



HAL
open science

Étude de l'interaction entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, *Wolbachia*

Marius Poulain

► **To cite this version:**

Marius Poulain. Étude de l'interaction entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, *Wolbachia*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Claude Bernard Lyon 1, 2023. Français. NNT : . tel-04771769

HAL Id: tel-04771769

<https://hal.science/tel-04771769v1>

Submitted on 7 Nov 2024

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

École Doctorale N° 341
Écosystème Évolution Modélisation Microbiologie
Discipline : Micro-organismes, interactions, infections

Soutenue publiquement le 18/12/2023, par :
Marius Poulain

Étude de l'interaction entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, *Wolbachia*

Devant le jury composé de :

Christine Braquart-Varnier Professeure Laboratoire Écologie et Biologie des Interaction UMR CNRS 7267, Université de Poitier, FRANCE	Rapporteuse
Thierry Hance Directeur de recherche Laboratoire Écologie des Interactions et Contrôle Biologique, Université catholique de Louvain, BELGIQUE	Rapporteur
Frédéric Landmann Directeur de recherche Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier, Université de Montpellier, CNRS, FRANCE	Rapporteur
Franck Dedeine Maître de conférences Institut de recherche sur la biologie de l'Insecte UMR CNRS 7261, Université de Tours, FRANCE	Examineur
Laurence Mouton Maîtresse de conférences Laboratoire de Biométrie Biologie Évolutive, UMR CNRS 5553, Lyon, FRANCE	Examinatrice
Fabrice Vavre Directeur de recherche Laboratoire de Biométrie Biologie Évolutive, UMR CNRS 5553, Lyon, France	Directeur de thèse
Natacha Kremer Chargée de recherche Laboratoire de Biométrie Biologie Évolutive, UMR CNRS 5553, Lyon, France	Co-directrice de thèse
Anna Zaidman-Rémy Maîtresse de conférences Biologie Fonctionnelle Insecte Interaction, INSA-Lyon, UMR INRAE 203, Lyon, France	Co-directrice de thèse
Romain Lasseur Dirigeant d'entreprise Izinnovation SARL, Lyon, France	Invité

*À Janou, ma famille et ceux
qui m'ont donné le goût d'apprendre,
d'aimer et d'être un curieux optimiste.*

Préface

Peut-être avez-vous déjà vécu cette expérience. Vous vous réveillez en pleine nuit, le corps couvert de boutons qui vous démangent affreusement. En temps normal la première chose à laquelle vous auriez pensée aurait été un moustique. Mais cette fois-ci, rien du tout. Pas de vrombissement aigu qui vous stresse et vous empêche de trouver le sommeil. Cette fois-ci, vous allumez votre lampe de chevet et scrutez chaque recoin de votre chambre. Sur les draps, le long des plinthes, sur les murs, sur le lit et même sur le sommier, des petites traces sombres attirent votre attention. Ces marques révèlent la présence d'un insecte assoiffé de sang : la punaise de lit.

Connaissez-vous la punaise de lit ? Comme le soulignait Sun Tzu dans "L'Art de la Guerre", pour triompher, il faut connaître son adversaire. Au cours des trois années durant lesquelles j'ai réalisé mon travail de thèse, mon grand adversaire a été la punaise de lit. C'est un adversaire connu de l'homme depuis l'antiquité. Une première victoire avait été obtenue au cours de l'après-guerre à grands coups de pesticides. Cependant, la punaise de lit est de retour et se propage depuis la fin des années 90. Ainsi, entre 2017 et 2022, plus d'un dixième des français ont dû faire face à une infestation de punaises de lit. Les causes de cette recrudescence sont liées à la mondialisation et à la sélection de punaises devenues résistantes aux insecticides. Leurs piqûres engendrent des démangeaisons intenses, et leur discrétion font que la plupart des infestations ne sont détectées que tardivement. Leur installation entraîne des désagréments nocturnes chroniques qui peuvent conduire à des troubles psychologiques et à un isolement social.

Connaissez-vous la punaise de lit ? En tant qu'hématophage strict, elle ne se nourrit que de sang. Cependant, le sang des mammifères ne constitue pas une source de nutriments idéale. Pour compléter ses repas sanguins, la punaise a besoin d'une bactérie appelée *Wolbachia*. Celle-ci réside principalement dans un organe situé près de l'intestin et produit des vitamines essentielles à la punaise. *Wolbachia* joue le rôle d'un ouvrier dans une usine, en fournissant les éléments nécessaires au bon fonctionnement de toute la punaise. Si cette usine tombe en panne, les vitamines manquent. Conséquences : la punaise cesse de se développer.

Face à cet équilibre fragile, une idée a germé : mettre fin au règne de terreur de la punaise de lit en sabotant l'usine qui lui permet de vivre. Mais, souvenez-vous de ce que disait Sun Tzu. Avant de briser cette interaction il est crucial de répondre à une question essentielle : que savons-nous de la punaise de lit et de son interaction avec *Wolbachia* ?

Ma thèse s'efforce de fournir les réponses à cette question. Avec l'utilisation d'outils de microscopie et de techniques de quantification, j'ai observé et quantifié les millions de *Wolbachia* présentes dans la punaise. Étant donné que ces interactions sont dynamiques et peuvent varier tout au long du cycle de vie de l'hôte, j'ai réalisé mes mesures à différents moments de la vie de la punaise. En tant que "contremaître", j'ai enregistré leur présence sur leur lieu de travail, ainsi que leurs effectifs et leurs horaires. Les résultats de ces trois années d'étude sont rassemblés dans cette thèse que vous vous apprêtez à lire.

