glabrata in Brazil* *Molecular Identification of Symbionts From the Pulmonate Snail*. 90(4), 759–763.
- Hertel, L. A., Loker, E. S., & Bayne, C. J. (2002). The symbiont *Capsaspora owczarzaki*, nov. gen. nov. sp., isolated from three strains of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata* is related to members of the Mesomycetozoea. *International Journal for Parasitology*, 32(9), 1183–1191. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00066-8)
- Herwaldt, B. L., Tao, L.-F., Van Pelt, W., Tsang, V. C. W., & Bruce, J. I. (1995). Persistence of *Schistosoma haematobium* Infection Despite Multiple Courses of Therapy with Praziquantel. *Clinical Infection Diseases*, 20(2), 309–315. <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/20/2/309/376761>
- Hester, E. R., Barott, K. L., Nulton, J., Vermeij, M. J., & Rohwer, F. L. (2016). Stable and sporadic symbiotic communities of coral and algal holobionts. *The ISME Journal*, 10, 1157–1169.

<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.190>

- Hildemann, W. H., Raison, R. L., Cheung, G., Hull, C. J., Akaka, L., & Okamoto, J. (1977). Immunological specificity and memory in a scleratinian coral. *Nature*, *270*, 219–223.
- Hoeflich, K. P., & Ikura, M. (2002). Calmodulin in Action: Diversity in Target Recognition and Activation Mechanisms. *Cell*, *108*, 739–742. <http://calcium.uhnres.utoronto>.
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature*, *426*, 33–38.
- Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*, *3*(2), 121–126. <http://immunol.nature.com>
- Hong Li, J., Evans, J. D., Feng Li, W., Zhou Zhao, Y., DeGrandi-Hoffman, G., Kang Huang, S., Guo Li, Z., Hamilton, M., & Ping Chen, Y. (2017). New evidence showing that the destruction of gut bacteria by antibiotic treatment could increase the honey bee's vulnerability to *Nosema* infection. *PLoS One*, *12*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187505>
- Hooper, L. V, Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, *336*(6086), 1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., & Fukatsu, T. (2006). Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol*, *4*(10), 1841–1851. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040337>
- 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), 1002043. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002043>
- Humphries, J. E., & Deneckere, L. E. (2018). Characterization of a Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in *Biomphalaria glabrata* and its potential regulation by NF-kappaB. *Developmental and Comparative Immunology*, *86*, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.003>
- Humphries, J. E., & Yoshino, T. P. (2008). Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* . *Developmental and Comparative Immunology*, *32*, 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.09.001>
- Huot, C., Clerissi, C., Gourbal, B., Galinier, R., Duval, D., Toulza, E., & Gerardo, N. M. (2020). Schistosomiasis Vector Snails and Their Microbiota Display a Phyllosymbiosis Pattern. *Frontiers in Microbiology*, *10*(3092), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03092>
- Huyse, T., Van den Broeck, F., Hellemans, B., Volckaert, F. A. M., & Polman, K. (2013).

- Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. *International Journal for Parasitology*, 43(8), 687–689.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.04.001>
- Iijima, R., Kisugi, J., & Yamazaki, M. (2003). L-Amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. *Development and Comparative Immunology*, 27, 505–512. www.elsevier.com/locate/devcompimm
- Inoue, T., Kitade, O., Yoshimura, T., & Yamaoka, I. (2000). Symbiotic associations with protists. In Y. Abe, D. E. Bignell, & T. Higashi (Eds.), *Termites: Evolution, Sociality, Symbiosis, Ecology* (pp. 275–288). Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.31826/9781463230777-013>
- Ismail, M., Metwally, A., Farghaly, A., Bruce, J., Tao, L. F., & Bennett, J. L. (1996). Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55(2), 214–218. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.214>
- Ittiprasert, W., & Knight, M. (2012). Reversing the resistance phenotype of the *Biomphalaria glabrata* snail host *Schistosoma mansoni* infection by temperature modulation. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002677. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002677>
- Ittiprasert, W., Miller, A., Myers, J., Nene, V., El-Sayed, N. M., & Knight, M. (2010). Identification of immediate response genes dominantly expressed in juvenile resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* snails upon exposure to *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*, 169(1), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.009>
- Janeway Jr, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 1–13. <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129, S3–S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. *Viruses*, 6, 4294–4313. <https://doi.org/10.3390/v6114294>
- Kalappa, D. M., Subramani, P. A., Kanchanahalli Basavanna, S., Ghosh, S. K., Sundaramurthy, V., Urageyala, S., Tiwari, S., Anvikar, A. R., & Valecha, N. (2018). Influence of midgut microbiota in *Anopheles stephensi* on *Plasmodium berghei* infections. *Malaria Journal*, 17(385). <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2535-7>
- Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., & Strohm, E. (2005). Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infection. *Current Biology*, 15, 475–479. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.084>

- Kaltenpoth, Martin. (2009). Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends in Microbiology*, 17(12), 529–535. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.006>
- Kaltz, O., & Shykoff, J. A. (1998). Local adaptation in host-parasite systems. In *Heredity* (Vol. 81).
- Kambris, Z., Blagborough, A. M., Pinto, S. B., Blagrove, M. S. C., & Godfray, H. (2010). Wolbachia Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits Plasmodium Development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathog*, 6(10), 1001143. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001143>
- Kaufman, M. G., & Klug, M. J. (1991). The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Biochem. Physiol*, 98(1), 117–123.
- Kellner, R. L. L. (2002). Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera: Staphylinidae). In *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 32).
- Kietz, C., Pollari, V., & Meinander, A. (2018). Generating germ-free *Drosophila* to study gut-microbe interactions: protocol to rear *Drosophila* under axenic conditions. *Current Protocols in Toxicology*, 77(1). <https://doi.org/10.1002/cptx.52>
- King, G. M., Judd, C., Kuske, C. R., & Smith, C. (2012). Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. *PLoS One*, 7(12), e51475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051475>
- Klein, J. (1997). Homology Between Immune Responses in Vertebrates and Invertebrates: Does it Exist? *Scandinavian Journal of Immunology*, 46(6), 558–564. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1997.d01-164.x>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS808>
- Knight, M., Elhelu, O., Smith, M., Haugen, B., Miller, A., Raghavan, N., Wellman, C., Cousin, C., Dixon, F., Mann, V., Rinaldi, G., Ittiprasert, W., & Brindley, P. J. (2015). Susceptibility of snails to infection with Schistosomes is influenced by temperature and expression of heat shock proteins. *Epidemiology (Sunnyvale)*, 5(2). <https://doi.org/10.4172/2161-1165.1000189>
- Kocan, K. M., De La Fuente, J., Guglielmone, A. A., & Meléndez, R. D. (2003). Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *CLINICAL*

- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19288–19292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110474108>
- Koukounari, A., Donnelly, C. A., Sacko, M., Keita, A. D., Landouré, A., Dembelé, R., Bosqué-Oliva, E., Gabrielli, A. F., Gouvras, A., Traoré, M., Fenwick, A., & Webster, J. P. (2010). The impact of single versus mixed schistosome species infections on liver, spleen and bladder morbidity within Malian children pre- and post-praziquantel treatment. *BMC Infectious Diseases*, 10(227). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-227>
- Koyle, M. L., Veloz, M., Judd, A. M., Wong, A. C.-N., Newell, P. D., Douglas, A. E., & Chaston, J. M. (2016). Rearing the Fruit Fly *Drosophila melanogaster* Under Axenic and Gnotobiotic Conditions. *JoVE*, 113, e54219. <https://doi.org/doi:10.3791/54219>
- 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>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *R. Soc. Open Sci*, 4(170003). <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Kwong, Waldan K., & Moran, N. A. (2016). Gut Microbial Communities of Social Bees. *Nat Rev Microbiol.*, 14(6), 374–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.43>
- Lai, P. F., & Canning, E. U. (1980). Infectivity of a microsporidium of mosquitoes (*Nosema algerae*) to larval stages of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *International Journal for Parasitology*, 10(4), 293–301. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(80\)90010-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(80)90010-7)
- Lai, P. Y., Tamashiro, M., & Fujii, J. K. (1983). Abundance and distribution of the three species of symbiotic protozoa in the hindgut of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Proceedings, Hawaiian Entomology Society*, 24(2–3), 271–276.
- Larson, M. K., Bender, R. C., & Bayne, C. J. (2014). Resistance of *Biomphalaria glabrata* 13-16-R1 snails to *Schistosoma mansoni* PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes. *International Journal for Parasitology*, 44, 343–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.11.004>
- Le Govic, Y., Kincaid-Smith, J., Allienne, J.-F., Rey, O., de Gentile, L., Boissier, J., Kincaid-Smith, F. J., Allienne, J., Rey, O., & Boissier, J. (2019). *Schistosoma haematobium-Schistosoma mansoni* Hybrid Parasite in Migrant Boy, France, 2017. <https://doi.org/10.3201/eid2502.172028>

- Le Roes-Hill, M., Rohland, J., & Burton, S. (2011). Actinobacteria isolated from termite guts as a source of novel oxidative enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*, *100*, 589–605. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9614-x>
- Lee, M. H., Osaki, T., Lee, J. Y., Baek, M. J., Zhang, R., Park, J. W., Kawabata, S. I., Söderhäll, K., & Lee, B. L. (2004). Peptidoglycan Recognition Proteins Involved in 1,3-β -D-Glucan-dependent Prophenoloxidase Activation System of Insect. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(5), 3218–3227. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309821200>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, *25*, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Levin, R. A., Voolstra, C. R., Weynberg, K. D., & Van Oppen, M. J. H. (2016). Evidence for a role of viruses in the thermal sensitivity of coral photosymbionts. *The ISME Journal*, *11*, 808–812. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.154>
- Li, L.-H., Zhang, Y., & Zhu, D. (2018). Effects of antibiotic treatment on the fecundity of *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks. *Parasites & Vectors*, *11*(242). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2807-7>
- Li, Y., Xu, X.-L., Zhao, D., Pan, L.-N., Huang, C.-W., Guo, L.-J., Lu, Q., & Wang, J. (2015). TLR3 ligand Poly IC Attenuates Reactive Astrogliosis and Improves Recovery of Rats after Focal Cerebral Ischemia. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *21*, 905–913. <https://doi.org/10.1111/cns.12469>
- Lie, J., & Heyneman, D. (1975). Studies on resistance in snails : a specific tissue reaction to *Echinostoma Lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *International Journal for Parasitology*, *5*, 621–625.
- Lie, K. J., & Heyneman, D. (1979). Acquired resistance to Echinostomes in four *Biomphalaria glabrata* strains. *International Journal for Parasitology*, *9*, 533–537.
- Lie, K. J., Heyneman, D., & Lim, H. K. (1975). Studies on resistance in snails : specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. *International Journal for Parasitology*. *1915*, *5*, 627–631.
- Lie, K. J., Heyneman, D., & Yau, P. (1975). The Origin of Amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *The Journal of Parasitology*, *61*(3), 574–576. <https://doi.org/10.2307/3279358>
- Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O., & Aeschlimann, J. M. (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *10*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1994.tb00011.x>

- Lockyer, A. E., Emery, A. M., Kane, R. A., Walker, A. J., Mayer, C. D., Mitta, G., Coustau, C., Adema, C. M., Hanelt, B., Rollinson, D., Noble, L. R., & S, J. C. (2012). Early Differential Gene Expression in Haemocytes from Resistant and Susceptible Biomphalaria glabrata Strains in Response to Schistosoma mansoni. *PLoS ONE*, 7(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051102>
- Lockyer, A. E., Olson, P. D., Østergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D. A., Attwood, S. W., Southgate, V. R., Horak, P., Snyder, S. D., Le, T. H., Agatsuma, T., Mcmanus, D. P., Carmichael, A. C., Naem, S., & Littlewood, D. T. J. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of Schistosoma Weinland, 1858. *Parasitology*, 126, 203–224.
<https://doi.org/10.1017/S0031182002002792>
- Loker, E. S. (2010). Gastropod Immunobiology. In K. Söderhäll (Ed.), *Invertebrate Immunity* (pp. 17–43). Landes Bioscience & Springer Science+Business Media.
- Loker, E. S., Bayne, C., Buckley, P., & Kruse, K. (1982). Ultrastructure of Encapsulation of Schistosoma mansoni Mother Sporocysts by Hemocytes of Juveniles of the 10-R2 Strain of Biomphalaria glabrata Author (s): Eric S . Loker , Christopher J . Bayne , Patricia M . Buckley and Kris T . Kruse Published by : A. *The Journal of Parasitology*, 68(1), 84–94.
- Lokmer, A., & Wegner, K. M. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *The ISME Journal*, 9, 670–682.
<https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160>
- Long, H. Y., Lell, B., Dietz, K., & Kremsner, P. G. (2001). Plasmodium falciparum: In vitro growth inhibition by febrile temperatures. *Parasitology Research*, 87, 553–555.
<https://doi.org/10.1007/s004360100374>
- Louis, C., Jourdan, M., & Cabanac, M. (1986). Behavioral fever and therapy in a rickettsia-infected Orthoptera. *The American Journal of Physiology*, 250(19), R991–R995.
- Lowenberger, C. (2001). Innate immune response of Aedes aegypti. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(3), 219–229. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00141-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00141-7)
- Luna-Acosta, A., Breitwieser, M., Renault, T., & Thomas-Guyon, H. (2017). Recent findings on phenoloxidases in bivalves. *Marine Pollution Bulletin*, 122, 5–16.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.031>
- Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (Apis mellifera). *Molecular Ecology*, 25(21), 5439–5450.
<https://doi.org/10.1111/mec.13862>

- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*(21), 2957–2963.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, *2*, e593.
<https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Margulis, L. (1991). *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis* (L. Margulis & R. Fester (eds.); MA MLFR ed). MIT Press.
- Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z., & Pestka, J. J. (1997). Differential Cytokine Production in Clonal Macrophage and T-Cell Lines Cultured with Bifidobacteria. *J Dairy Sci*, *80*, 2713–2720. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76232-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76232-5)
- Martin, G. G., Oakes, C. T., Tousignant, H. R., Crabtree, H., & Yamakawa, R. (2007). Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *Journal of Molluscan Studies*, *73*, 355–365.
<https://doi.org/10.1093/mollus/eym032>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *17*(1), 10. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martins-Souza, R. L., Jesus Pereira, C. A., Rodrigues, L., Araújo, E. S., Coelho, P. M. Z., Corrêa, A., & Negrão-Corrêa, D. (2011). Participation of N-acetyl-D-glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, *106*(7), 884–891.
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., & Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, *20*, 619–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x>
- Martinson, V. G., Douglas, A. E., & Jaenike, J. (2017). Community structure of the gut microbiota in sympatric species of wild *Drosophila*. *Ecology Letters*.
<https://doi.org/10.1111/ele.12761>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol*, *12*, 991–1045.
- Mcmurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PloS One*, *8*(4), 1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Meister, M., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2000). *The Antimicrobial Host Defense of Drosophila*.

17–36. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59674-2_2

- Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F. C., & Christophides, G. K. (2009). *Anopheles gambiae* PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. *PLoS Pathogens*, *5*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000542>
- Méthot, P.-O., & Alizon, S. (2014). What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence*, *5*(8), 775–785. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.960726>
- Meurs, L., Mbow, M., Vereecken, K., Menten, J., Mboup, S., & Polman, K. (2012). Epidemiology of mixed *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* infections in northern Senegal. *International Journal for Parasitology*, *42*, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.002>
- 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>
- Minguez, L., Buronfosse, T., Beisel, J. N., & Giambérini, L. (2012). Parasitism can be a confounding factor in assessing the response of zebra mussels to water contamination. *Environmental Pollution*, *162*, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.005>
- Mitta, G., Adema, C. M., Gourbal, B., Loker, E. S., & Theron, A. (2012). Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. *Dev. Comp. Immunol*, *37*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.09.002>
- Mitta, G., Galinier, R., Tisseyre, P., Allienne, J. F., Girerd-Chambaz, Y., Guillou, F., Bouchut, A., & Coustau, C. (2005). Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, *29*(5), 393–407. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.10.002>
- Mitta, G., Gourbal, B., Grunau, C., Knight, M., & Bridger, J. M. (2017). The compatibility between *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* : an increasingly complex puzzle. In *Advances in Parasitology* (Vol. 97, pp. 111–145). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.08.006>
- Miura, T., Braendle, C., Shingleton, A., Sisk, G., Kambhampati, S., & Stern, D. L. (2003). A Comparison of Parthenogenetic and Sexual Embryogenesis of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *295B*(1), 59–81. <https://doi.org/10.1002/jez.b.3>
- Moliner, C., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2010). Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol Rev*, *34*, 281–294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00209.x>

- 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*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000813>
- Moné, Y., Mitta, G., Duval, D., & Gourbal, B. (2010). Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*, *125*(2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.12.024>
- Moné, Y., Ribou, A.-C., Cosseau, C., Duval, D., Théron, A., Mitta, G., & Gourbal, B. (2011). An example of molecular co-evolution: Reactive oxygen species (ROS) and ROS scavenger levels in *Schistosoma mansoni*/*Biomphalaria glabrata* interactions. *International Journal for Parasitology*, *7*, 721–730. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.007>
- Moné, Yves. (2011). *Bases moléculaires du polymorphisme de compatibilité dans l'interaction Schistosoma mansoni / Biomphalaria glabrata*. Université de Perpignan Via Domitia.
- Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., & Sabree, Z. L. (2012). Distinctive Gut Microbiota of Honey Bees Assessed Using Deep Sampling from Individual Worker Bees. *PLoS ONE*, *7*(4), 36393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036393>
- Moran, N. A., & Sloan, D. B. (2015). The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLoS Biol*, *13*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Morgan, J. A. T., DeJong, R. J., Jung, Y., Khallaayoune, K., Kock, S., Mkoji, G. M., & Loker, E. S. (2002). A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *25*, 477–488. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00280-4](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00280-4)
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., & Failloux, A.-B. (2012). The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Moutailler, S., Valiente-Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.-H., Devillers, E., Cosson, J.-F., Gasqui, P., Tran Van, V., Mavingui, P., Vourc'h, G., & Vayssier-Taussat, M. (2016). Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
- Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. *Trends in Microbiology*, *23*(10), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.009>
- Mullainadhan, P., & Renwrantz, L. (1986). *Lectin-Dependent Recognition of Foreign Cells by Hemocytes of the Mussel, Mytilus edulis* (Vol. 171).

- Mushegian, A. A., & Ebert, D. (2016). Rethinking "mutualism" in diverse host-symbiont communities. *BioEssays*, 38, 100–108. <https://doi.org/10.1002/bies.201500074>
- Muta, T., & Iwanaga, S. (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*.
- Nakamoto, M., Moy, R. H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S. S., Gold, B., & Cherry, S. (2012). Virus recognition by Toll-7 activates antiviral autophagy in *Drosophila*. *Immunity*, 36(4), 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.003>
- Nelson, M. K., Cruz, B. C., Buena, K. L., Nguyen, H., & Sullivan, J. T. (2016). Effects of abnormal temperature and starvation on the internal defense system of the schistosoma-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 138, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.05.009>
- Nemes, M. M., Tytell, A. A., Lampson, G. P., Field, A. K., & Hilleman, M. R. (1969). Inducers of Interferon and Host Resistance VI. Antiviral Efficacy of Poly I:C in Animal Models. *Proc Soc Exp Biol Med*, 132(2), 776–783.
- Ngwenya, B. Z. (1982). Enhanced resistance to *Plasmodium berghei* in mice previously infected with *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunology*, 4, 197–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1982.tb00431.x>
- Nikoh, N., Hosokawa, T., Oshima, K., Hattori, M., & Fukatsu, T. (2011). Reductive Evolution of Bacterial Genome in Insect Gut Environment. *Genome Biol. Evol.*, 3, 702–714. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr064>
- Noda, S. (1992). Effects of Excretory-Secretory Products of *Echinostoma paraensei* Larvae on the Hematopoietic Organ of M-Line *Biomphalaria glabrata* Snails Author (s): Shinichi Noda Published by : Allen Press on behalf of The American Society of Parasitologists Stable UR. *The Journal of Parasitology*, 78(3), 512–517.
- Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., & Wagner, H. (2019). *vegan: Community Ecology Package (2.5-4)*. <https://cran.r-project.org/package=vegan>
- Ottaviani, E. (1988). Lectin binding to neurosecretory cells of *Helicella virgata* (Gastropoda, Pulmonata). *Acta Histochem*, 83, 137–140.
- Owczarzak, A., Stibbs, H. H., & Bayne, C. J. (1980). The destruction of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts in vitro by amoebae isolated from *Biomphalaria glabrata*: an ultrastructural study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 35(1), 26–33. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90079-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90079-8)