Vous l'aurez compris, cette thèse traite de la symbiose entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, *Wolbachia*. Pour ma part, je ne prétends pas être un scientifique passionné par des petites créatures aux mœurs vampiriques. Mon objectif n'est pas non plus d'éradiquer les punaises de lit de la surface de la Terre. Mon choix repose sur une curiosité personnelle pour les interactions symbiotiques. La symbiose est une interaction longue entre deux entités. Omniprésente dans la nature, son maintien nécessite un dialogue et un équilibre permanent. Les relations symbiotiques entre organismes illustrent la subtilité et la complexité des interactions évolutives. Comme l'a si bien exprimé M. Fall Ngai en 2008 : « L'étude de la symbiose en est encore à ses débuts, mais jusqu'à présent, les découvertes laissent entrevoir une révolution dans notre manière de percevoir le monde biotique. »

Au sens plus large nous vivons dans un monde d'interactions. La diversité des espèces constitue un kaléidoscope unifié par des échanges permanents. Ces interactions, qu'elles soient temporaires ou durables, peuvent apporter des changements enrichissants ou destructeurs. Il semblerait que toutes les strates de la vie soient impactées. Ces interactions façonnent notre monde, visibles ou non. Cependant, ces interactions peuvent être fragiles, avec des déséquilibres, des conflits ou des ruptures qui peuvent entraîner des conséquences néfastes pour toutes les parties impliquées. Mon choix d'effectuer un doctorat était motivé par la possibilité d'explorer cette curiosité.

Table des matières

Préface	i
Table des matières	iii
Liste des figures	v
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	ix
-Partie I- Introduction	1
I. À propos de la symbiose	3
Introduction au concept de symbiose.....	3
Diversité des symbioses	5
La symbiose chez les arthropodes.....	7
II. La symbiose comme outil de lutte contre les ravageurs.....	15
Les différentes méthodes de lutte utilisant la symbiose.....	15
Perspectives des méthodes de lutte utilisant la symbiose	20
III. La punaise de lit et <i>Wolbachia</i>	21
Origine et répartition.....	21
Biologie de la punaise de lit.....	23
Endosymbioses chez la punaise de lit.....	28
Menace sanitaire, économique et sociale.....	32
IV. Objectifs de la thèse	35
Utilisation de la symbiose dans la lutte contre la punaise de lit	35
Présentation des objectifs de la thèse	37
-Partie II- Études	39
I. Étude des effets de la symbiose sur les traits de vie de <i>C. lectularius</i>	41
Contexte de l'étude	41
Étude	42

Figures supplémentaires.....	56
Conclusion de l'étude et perspectives	57
II. Dynamique quantitative de l'association	59
Contexte de l'étude	60
Development, feeding, and sex shape the relative quantity of the nutritional obligatory symbiont <i>Wolbachia</i> in bed bugs	61
Conclusion de l'étude et perspectives	84
III. Description de la localisation de <i>wCle</i> au cours du développement	87
Contexte de l'étude	88
<i>Wolbachia</i> as an ovarian-associated symbiont, from the early stage to the adult bed bug.....	89
Conclusion de l'étude et perspectives	101
Étude complémentaire.....	101
-Partie III- Perspectives	107
I. Impact des études sur la compréhension du modèle	109
Problématiques d'élevages et perspectives d'amélioration	109
Un symbiote nutritionnel à la dynamique multifactorielle	112
II. Impact des études sur la compréhension du modèle	119
L'utilisation de la symbiose dans la lutte contre <i>C. lectularius</i>	119
Le rôle des symbiotes secondaires	121
La symbiose comme outils de biocontrôle à l'aire de l'anthropocène.....	122
Références bibliographiques.....	123
Remerciements	145
Résumé	148
Abstract.....	150

Liste des figures

Figure 1. La symbiose comme un continuum le long de la balance coûts/bénéfices.....	4
Figure 2. Les différents effets de la symbiose chez les arthropodes	8
Figure 3. Diversités et localisation des symbiotes primaires d'hématophages strictes.....	11
Figure 4. Description de <i>Wolbachia</i>	13
Figure 5. Schéma explicatif de la modification génétique.	16
Figure 6. Schéma explicatif de l'association hétérologue.	17
Figure 7. Schéma explicatif de la perturbation symbiotique.....	18
Figure 8. Résumé des stratégies de contrôles contre la mouche tsétsé ou le moustique.....	20
Figure 9. Infectiologie de <i>C. lectularius</i> et <i>C. hemipterus</i>	22
Figure 10. Le cycle de vie des punaises de lit.	23
Figure 11. Organes reproducteurs des punaises de lits.	25
Figure 12. Spermode de femelle fécondée observé par électro-microscopie (TEM).....	26
Figure 13. Complémentation métabolique de <i>wCle</i>	29
Figure 14. Localisation des symbiotes primaires et secondaires de la punaise de lit.....	31
Figure 15. Présentation du système Hémotek et schéma du mode de nourrissage	42
Figure 16. Schéma des protocoles de générations de lignées aposymbiotiques.....	43
Figure 17. Résumé des études sur les traits d'histoire de vie de la punaise	45
Figure 18. Schéma du protocole de génération de lignées aposymbiotiques utilisé	48
Figure 19. Effets de <i>wCle</i> et de la supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus.....	51
Figure 20. Effets de <i>wCle</i> et de la supplémentation sur le taux d'éclosion des œufs.....	53
Figure 21. Effets de <i>wCle</i> et de la supplémentation sur le développement des nymphes	53
Figure 22. Dynamique de la quantité du gène de référence <i>wCle</i> 16S par rapport à l'ADN de <i>C. lectularius</i> chez les souches Harold Harlan (HH) et Jersey City (JC).	60
Figure 23. Dynamics of the <i>wCle</i> relative quantity in nymphal bed bugs over development and associated statistics.....	69