- Palatini, U., Miesen, P., Carballar-Lejarazu, R., Ometto, L., Rizzo, E., Tu, Z., van Rij, R. P., & Bonizzoni, M. (2017). Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics*, *18*(512). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3903-3>
- Park, J.-K., Kim, K.-H., Kang, S., Kim, W., Eom, K. S., & Littlewood, D. (2007). A common origin of complex life cycles in parasitic flatworms: evidence from the complete mitochondrial genome of *Microcotyle sebastis* (Monogenea: Platyhelminthes). *BMC Evolutionary Biology*, *7*(11). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-11>
- Pawar, K. D., Banskar, S., Rane, S. D., Charan, S. S., Kulkarni, G. J., Sawant, S. S., Ghate, H. V., Patole, M. S., & Shouche, Y. S. (2012). Bacterial diversity in different regions of gastrointestinal tract of Giant African Snail (*Achatina fulica*). *MicrobiologyOpen*, *1*(4), 415–426. <https://doi.org/10.1002/mbo3.38>
- Pawlowski, J., Holzmann, M., Fahrni, J. F., Pochon, X., & Lee, J. J. (2001). Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera: 1. Chlorophytes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *48*(3), 362–367. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00325.x>
- Peterson, N. A., Hokke, H., Deelder, A. M., & Yoshino, T. P. (2009). Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: Differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. *International Journal for Parasitology*, *39*(12), 1331–1344. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.06.002>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>
- Pica-Mattoccia, L., & Cioli, D. (2004). Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology*, *34*(4), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.003>
- Piel, J. (2002). A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *PNAS*, *99*(22), 14002–14007. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.222481399
- Pietri, J. E., Tiffany, C., & Liang, D. (2018). Disruption of the microbiota affects physiological and evolutionary aspects of insecticide resistance in the German cockroach, an important urban pest. *PLoS One*, *13*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207985>
- Pila, E. A., Li, H., Hambrook, J. R., Wu, X., & Hanington, P. C. (2017). Schistosomiasis from a Snail's Perspective: Advances in Snail Immunity. *Trends in Parasitology*, *33*(11), 845–857.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.006>

- Pila, E. A., Tarrabain, M., Kabore, A. L., & Hanington, P. C. (2016). A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005513>
- 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), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005361>
- Pointier, J. P., & Giboda, M. (1999). The case for biological control of snail intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Today*, *15*(10), 395–397.
[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01517-3](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01517-3)
- Portet, A., Pinaud, S., Chaparro, C., Galinier, R., Dheilly, N. M., Portela, J., Charriere, G. M., Allienne, J.-F., Duval, D., & Gourbal, B. (2019). *Sympatric versus allopatric evolutionary contexts shape differential immune response in Biomphalaria / Schistosoma interaction*.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007647>
- Portet, A., Toulza, E., Lokmer, A., Huot, C., Duval, D., Galinier, R., & Gourbal, B. (2018). Dysbiosis of the *Biomphalaria glabrata* vector snail microbiota following infection by *Schistosoma* parasites. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/386623>
- Poulsen, M., Oh, D.-C., Clardy, J., & Currie, C. R. (2011). Chemical Analyses of Wasp-Associated *Streptomyces* Bacteria Reveal a Prolific Potential for Natural Products Discovery. *PLoS ONE*, *6*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016763>
- Pradeu, T., & Vivier, E. (2017). The discontinuity theory of immunity. *Sci Immunol.*, *1*(1).
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag0479>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Solvsten Burgdorf, K., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65.
<https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Racioppi, L., & Means, A. R. (2008). Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller. *Trends in Immunology*, *29*(12), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.08.005>
- Raghavan, N., Miller, A. N., Gardner, M., Fitzgerald, P. C., Kerlavage, A. R., Johnston, D. A.,

- Lewis, F. A., & Knight, M. (2003). Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre-and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *126*, 181–191.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Cosme, R. T., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *6*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>
- Raquin, V., Valiente Moro, C., Saucereau, Y., Tran, F.-H., Potier, P., & Mavingui, P. (2015). Native *Wolbachia* from *Aedes albopictus* blocks Chikungunya virus infection in cellulo. *PLoS One*, *10*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125066>
- Raven, J. A., Finkel, Z. V., & Irwin, A. J. (2005). Picophytoplankton: Bottom-up and top-down controls on ecology and evolution. *Vie et Milieu*, *55*(3–4), 209–215.
- Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol*, *15*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>
- Reid, G., Howard, J., & Gan, B. S. (2001). Can bacterial interference prevent infection ? *TRENDS in Microbiology*, *9*(9), 424–428. <http://tim.trends.com>
- Richards, C. S. (1968). Two New Species of *Hartmannella* amebae infecting freshwater mollusks. *The Journal of Protozoology Banner*, *15*(4), 651–656. [https://doi.org/10.1639/0007-2745\(1932\)35\[82:tnsol\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1639/0007-2745(1932)35[82:tnsol]2.0.co;2)
- Rinkevich, B. (1999). Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution. *Scandinavian Journal of Immunology*, *50*(5), 456–460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564546>
- Roger, E., Gourbal, B., Grunau, C., Pierce, R. J., Galinier, R., & Mitta, G. (2008). Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (Sm PoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, *157*, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.11.015>
- Roger, Emmanuel, Grunau, C., Pierce, R. J., Hirai, H., Gourbal, B., Galinier, R., Emans, R., Cesari, I. M., Cosseau, C., & Mitta, G. (2008). Controlled Chaos of Polymorphic Mucins in a Metazoan Parasite (*Schistosoma mansoni*) Interacting with Its Invertebrate Host (*Biomphalaria glabrata*). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *2*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000330>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>