Figure 24. Visualization of the bacteriome and endosymbiont dynamics over bed bug development.	70
Figure 25. Dynamics of the relative quantity of <i>wCle</i> from the 5 th instar to adulthood, and during 5 weeks of adulthood.	72
Figure 26. Schéma récapitulatif de l'étude.	84
Figure 27. Schéma présentant le concept expérimental d'analyse transcriptomique des gènes impliqués dans l'interaction lors de l'ingestion de sang.	85
Figure 28. Experimental design of F4-AB breeding.	92
Figure 29. FISH visualization of <i>wCle</i> in the gonads over bed bug development.	95
Figure 30. Ovarian infection and maturation by <i>wCle</i> in adult female.	97
Figure 31. Interpretative scheme of the infection of one ovariole through development.	98
Figure 32. Observation par TEM d'un bactériome de nymphe de stade 4.	103
Figure 33. Observation par TEM d'un ovaire d'adulte à 28 jours.	104
Figure 34. Images de punaises présentant le phénotype « gorgé noir ».	111
Figure 35. Schéma des mécanismes pouvant induire la dynamique de <i>wCle</i>	114
Figure 36. Schéma des voies de transmission possibles de <i>wCle</i> dans les ovaires	116
Figure 37. Cellules embryonnaires destinées à la formation du bactériocyte.	117

Figures supplémentaires

Figure S1. Experimental layout of the nymphal sampling.	76
Figure S2. Experimental layout of the adult sampling.	77
Figure S3. Relative quantity of <i>wCle</i> over development, according to the sampling cohort. .	77
Figure S4. Dynamics of the absolute quantity of <i>Wolbachia</i> and host cells in nymphal bed bugs over development.	78
Figure S5. TEM visualization of <i>wCle</i> in a 4 th instar female bacteriome	79

Liste des tableaux

Tableau 1. Efficacité, applicabilité et risques pour la santé humaine et pour l'environnement des moyens de luttés existants contre la punaise de lit. 36

Tableau 2. Compositions des solutions vitaminiques 43

Tableaux supplémentaires

Tableau S1. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus par femelle..... 56

Tableau S2. Statistiques des effets globaux du facteur d'interruption de la supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus par femelle. 56

Tableau S3. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs éclos. 56

Tableau S4. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le taux d'émergence des adultes. 57

Table S1. PCR primer and fluorescence probe sequences used in the study. 79

Table S2. Statistics for global effects of factors and their interactions in nymphs 80

Table S3. Statistics for global effects of factors in nymphal bacteriomes 81

Table S4. Statistics for global effects of factors and their interactions in the transition between 5th instar and adults..... 82

Table S5. Statistics for global effects of factors and their interactions in adults..... 83

Liste des abréviations

Noms généraux :

ADN : Acide désoxyribo-nucléique

ANOVA : Analyse de la variance

ARN : Acide ribo-nucléique

ARN db : ARN double brin

ARNi : ARN interférence

ARNr : ARN ribosomique

BEV-*like* : Symbiote bactérien d'*Euscelidius variegatus* chez *Cimex lectularius*

CRISPR : courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

DTT : pyréthrinoïdes dithiothréitol

EFS : établissement français du sang

FISH : fluorescence par hybridation *in situ*

GSC : cellules souches de la lignée germinale

KM : Kao&Michayluk

KDR : knock down resistance

TEM : microscopie à transmission électronique

PCR : réaction en chaîne par polymérase

qPCR : PCR quantitative

wCle : *Wolbachia* endosymbiote de *Cimex lectularius*

Nom de souches de Wolbachia :

F4(-V48/-V1/-V6) : souche *London Field 4*, lignée isofemelle 48/1/6

HH : souche Harold Harlan

JESC : souche *Japan Environmental Station Center*

JSC : souche *Jersey city*

TUA : souche *Tokyo University of Agriculture*

Populations élevées :

AC : « aposymbiotique contrôle » privée de supplémentation en vitamines après la mue imaginale

AC.5 : « aposymbiotique contrôle » privée de supplémentation en vitamines à partir du repas précédent la mue imaginale

AV : aposymbiotique supplémenté en vitamines

SA : stock aposymbiotique

SC : « symbiotique contrôle » privée de supplémentation en vitamines

SS : stock symbiotique

SV : symbiotique supplémenté en vitamines

PAV : parentale-aposymbiotique avec supplémentation en vitamines

PSV : parentale symbiotique avec supplémentation en vitamines



-Partie I-
Introduction

I | À propos de la symbiose

Sommaire

Introduction au concept de symbiose.....	3
Diversité des symbioses.....	5
La symbiose chez les arthropodes.....	7
1. Symbioses primaires et secondaires.....	7
2. Exemples de symbioses chez les arthropodes.....	7
3. Symbiose nutritionnelle et expansion de niche.....	10
4. La symbiose chez les arthropodes hématophages strictes.....	10
5. <i>Wolbachia</i> , un symbiote à plusieurs facettes.....	12

Introduction au concept de symbiose

Les interactions entre organismes sont omniprésentes (Margulis, 1999). Ces interactions peuvent être de courte durée quand elles impliquent de la compétition pour une ressource ou de la prédation, ou de longue durée lorsque deux espèces vivent en proche association. Ce dernier type d'interaction a été défini pour la première fois en 1877 par Albert Bernhard Frank et Anton de Bary (Frank, 1877; De Bary, 1879) par le terme « symbiose », créé à partir du grecque *syn* « ensemble » et *bios* « vie ». Le système symbiotique définit deux partenaires distincts, un hôte (i.e., un organisme qui par son volume « héberge ») et un symbiote (i.e., un organisme « hébergé »). L'un des exemples les plus anciennement répertoriés est la symbiose chez les lichens, qui sont des associations mutuellement bénéfiques entre un champignon (généralement un ascomycète) et une algue (Schwendener, 1869; Hertwig, 1883). Le champignon fournit une structure protectrice et des nutriments, tandis que l'algue, par la photosynthèse, produit des nutriments que les deux partenaires partagent.