- Rolfe, R. D. (1997). Colonization resistance. In R. I. Mackie, B. A. White, & R. E. Isaacson (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology*.
- Rondelaud, D., & Barthe, D. (1981). The Development of the Amoebocyte-Producing Organ by *Fasciola hepatica* L. *Parasitenkunde*, 65, 331–341.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2011). Symbiosis and Development: The Hologenome Concept. *Birth Defects Research (Part C)*, 93, 56–66. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20196>
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2013). *The Hologenome Ceoncept: Human, animal and plant microbiota*. Cham ; Springer.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>
- Rosengaus, R. B., Zecher, C. N., Schultheis, K. F., Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2011). Disruption of the Termite Gut Microbiota and Its Prolonged Consequences for Fitness †. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 77(13), 4303–4312. <https://doi.org/10.1128/AEM.01886-10>
- Roth, O., & Kurtz, J. (2009). Phagocytosis mediates specificity in the immune defence of an invertebrate, the woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Developmental and Comparative Immunology*, 33(11), 1151–1155. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.04.005>
- Ryu, J.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-Y., Bai, J. Y., Nam, Y.-D., Bae, J.-W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E.-M., & Lee, W.-J. (2008). Innate Immune Homeostasis by the Homeobox Gene *Caudal* and Commensal-Gut Mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319, 777–782.
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, 16, 1206–1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Sadekuzzaman, M., Stanley, D., & Kim, Y. (2017). *Nitric Oxide Mediates Insect Cellular Immunity via Phospholipase A 2 Activation*. <https://doi.org/10.1159/000481524>
- Salamat, Z., & Sullivan, J. T. (2009). Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *Developmental and Comparative Immunology*, 33, 725–727. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.01.001>
- Salem, H., Kreutzer, E., Sudakaran, S., & Kaltenpoth, M. (2013). Actinobacteria as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental Microbiology*, 15(7), 1956–1968. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12001>
- Sapp, K. K., & Loker, E. S. (2000a). A Comparative Study of Mechanisms Underlying Digenean-

- Snail Specificity: In vitro Interactions between Hemocytes and Digenean Larvae. *The Journal of Parasitology*, 86(5), 1020–1029. <https://doi.org/10.2307/3284815>
- Sapp, K. K., & Loker, E. S. (2000b). Mechanisms Underlying Digenean-Snail Specificity: Role of Miracidial Attachment and Host Plasma Factors. *The Journal of Parasitology*, 86(5), 1012–1019. <https://doi.org/10.2307/3284814>
- Schloss, P. D., Delalibera, I., Handelsman, J., & Raffa, K. F. (2006). Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environmental Entomology*, 35(3), 625–629. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-35.3.625>
- Schulenburg, H., & Félix, M.-A. (2017). The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 206, 55–86. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.195511>
- Sekine, K., Watanabe-Sekine, E., Toida, T., Kasashima, T., Kataoka, T., & Hashimoto, Y. (1994). Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for in vivo immune response in mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 16(4), 589–609.
- Seto, E. Y. W., Wong, B. K., Lu, D., & Zhong, B. (2011). Human schistosomiasis resistance to praziquantel in China: Should we be worried? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 74–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0542>
- Sharon, G., Segal, D., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2011). Gut Microbes Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in *Drosophila melanogaster*, providing support for the hologenome concept of evolution. *Gut Microbes*, 2(3), 190–192. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16103>
- Shi, Z. H., & Sun, J. H. (2010). Immunocompetence of the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae): Variation between developmental stages and sexes in populations in China. *Journal of Insect Physiology*, 56(11), 1696–1701. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.06.013>
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. In *NATURE* (Vol. 407).
- Shozawa, A., Suto, C., & Kumada, N. (1989). Superoxide production by the haemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Zoological Science*, 6, 1019–1022.
- Silva, T. M., Melo, E. S., Lopes, A. C. S., Veras, D. L., Duarte, C. R., Alves, L. C., & Brayner, F. A. (2013). Characterization of the bacterial microbiota of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca: Gastropoda) from Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 57(1), 19–25. <https://doi.org/10.1111/lam.12068>

- Simon, J.-C., Marchesi, J. R., Mougel, C., & Selosse, M.-A. (2019). Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome*, 7(5). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
- Simpson, R. J., Wilding, C. S., & Grahame, J. (2005). Intron Analyses Reveal Multiple Calmodulin Copies in *Littorina*. *J Mol Evol*, 60, 505–512. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0232-3>
- Sire, C., Rognon, A., & Theron, A. (1998). Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? *Parasitology*, 117, 117–122. <https://doi.org/10.1017/S0031182098002923>
- Skillings, D. (2016). Holobionts and the ecology of organisms: Multi-species communities or integrated individuals? *Biol Philos*, 31, 875–892. <https://doi.org/10.1007/s10539-016-9544-0>
- Smallwood, H. S., Shi, L., & Squier, T. C. (2006). Increases in Calmodulin Abundance and Stabilization of Activated Inducible Nitric Oxide Synthase Mediate Bacterial Killing in RAW 264.7 Macrophages. *Biochemistry*, 45, 9717–9726. <https://doi.org/10.1021/bi060485p>
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10, 23–28.
- Soliman, M. F. M. (2009). *Fasciola gigantica*: Cercarial shedding pattern from *Lymnaea natalensis* after long-term exposure to cadmium at different temperatures. *Experimental Parasitology*, 121(4), 307–311. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.001>
- Srivastava, P. N., & Auclair, J. L. (1976). Effects of antibiotics on feeding and development of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology*, 54(7), 1025–1029.
- Srygley, R. B. (2012). Ontogenetic changes in immunity and susceptibility to fungal infection in Mormon crickets *Anabrus simplex*. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.005>
- Stabili, L., Parisi, M. G., Parrinello, D., & Cammarata, M. (2018). Cnidarian interaction with microbial communities: from aid to animal's health to rejection responses. *Mar. Drugs*, 16(296). <https://doi.org/10.3390/md16090296>
- Stat, M., Carter, D., & Hoegh-Guldberg, O. (2006). The evolutionary history of Symbiodinium and scleractinian hosts—Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*, 8, 23–43. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2006.04.001>
- Stelma, F. F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., Deelder, A. M., & Gryseels, B. (1995). Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma*