La notion de symbiose a évolué depuis sa création. Définissant initialement une interaction à long terme d'une biocénose (i.e., ensemble d'êtres vivants appartenant à une même niche) (Frank, 1877), elle a rapidement été étendue à toute association entre espèces. La symbiose ainsi définie se précise classiquement en trois catégories en fonction de si elle implique une

interaction positive (mutualisme), neutre (commensalisme), ou négative (parasitisme) (De Bary, 1879). Dans le cas du lichen, la symbiose est considérée comme un exemple de mutualisme, où les deux organismes bénéficient de la coopération. Cependant, au vu des connaissances actuelles, la symbiose est plus justement définie comme un continuum dynamique entre parasitisme et mutualisme. Des associations mutualistes bénéfiques dans certaines conditions peuvent devenir coûteuses et délétères dans d'autres (Gerardo, 2015; Vásquez *et al.*, 2022). Ainsi, la dichotomie entre mutualisme et parasitisme requiert la prise en considération des conditions externes au système et la prise en compte de la balance coûts/bénéfices (Figure 1).

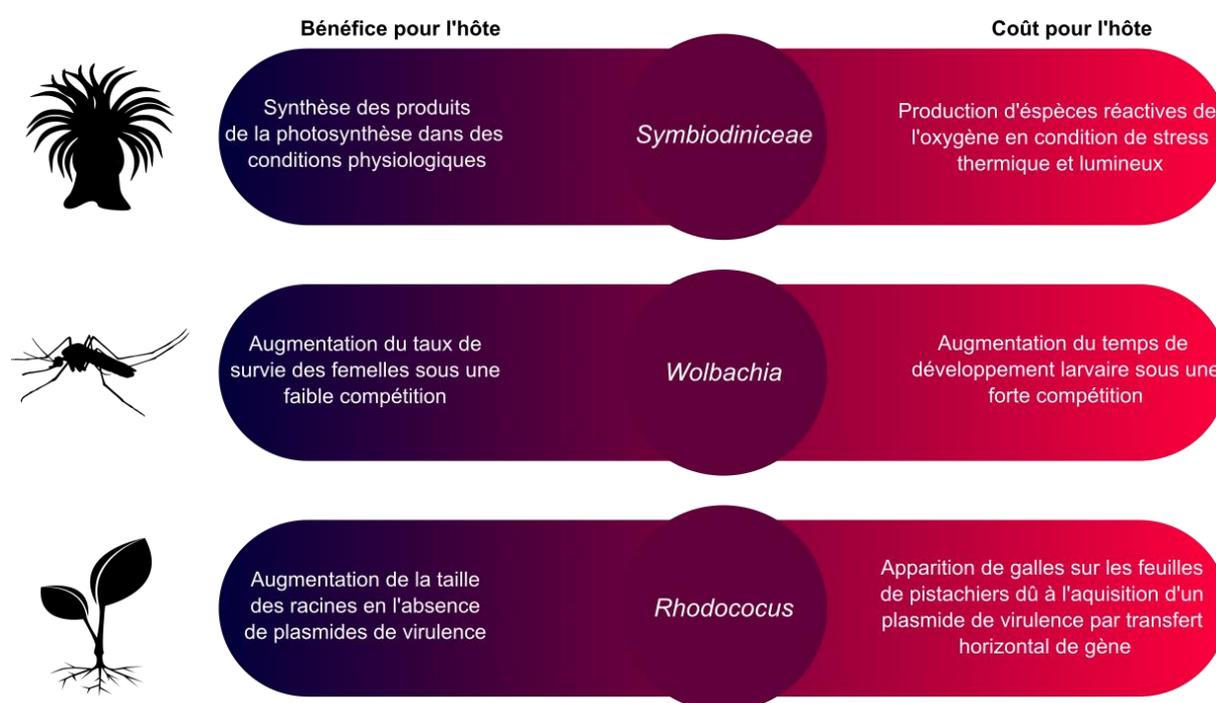


Figure 1. La symbiose comme un continuum le long de la balance coûts/bénéfices. Exemples de symbioses chez le corail (Lesser and Farrell, 2004) en haut, le moustique (Gavotte *et al.*, 2008) au milieu, et le pistachier de l'atlas (Savory *et al.*, 2018) en bas. L'extrémité gauche (en bleu) illustre les conditions où la symbiose penche pour une balance coûts/bénéfices <1 , et l'extrémité droite (en rouge) illustre les conditions où la symbiose penche pour une balance coûts/bénéfices >1 .

Théorisée dans les années 40, une nouvelle notion est venue étoffer la définition de la symbiose. Ces dernières décennies, avec la simplification des techniques d'observation et de séquençage sans *a priori*, certains laboratoires ont commencé à générer et analyser des données issues d'organismes symbiotiques dans leur ensemble (Alberdi *et al.*, 2022). Ainsi, l'hôte et les symbiotes qui constituent son environnement biotique peuvent être considérés comme un tout qui est appelé un « holobionte », du grec *holos* « tout » et *bios* « vie » (Meyer-Abich, 1943; Gilbert, Sapp and Tauber, 2012; Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2013). Dans cette vision de la symbiose, les partenaires de la symbiose sont interdépendants pour leur développement et

leur reproduction, ils constituent donc une unité biologique sujette à la sélection naturelle (Feldhaar, 2011; Bordenstein and Theis, 2015). En effet, les phénotypes étendus qui résultent de chaque partenaire symbiotique sont modifiés par ceux résultant des interactions entre ces partenaires et avec l'environnement. Par exemple, dans un cadre penchant vers le mutualisme chez l'humain, les nutriments présents dans l'intestin sont utilisés par le microbiote pour son propre développement. Ce microbiote produit aussi des molécules ayant un effet bénéfique sur le système immunitaire de l'hôte pour la lutte contre des microorganismes pathogènes (Postler and Ghosh, 2017). Un autre exemple concerne les bactéries présentes dans les racines des légumineuses, qui bénéficient des sucres produits par la plante et favorisent sa croissance en fournissant de l'azote. Cette symbiose est impactée par d'autres microorganismes voisins et par les conditions environnementales (Dimijian, 2000).

Cependant, le concept d'holobionte en tant qu'unité de sélection principale reste sujet à controverse (Douglas and Werren, 2016). Par ailleurs, il est difficile de déterminer une limite concrète entre l'organisme et son environnement biotique. Ceci est particulièrement vrai pour les organismes ayant un environnement biotique complexe comme dans l'agriculture, où la question d'un « microbiote optimal » se pose (Ikeda-Ohtsubo *et al.*, 2018). De plus, des conflits peuvent exister entre les membres d'un holobionte. Un hôte distinct de son microbiome est plus facilement appréhendable comme une communauté écologique d'organismes qui englobe un large éventail d'interactions (parasites à mutualistes), de modes de transmission (horizontale à verticale) et de niveaux de fidélité entre les partenaires (Douglas and Werren, 2016; Madhusoodanan, 2019). Quand bien même il existe une controverse quant à la conceptualisation des interactions symbiotiques, la combinaison des génomes des organismes en interaction détermine en grande partie le phénotype, et peut impacter la valeur sélective et la trajectoire évolutive de ces organismes dans un environnement (Foster *et al.*, 2017).

Dans cette thèse, qui traite de l'interaction entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, nous nous tiendrons à une définition de la symbiose où l'hôte et le symbiote qui l'infecte sont interprétés comme deux entités distinctes. Les termes relatifs à l'infection d'un hôte par un symbiote seront utilisés indépendamment de si la symbiose balance vers un mutualisme ou vers un parasitisme.

Diversité des symbioses

Des exemples de symbiose sont présents dans chaque environnement, qu'il soit terrestre [e.g., lichens (Schwendener, 1869), mycorhizes et rhizobiums de végétaux (Dimijian, 2000), microbiote de vertébrés et d'invertébrés (Douglas, 2015)], ou aqueux [e.g., coraux, éponges, bivalves, mollusques, vers marins, algues (Dubilier, Bergin and Lott, 2008), vers tubicoles géants (Dubilier, Bergin and Lott, 2008)]. Ces symbioses ont la capacité de modifier des environnements, former de nouvelles niches, et stimuler l'expansion des écosystèmes à travers

une utilisation innovante et compétitive des ressources. Ainsi les symbioses jouent un rôle central en tant que moteurs de changement écologique et évolutif. De nombreuses symbioses sont des éléments clés des écosystèmes (Hom and Penn, 2021). La diversité de ces milieux donne lieu à des associations variées qui se déploient à différentes échelles et s'accompagnent de réorganisations morphologiques de l'hôte ou de son environnement formant un milieu propice au maintien de la symbiose (Kremer *et al.*, 2018; Gilbert, 2020). Ces interactions se manifestent à travers différents niveaux d'intégration de l'hôte, incluant des interactions extra-organismes (e.g., ectosymbiose de nématode marins (Dubilier, Bergin and Lott, 2008)), intra-organismes (e.g., endosymbiose du microbiote intestinal (Ruehland *et al.*, 2008)), intracellulaires (e.g., endosymbiose des arthropodes (Douglas, 2015)), et même en tant qu'organites dans les cellules eucaryotes (e.g., mitochondries et plastes (Margulis, 1967; Mcfall-ngai, 2008; Archibald, 2015; Wein *et al.*, 2019)). Les symbiotes peuvent être transmis verticalement des parents à la descendance par les voies reproductives (e.g., symbioses intracellulaires chez les insectes) ou bien se transmettre horizontalement entre les membres d'une population via l'environnement (e.g., microbiote chimiosynthétique des vers tubicoles géants) (Bright and Bulgheresi, 2010; Fisher *et al.*, 2017).

Dans les endosymbioses, qui nous intéressent plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, les symbiotes, la plupart du temps bactériens, forment des associations stables en colonisant les cellules de leur hôte, la plupart du temps eucaryote (Schaechter, 2016). Dans tous les types d'associations, les symbiotes doivent contourner les défenses de l'hôte pour permettre leur établissement (Medzhitov, 2007; Mergaert, 2018). Ainsi, les symbiotes ont été sélectionnés pour être adaptés aux voies de régulation de leur hôte. Ces adaptations peuvent se traduire par une modification de ces voies pouvant induire un coût pour l'hôte.

La symbiose agit comme une force évolutive, pouvant alimenter la diversité, l'adaptation et la nouveauté biologique (Heddi and Zaidman-Rémy, 2018). Les systèmes symbiotiques peuvent rendre des services écosystémiques et participer aux cycles biogéochimiques (Bender *et al.*, 2014; Beinart, 2019). Dans l'agriculture la fixation symbiotique de l'azote (Peoples *et al.*, 2009) participe au développement des plantes tandis que le microbiote intestinal permet la stimulation immunitaire humaine et animale (McFall-Ngai, 2014). Les symbioses mycorhiziennes favorisent la structuration du sol et la rétention de l'eau (Querejeta, 2017). Aussi, la symbiose peut promouvoir la biodiversité, avec par exemple, les écosystèmes de récifs coralliens (Blackall, Wilson and Van Oppen, 2015). Ainsi, les symbioses apportent des services essentiels pour la société humaine (Hom and Penn, 2021).

La symbiose chez les arthropodes

I. Symbioses primaires et secondaires

Les arthropodes sont l'embranchement animal le plus diversifié, ceci se reflète non seulement dans l'abondance des espèces, mais aussi dans la variété des écosystèmes qu'ils habitent (May, 1988). La diversification et le succès évolutif des arthropodes sont facilités par des associations symbiotiques avec des micro-organismes (Buchner, 1965; Duron and Hurst, 2013; Sudakaran, Kost and Kaltenpoth, 2017; Cornwallis *et al.*, 2023). En effet, environ 20% des arthropodes possèdent un endosymbiote bactérien permanent (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Schaechter, 2016). Ils sont généralement distingués en deux catégories : les endosymbiotes primaires et secondaires. Les endosymbiotes primaires forment des associations obligatoires avec leurs hôtes qui se sont développées sur de longues échelles de temps évolutif. Généralement ces symbiotes ont perdu une partie importante de leur génome et ne conservent que les fonctions engagées dans la symbiose. Ils ont ainsi souvent perdu la capacité de se développer indépendamment de leurs hôtes (Baumann, Moran and Baumann, 2006; Feldhaar and Gross, 2009; McCutcheon and Moran, 2012). La localisation des endosymbiotes primaires au sein de leurs arthropodes hôtes est le plus souvent limitée à des cellules spécialisées, appelées bactériocytes, qui forment souvent des organes symbiotiques appelés bactériomes (Buchner, 1965). Les symbiotes secondaires sont des symbiotes facultatifs du point de vue de l'hôte et se trouvent de manière intracellulaire et/ou extracellulaire dans divers tissus de l'hôte (Dale, 2006). Les endosymbiotes secondaires peuvent être transmis verticalement ou horizontalement (Russell *et al.*, 2003; Oliver *et al.*, 2010).