- mansoni. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(2), 167–170.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.167>
- Stibbs, H. H., Owczarzak, A., Bayne, C. J., & DeWan, P. (1979). Schistosome sporocyst-killing amoebae isolated from *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 33(2), 159–170. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(79\)90149-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(79)90149-6)
- Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., & Kaltenpoth, M. (2012). Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*, 21, 6134–6151.
<https://doi.org/10.1111/mec.12027>
- Suga, H., Chen, Z., De Mendoza, A., Sebé-Pedrós, A., Brown, M. W., Kramer, E., Carr, M., Kerner, P., Vervoort, M., Sánchez-Pons, N., Torruella, G., Derelle, R., Manning, G., Lang, B. F., Russ, C., Haas, B. J., Roger, A. J., Nusbaum, C., & Ruiz-Trillo, I. (2013). The *Capsaspora* genome reveals a complex unicellular prehistory of animals. *Nature Communications*, 4(2325). <https://doi.org/10.1038/ncomms3325>
- Sullivan, J. T., Belloir, J. A., Beltran, R. V, Grivakis, A., & Ransone, K. A. (2014). Fucoidan stimulates cell division in the amebocyte-producing organ of the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 123, 13–16.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.09.005>
- Sullivan, J. T., Spence, J. V., & Nunez, J. K. (1995). Killing of *Schistosoma mansoni* Sporocysts in *Biomphalaria glabrata* Implanted with Amoebocyte-Producing Organ Allografts from Resistant Snails. *The Journal of Parasitology*, 81(5), 829. <https://doi.org/10.2307/3283993>
- Takacs-Vesbach, C., King, K., Van Horn, D., Larkin, K., & Neiman, M. (2016). Distinct Bacterial Microbiomes in Sexual and Asexual *Potamopyrgus antipodarum*, a New Zealand Freshwater Snail. *PLoS One*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161050>
- Takahashi, T., Oka, T., Iwana, H., Kuwata, T., & Yamamoto, Y. (1993). Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(9), 1557–1560. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.1557>
- Takakura, Y. (2015). *Tricholoma matsutake* fruit bodies secrete hydrogen peroxide as a potent inhibitor of fungal growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(6), 447–450.
<https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0843>
- Tang, T., Wu, C., Li, J., Ren, G., Huang, D., & Liu, F. (2012). Stress-induced HSP70 from *Musca domestica* plays a functionally significant role in the immune system. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1226–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.06.007>
- Taubes, G. (2008). The bacteria fight back. *Science*, 321, 356–361. www.sciencemag.org

- Tchioffo, M. T., Boissière, A., Churcher, T. S., Abate, L., & Gimonneau, G. (2013). Modulation of Malaria Infection in *Anopheles gambiae* Mosquitoes Exposed to Natural Midgut Bacteria. *PLoS ONE*, 8(12), 81663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081663>
- Teo, T.-H., Howland, S. W., Claser, C., Gun, S. Y., Poh, C. M., Lee, W. W., Lum, F.-M., Ng, L. F., & Rénia, L. (2018). Co-infection with Chikungunya virus alters trafficking of pathogenic CD8 + T cells into the brain and prevents Plasmodium-induced neuropathology. *EMBO Mol Med*, 10, 121–138. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707885>
- Teo, T.-H., Lum, F.-M., Ghaffar, K., Chan, Y.-H., Naqiah Amrun, S., Tan, J. J. L., Lee, C. Y. P., Chua, T.-K., Carissimo, G., Lee, W. W. L., Claser, C., Rajarethinam, R., Rénia, L., & Ng, L. F. P. (2018). Plasmodium co-infection protects against chikungunya virus-induced pathologies. *Nature Communication*, 9(3905). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06227-9>
- Tetreau, G., Pinaud, S., Duval, D., Portet, A., Galinier, R., & Gourbal, B. (2017). *Specific Pathogen recognition by Multiple innate immune sensors in an invertebrate*. 8, 1249. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01249>
- Tetreau, Guillaume, Grizard, S., Patil, C. D., Tran, F. H., Tran Van, V., Stalinski, R., Laporte, F., Mavingui, P., Després, L., & Valiente Moro, C. (2018). Bacterial microbiota of *Aedes aegypti* mosquito larvae is altered by intoxication with *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Parasites and Vectors*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2741-8>
- Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bocsh, T. C. G., Cryan, J. F., Gilbert, S. F., Goodnight, C. J., Lloyd, E. A., Sapp, J., Vandenkoornhuysse, P., Zilber-rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2016). Getting the Hologenome Concept Right : an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. *Msystems*, 1(2), 1–6. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00028-16.Editor>
- Therneau, T. M., & Grambsch, P. M. (2000). *Modeling survival data: extending the Cox Model*. Springer.
- Theron, A., Rognon, A., Gourbal, B., & Mitta, G. (2014). Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: A new approach of the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.025>
- Thingstad, T. F., Bellerby, R. G. J., Bratbak, G., Børsheim, K. Y., Egge, J. K., Heldal, M., Larsen, A., Neill, C., Nejtgaard, J., Norland, S., Sandaa, R.-A., Skjoldal, E. F., Tanaka, T., Thyrraug, R., & Töpper, & B. (2008). Counterintuitive carbon-to-nutrient coupling in an Arctic pelagic ecosystem. *Nature*, 455, 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature07235>

- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., & Renault, T. (2009). Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Developmental and Comparative Immunology*, *33*, 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.011>
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandebulcke, F., & Boulo, V. (2007). Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Developmental and Comparative Immunology*, *31*(9), 859–873. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.01.005>
- Tojo, M., Oikawa, T., Morikawa, Y., Yamashita, N., Iwata, S., Satoh, Y., Hanada, J., & Tanaka, R. (1987). The Effects of *Bifidobacterium breve* Administration on *Campylobacter* Enteritis. *Pediatrics International*, *29*(1), 160–167. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.1987.tb00024.x>
- Torre, C., Laure Tsoumtsia, L., & Ghigo, É. (2017). La mémoire immunitaire entraînée chez les invertébrés Que sait-on ? *Médecine/Sciences*, *33*, 979–983. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173311015>
- Trench, R. K. (1979). The cell biology of plant-animal symbiosis. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, *30*, 485–531.
- Tunholi-Alves, V. M., Tunholi, V. M., Lustrino, D., Amaral, L. S., Thiengo, S. C., & Pinheiro, J. (2011). Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the nematod *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Invertebrates Pathology*, *108*, 220–223.
- Tunholi, V. M., Lorenzoni, P. O., da Silva, Y. H., Tunholi-Alves, V. M., Boeloni, J. N., da Silva, M. A., Monteiro, C. O., Prata, M. C. A., Pinheiro, J., & Martins, I. V. F. (2017). Molluscicidal potential of *Heterorhabditis baujardi* (Rhabditida: Heterorhabditidae), strain LPP7, on *Lymnaea columella* (Gastropoda: Pulmonata): An alternative for biological control of fasciolosis. *Acta Tropica*, *173*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.024>
- Van Der Knaap, W. P. W., Boerrigter-Barendsen, L. H., Van Den Hoeven, D. S. P., & Sminia, T. (1981). Cell and Tissue Research Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (Amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. In *Cell Tissue Res* (Vol. 219).
- Van Der Knaap, W. P. W., & Loker, E. S. (1990). Immune Mechanisms in Trematode-Snail Interactions. In *Parasitology Today* (Vol. 6, Issue 6).
- Vasquez, R. E., & Sullivan, J. T. (2001). Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*, 561–564.