2. Exemples de symbioses chez les arthropodes

Les associations symbiotiques peuvent être associées à une variété importante de phénotype physiologiques ou écologiques (Douglas, 2015) (Figure 2). Les plus répandus sont une complémentation nutritionnelle des régimes déséquilibrés (Zientz, Dandekar and Gross, 2004), une résistance aux agents oxydants (Hom and Penn, 2021; Zhang *et al.*, 2021), une résistance accrue aux agents pathogènes, parasitoïdes ou prédateurs (Brownlie and Johnson, 2009; Kaltenpoth, 2009; Oliver *et al.*, 2010) et une tolérance aux stress abiotiques comme la chaleur ou la dessiccation (Dunbar *et al.*, 2007; Kanyile *et al.*, 2023). D'autres symbioses impliquant le changement du comportement ou du phénotype de l'hôte peuvent aussi exister (Ferrari and Vavre, 2011; Poulin, Jorge and Salloum, 2023). De manière intéressante, certains arthropodes arborent des symbioses qui leur permettent de résister à des stress chimiques, notamment causés par les insecticides (Liu and Guo, 2019). Certaines de ces symbioses de résistance ont été sélectionnées suite à l'utilisation massive d'insecticides au cours des dernières décennies, montrant ainsi que les fonctions associées à ces symbioses peuvent être associées à des adaptations rapides (Feldhaar, 2011; Cornwallis *et al.*, 2023). Dans la suite de ce paragraphe, je développerai quelques exemples de symbioses chez les arthropodes.

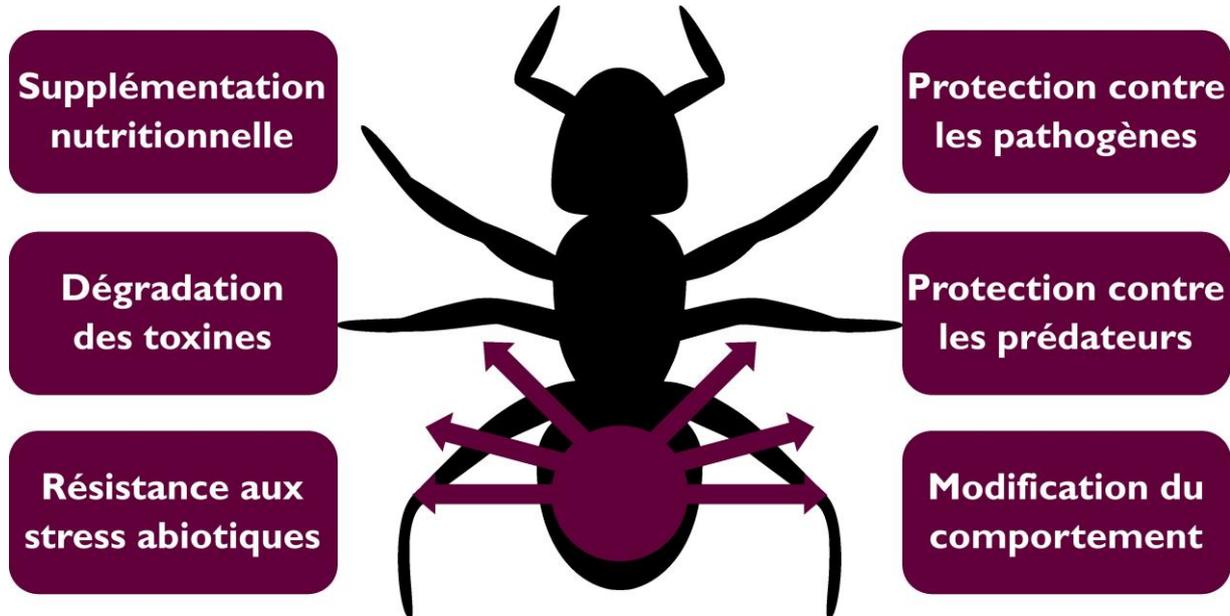


Figure 2. Les différents effets bénéfiques de la symbiose chez les arthropodes. Schémas adapté de (Siddiqui *et al.*, 2022).

a. Symbioses nutritionnelles

Une majorité des symbioses aujourd'hui étudiées sont impliquées dans la supplémentation des régimes alimentaires de l'hôte, déséquilibrés ou pauvres en éléments nutritifs (Cornwallis *et al.*, 2023). Certains symbiotes peuvent fournir des nutriments ou des cofacteurs spécifiques, qui manquent au régime nutritionnel de certains arthropodes et qu'ils sont incapables de synthétiser (Nikoh *et al.*, 2014; Newton and Rice, 2020). Ces nutriments et cofacteurs peuvent inclure les acides aminés essentiels, les vitamines B, les stérols, le fer et des nucléotides (Newton and Rice, 2020; Cornwallis *et al.*, 2023). Par exemple, le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* dépend de *Buchnera aphidicola* pour synthétiser les vitamines B et des acides aminés absents de la sève élaborée dont il se nourrit (Akman Gündüz and Douglas, 2012; Blow *et al.*, 2020). De plus, les symbiotes sont cruciaux pour la dégradation des parois cellulaires végétales chez les arthropodes xylophages ou lignivores, où ils dégradent progressivement la cellulose et les hémicelluloses en sucres fermentables, qui sont ensuite utilisés par l'hôte (Geib *et al.*, 2008; Kiefer *et al.*, 2023).