- Vasta, G. R., Ahmed, H., Bianchet, M. A., Fernández-Robledo, J. A., & Amzel, L. M. (2012). Diversity in recognition of glycans by F-type lectins and galectins: molecular, structural, and biophysical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1253. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06698.x>
- Vetter, V., Denizer, G., Friedland, L. R., Krishnan, J., & Shapiro, M. (2018). Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine*, 50(2), 110–120. <https://doi.org/10.1080/07853890.2017.1407035>
- Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pages, C., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D., Allemand, D., & Mitta, G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiology*, 9(14). <https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-14>
- Volz, J., Müller, H. M., Zdanowicz, A., Kafatos, F. C., & Osta, M. A. (2006). A genetic module regulates the melanization response of *Anopheles* to *Plasmodium*. *Cellular Microbiology*, 8(9), 1392–1405. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00718.x>
- Voss, J. D., Leon, J. C., Dhurandhar, N. V., & Robb, F. T. (2015). Pawnobiome: manipulation of the hologenome within one host generation and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 6(697), 697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00697>
- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from? *Nature Reviews Microbiology*, 1, 65–70.
- Wang, W., Dai, J. R., Li, H. J., Shen, X. H., & Liang, Y. S. (2012). Short report: The sensitivity of *Schistosoma japonicum* to praziquantel: A field evaluation in areas with low endemicity of China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(5), 834–836. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.111-0701>
- Wang, W., Wang, L., & Liang, Y. S. (2012). Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. In *Parasitology Research* (Vol. 111, Issue 5, pp. 1871–1877). <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3151-z>
- Wang, X.-W., & Wang, J.-X. (2015). Crustacean hemolymph microbiota: Endemic, tightly controlled, and utilization expectable. *Molecular Immunology*, 68, 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.06.018>
- Wang, X.-W., Xu, J.-D., Zhao, X.-F., Vasta, G. R., & Wang, J.-X. (2014). A Shrimp C-type Lectin Inhibits Proliferation of the Hemolymph Microbiota by Maintaining the Expression of Antimicrobial Peptides *. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(17), 11779–11790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.552307>

- Wang, X., Liu, T., Wu, Y., Zhong, D., Zhou, G., Su, X., Xu, J., Sotero, C. F., Sadruddin, A. A., Wu, K., Chen, X.-G., & Yan, G. (2018). Bacterial microbiota assemblage in *Aedes albopictus* mosquitoes and its impacts on larval development. *Mol Ecol*, *27*(14), 2972–2985.
<https://doi.org/10.5061/dryad.dg11vn5>
- Warne, R. W., Kirschman, L., & Zeglin, L. (2019). Manipulation of gut microbiota during critical developmental windows affects host physiological performance and disease susceptibility across ontogeny. *Journal of Animal Ecology*, *88*(6), 845–856.
<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12973>
- Warren, K. S., & Weisberger, A. S. (1966). Suppression of Schistosomiasis in snails by Chloramphenicol. *Nature*, *209*, 422–423.
- Warren, Kenneth S., & Weisberger, A. S. (1967). Molluscan Schistosomiasis mansoni: Effect of 2 Analogues of Ghloramphenicol on Both Parasite and Host. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *124*, 789–791.
- Webb, B. A. (1998). Polydnavirus Biology, Genome Structure, and Evolution. In L. K. Miller & L. A. Ball (Eds.), *The Insect Viruses* (pp. 105–139). Plenum Publishing Corporation.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0_5
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *173*(2), 697–703.
- 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>
- WHO. (2016). WHO | *Epidemiological situation*. WHO; World Health Organization.
<https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/en/>
- WHO. (2017). *Vector-borne diseases*. Vector-Borne Diseases.
<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, *54*(10–11), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Wojda, I., & Jakubowicz, T. (2007). Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, *53*, 1134–1144.
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.06.003>
- Wojda, I., & Kowalski, P. (2013). *Galleria mellonella* infected with *Bacillus thuringiensis* involves Hsp90. *Central European Journal of Biology*, *8*(6), 561–569.

<https://doi.org/10.2478/s11535-013-0162-9>

- Wong, A. C.-N., Chaston, J. M., & Douglas, A. E. (2013). The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis Microbe-microbe and microbe-host interactions. *The ISME Journal*, *7*, 1922–1932. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.86>
- Wu, X.-J., Dinguirard, N., Sabat, G., Lui, H.-D., Gonzalez, L., Gehring, M., Bickham-Wright, U., & Yoshino, T. P. (2017). Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathogens*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006081>
- Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog*, *4*(7), 1000098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098>
- Xiao, S. -h., Catto, B. A., & Webster, L. T. (1985). Effects of Praziquantel on Different Developmental Stages of *Schistosoma mansoni* in Vitro and in Vivo. *Journal of Infectious Diseases*, *151*(6), 1130–1137. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.6.1130>
- Yang, Y.-W., Chen, M.-K., Yang, B.-Y., Huang, X.-J., Zhang, X.-R., He, L.-Q., Zhang, J., & Hua, Z.-C. (2015). Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Mouse Feces. <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-15>
- Yasui, H., & Ohwaki, M. (1991). Enhancement of Immune Response in Peyer's Patch Cells Cultured with *Bifidobacterium breve*. *Journal of Dairy Science*, *74*, 1187–1195. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78272-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78272-6)
- Yoshino, T. P., & Coustau, C. (2011). Immunobiology of *Biomphalaria*–Trematode Interactions. In *Biomphalaria snails and larval trematodes* (Issue October, pp. 159–189). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7028-2>
- Yoshino, Timothy P., Lodes, M. J., Rege, A. A., & Chappell, C. L. (1993). Proteinase Activity in Miracidia, Transformation Excretory-Secretory Products, and Primary Sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, *79*(1), 23. <https://doi.org/10.2307/3283272>
- Yoshino, Timothy P, Dinguirard, N., Kunert, J., & Hokke, C. H. (2008). Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Gene*, *411*(1–2), 46–58.
- Yoshino, Timothy P, Wu, X.-J., Gonzalez, L. A., & Hokke, H. (2013). Circulating *Biomphalaria glabrata* hemocyte subpopulations possess shared schistosome glycans and receptors capable of binding larval glycoconjugates. *Experimental Parasitology*, *133*, 28–36.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.002>