b. Résistance aux toxines

L'évolution et la sélection récente d'insectes ayant développé des résistances aux insecticides constitue la plupart des exemples de détoxification chez les arthropodes (Kikuchi *et al.*, 2012; Hom and Penn, 2021). Cependant, il existe des cas où des endosymbiotes interviennent. Par exemple, certaines bactéries intestinales, comme celles des genres *Pseudomonas* et *Rahnella*, aident le dendroctone du pin *Dendroctonus ponderosa* à utiliser des arbres riches en terpènes en dégradant ces composés (Adams *et al.*, 2013).

c. Protection contre les pathogènes

L'évolution a sélectionné les microorganismes environnementaux qui s'approprient leurs sites de ressources. L'organisme de l'hôte étant un environnement à part entière, il ne fait pas exception. Ainsi, les symbiotes colonisant l'environnement de leur hôte développent des structures sélectives (e.g., biofilms), sont en compétition pour des ressources (e.g., captation du fer), produisent des toxines et/ou stimulent le système immunitaire de l'hôte. Ceci entraîne une compétition avec d'autres microorganismes pathogènes qui infectent l'hôte ainsi qu'une stimulation du système immunitaire. Par exemple, des composés antimicrobiens permettent à des arthropodes vivant dans des environnements humides propices aux infections fongiques à se protéger contre ces dernières, comme *Regiella insecticola* chez les pucerons du pois (Scarborough, Ferrari and Godfray, 2005).

d. Protection contre les prédateurs

Certaines symbioses peuvent entraîner une modification de la physiologie, du comportement ou de l'aspect de l'hôte, lui conférant une protection contre les prédateurs. Le puceron du pois *A. pisum* (naturellement rouge) présente un polymorphisme de couleur et devient vert grâce à l'association avec *Rickettsiella* (Tsuchida *et al.*, 2010). La présence du symbiote diminue ainsi la sensibilité du puceron aux prédateurs attirés par le rouge (comme la coccinelle) et l'augmente face aux guêpes parasitoïdes attirées par les pucerons de couleur verte. De manière intéressante, les pucerons présentent aussi une symbiose protectrice avec *Hamiltonella defensa* infecté par le phage APSE qui perturbe le développement de la larve parasite (Oliver *et al.*, 2003; Oliver and Higashi, 2019).

e. Tolérance aux facteurs abiotiques

La tolérance au stress est un facteur important dans la détermination de l'aire de répartition géographique d'un organisme (Skendžić *et al.*, 2021). Par exemple, la température et l'humidité peuvent avoir des effets directs sur les hôtes, mais aussi des effets indirects en modifiant l'abondance ou la transmission des symbiotes. Chez *Bemisia tabaci*, des *Rickettsiales* induisent l'expression de gènes liés au stress dans des conditions de température normales. Lorsque la température augmente, le nombre de transcrit de ces gènes diminue avec le nombre de symbiote, induisant une thermotolérance (Brumin, Kontsedalov and Ghanim, 2011). Cependant cette symbiose a un coût en induisant une forte réduction de la fertilité à des températures basses (Brumin, Kontsedalov and Ghanim, 2011).

f. Modification du comportement et manipulation de la reproduction

Des symbiotes peuvent influencer le comportement de leur hôte en favorisant leur probabilité de transmission. Ceci peut aussi avoir des effets bénéfiques pour l'hôte (Ferrari and Vavre, 2011). Par exemple, les *Wolbachia* sont impliquées dans de nombreuses manipulations de la reproduction (Werren, Baldo and Clark, 2008). Ces modifications reproductrices peuvent

cependant être à l'avantage de la symbiose où les femelles infectées ont un avantage de fécondité indépendant de la prévalence de l'infection (Sinkins and O'Neill, 2000; Dobson, Rattanadechakul and Marsland, 2004; Iturbe-Ormaetxe, Walker and O'Neill, 2011).

3. Symbiose nutritionnelle et expansion de niche

Étant donné la variété des effets que procurent les symbioses chez les arthropodes, ces dernières peuvent jouer un rôle important dans la facilitation d'invasions de certaines niches par certaines espèces. En effet, les complémentations décrites ci-dessus ont permis aux hôtes de prospérer dans des environnements qui leurs étaient auparavant inhospitaliers (Moran, Tran and Gerardo, 2005; Bennett and Moran, 2015; Cornwallis *et al.*, 2023). En particulier, les symbioses nutritionnelles ont permis ou donné aux arthropodes la possibilité de survivre en ayant des régimes déséquilibrés basés sur la sève des plantes ou le sang des vertébrés (Akman Gündüz and Douglas, 2012). Par exemple, des fourmis et des coléoptères sont associés avec des symbiotes supplémentant en tyrosine requise pour renforcer leurs cuticules fortement sclérifiées et limiter la dessiccation (Jackson *et al.*, 2022; Dell'Aglio *et al.*, 2023; Kiefer *et al.*, 2023); certains herbivores spécialisés sont associés avec des symbiotes produisant des enzymes digestives qui dégradent les parois cellulaires végétales (Salem *et al.*, 2017) ou avec des bactéries fournissant des acides aminés essentiels absents du phloème et du xylème des végétaux (Douglas, 2009; Akman Gündüz and Douglas, 2012).

En somme, il a été mis en évidence que les symbioses ont permis aux arthropodes de se spécialiser dans un éventail de régimes alimentaires, incluant la phytophagie, la xylophagie et l'hématophagie. Au sein de ces régimes une famille de nutriments s'est régulièrement démarquée en lien avec l'évolution des symbioses obligatoires : les vitamines B (Hansen and Moran, 2014; Cornwallis *et al.*, 2023). Alors que dans certains contextes, comme dans le cas de l'herbivorie, cela a engendré une importante prolifération d'espèces, dans d'autres niches, telles que l'hématophagie stricte, la diversification s'est avérée plus restreinte (Cornwallis *et al.*, 2023).