- Yoshino, Timothy P, Wu, X.-J., Liu, H., Gonzalez, L. A., Deelder, A. M., & Hokke, C. H. (2012). Glycotope Sharing between Snail Hemolymph and Larval Schistosomes: Larval Transformation Products Alter Shared Glycan Patterns of Plasma Proteins. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001569>
- Yun, J.-H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M.-J., Kim, M.-S., Park, D.-S., Yoon, C., Nam, Y.-D., Kim, Y.-J., Choi, J.-H., Kim, J.-Y., Shin, N.-R., Kim, S.-H., Lee, W.-J., & Bae, J.-W. (2014). Insect Gut Bacterial Diversity Determined by Environmental Habitat, Diet, Developmental Stage, and Phylogeny of Host. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5254–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.01226-14>
- Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.-S., Blanot, D., Oh, B.-H., Ueda, R., Mengin-Lecreulx, D., & Lemaitre, B. (2006). The *Drosophila* Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunity*, 24, 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.02.012>
- Zeng, S., Hou, D., Liu, J., Ji, P., Weng, S., He, J., & Huang, Z. (2019). Antibiotic supplement in feed can perturb the intestinal microbial composition and function in Pacific white shrimp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3111–3122. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09671-9>
- Zhang, H., Sparks, J. B., Karyala, S. V., Settlage, R., & Luo, X. M. (2015). Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME Journal*, 9, 770–781. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.165>
- Zhang, L.-J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology: CB*, 26(1), R14-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
- Zhang, S.-M., Adema, C. M., Kepler, T. B., & Loker, E. S. (2004). Diversification of Ig Superfamily Genes in an Invertebrate. In *Science* (Vol. 305).
- Zhang, S. M., Zeng, Y., & Loker, E. S. (2007). Characterization of immune genes from the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata* that encode peptidoglycan recognition proteins and gram-negative bacteria binding protein. *Immunogenetics*, 59(11), 883–898. <https://doi.org/10.1007/s00251-007-0245-3>
- Zhang, Si-Ming, Léonard, P. M., M., A. C., & Loker, E. S. (2001). Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics*, 53, 684–694. <https://doi.org/10.1007/s00251-001-0386-8>
- Zhang, Si-Ming, Zeng, Y., & Loker, E. S. (2008). Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host

Biomphalaria glabrata. *Innate Immunity*, 14(3), 175–189.

<https://doi.org/10.1177/1753425908093800>

Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

Webographie

survival : Terry M. Therneau, Patricia M. Grambsch (2000). *_Modeling Survival Data: Extending the Cox Model_*. Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3.

Résumé

Tout organisme vivant est confronté à des microorganismes, qu'ils s'agissent de bactéries, de virus, de champignons ou de protistes, à un moment ou un autre de sa vie. Le microbiote *largo sensu* représente l'ensemble de ces microorganismes, présents dans un hôte à un temps T. Il est, depuis plusieurs années, considéré comme un compartiment à part entière de son hôte. Il peut avoir un impact sur différentes fonctions biologiques de l'hôte, telles que la nutrition, le développement ou encore l'immunité. Il peut ainsi jouer un rôle clef dans les interactions entre organismes, notamment les interactions hôtes/parasites ou hôtes/pathogènes, en améliorant le système immunitaire de son hôte ou en impactant directement l'envahisseur. Le cas de *Biomphalaria glabrata* et autres Planorbidae, hôtes intermédiaires du parasite *Schistosoma sp.*, agent responsable de la bilharziose, est un modèle parfait pour l'étude du rôle du microbiote dans les interactions hôtes/parasites. En effet, la compréhension de l'interaction du ver avec son hôte intermédiaire notamment pourrait ouvrir la voie vers de nouvelles mesures de lutte, comme le blocage de son cycle. La caractérisation du microbiote des mollusques et son rôle dans l'interaction est donc une piste intéressante à explorer. Au cours de cette thèse, j'ai (i) caractérisé le microbiote bactérien et protistes de différentes espèces de Planorbidae afin de le comparer en fonction de la phylogénie des mollusques ; (ii) étudié la dynamique des communautés bactériennes au cours d'une cinétique d'infestation chez différentes souches de *B. glabrata* et (iii) perturbé le microbiote bactérien et observé les conséquences sur la résistance des mollusques face aux parasites afin de mettre en avant un potentiel rôle de ces bactéries dans l'immunité de leur hôte. L'un des résultats principaux de cette thèse est la spécificité forte des communautés bactériennes à la phylogénie de leur hôte, qui va jusqu'à former un patron de phyllosymbiose. De plus, une variation dans l'intensité ou dans la prévalence de l'infestation a été soulignée, selon la combinaison hôte/parasite, après une perturbation du microbiote, suggérant un lien entre ce dernier et l'immunité antiparasitaire des mollusques. Ce travail de thèse est donc un premier pas dans la compréhension de la relation tripartite entre un parasite, son hôte intermédiaire et le microbiote de ce dernier, pouvant, à terme, ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre l'agent responsable de la bilharziose.

Abstract

Every living organism is faced, eventually, to microorganisms, whether they are bacteria, viruses, fungi or protists. Microbiota *largo sensu* represent all these microorganisms, living in a host at T time. It is considered, since years, as an integral compartment of its host. It can affect several host functions, like nutrition, development or immunity. Thus, it can play a key role in interactions between organisms, notably hosts/parasites and hosts/pathogens interactions, improving the immune system of its host or directly affecting the invader. The case of *Biomphalaria glabrata* and other Planorbidae, intermediate hosts of *Schistosoma sp.* parasites, responsible agent for bilharzia, is a perfect model to study the role of microbiota in host/parasite interactions. Indeed, understanding the interaction between the worm and its intermediate host could open the way for new measure to fight it, as blocking its lifecycle. The characterization of mollusks' microbiota and its role in the interaction is, thus, an interesting way to explore. During my PhD, I (i) characterized the bacterial and protist microbiota of several Planorbidae species in order to compare it according to host phylogeny; (ii) studied the dynamic of microbiota bacterial communities during an infection kinetic in different *B. glabrata* strains and; (iii) disturbed the bacterial microbiota and observed the consequences on the mollusks resistance to parasite, in order to highlight a potential role of these bacteria in their host immunity. One of the main results of this work is the high specificity of bacterial communities to their host phylogeny, displaying a phyllosymbiosis pattern. Moreover, a variation in infection intensity or prevalence has been highlighted, depending on host/parasite combination, after a microbiota disturbance, suggesting a link between the latter and the antiparasitic immunity of mollusks. Thus, this PhD work is a first step in the understanding of the tripartite interaction between a parasite, its intermediate host and the microbiota of the latter that could, in time, open new perspectives in the fight against the responsible agent of bilharzia.