4. La symbiose chez les arthropodes hématophages strictes

Les arthropodes hématophages stricts se nourrissent exclusivement du sang des vertébrés pour leur développement et leur reproduction (Duron and Gottlieb, 2020). Bien que leur cycle de vie, leur comportement alimentaire ou leur stratégie de reproduction diffèrent, ces arthropodes partagent tous une caractéristique commune : leur dépendance symbiotique pour compléter leur développement et leur reproduction (Hosokawa *et al.*, 2010; Ben-Yosef *et al.*, 2020; Wang, Gao and Aksoy, 2023). En effet, le sang des vertébrés est riche en protéines, fer et sels minéraux mais il est pauvre en carbohydrate, lipides et certains métabolites essentiels, notamment les vitamines B. De plus, pendant la prise de repas, l'hôte consomme généralement une quantité de sang équivalant à plusieurs fois son poids, dont la digestion génère d'importantes quantités d'hème et d'ammoniac, potentiellement toxiques à moins d'être

rapidement métabolisés (Sterkel *et al.*, 2017). Ces arthropodes sont toujours associés à un/des symbiote(s) primaire(s) responsable(s) de la supplémentation en vitamines B, mais ils sont aussi souvent associés à des symbiotes secondaires impliqués dans la détoxification des repas sanguins (Duron and Gottlieb, 2020; Song *et al.*, 2022) (Figure 3). La capacité des symbiotes à synthétiser les vitamines B est liée soit à la conservation de voies de biosynthèses comme le folate ou la riboflavine, soit à l'acquisition d'un opéron par transfert horizontal de gène, comme c'est le cas pour la voie de biosynthèse de la biotine qui est très bien représenté parmi les hématophages (Nikoh *et al.*, 2014; Řihová *et al.*, 2017).

Les symbiotes fournissant des vitamines B ont développé des associations étroites avec leurs hôtes. Ils peuvent être localisés dans des organes spécialisés comme les bactériomes, mais aussi les intestins, les tubes de Malpighi (Figure 3). Dans la plupart des cas, ces symbiotes sont maintenus tout au long du cycle de vie de leurs hôtes et transmis verticalement par voie ovarienne (Figure 3) où ils infectent l'œuf. Le mode de vie intracellulaire et la coévolution entre les symbiotes et l'hôte ont considérablement réduit la capacité fonctionnelle des symbiotes à vivre sans leur hôte, rendant compliquée leur culture et donc leur étude. C'est le cas de *Wolbachia*, un symbiote primaire de la punaise de lit (Figure 3) qui chez son hôte hématophage est responsable de la biosynthèse de la riboflavine (vitamine B2) et de la biotine (vitamine B7) (Nikoh *et al.*, 2014; Moriyama *et al.*, 2015).

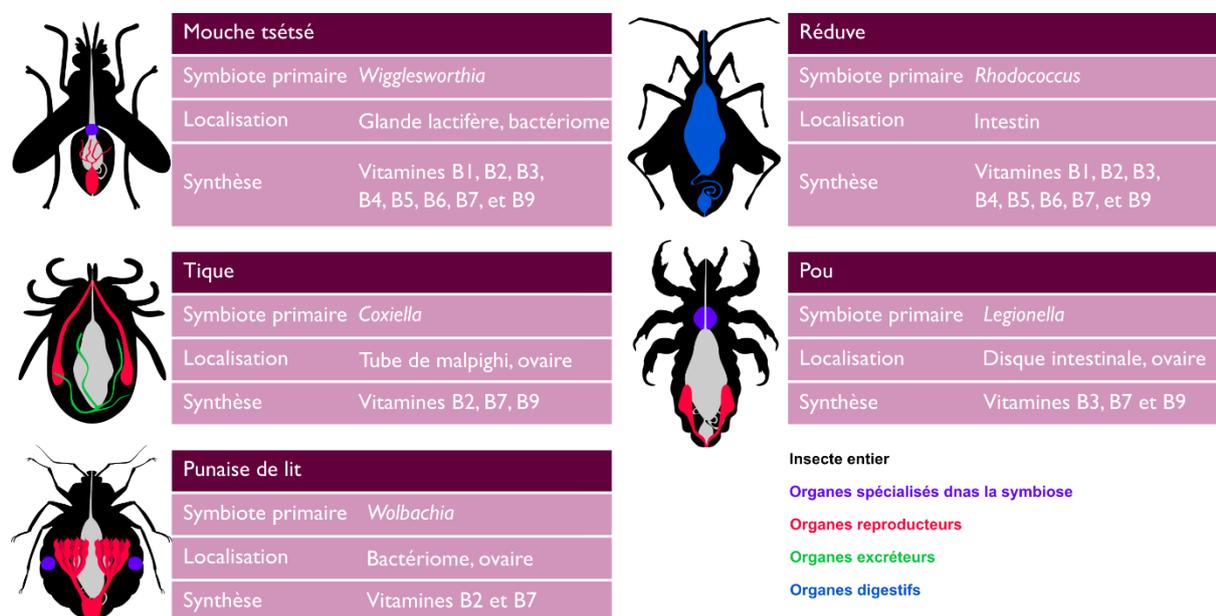


Figure 3. Diversité et localisation de symbiotes primaires d'hématophages strictes. Les symbiotes primaires ont été observés dans les organes spécialisés dans la symbiose comme les bactériomes, les disques intestinaux (violet), les organes reproducteurs comme les ovaires et les glandes lactifères (rouge), les organes excréteurs comme les tubes de Malpighi (vert) et les organes digestifs comme l'intestin (bleu). Ce travail est basé sur la synthèse de plusieurs revues (Rio, Attardo and Weiss, 2017; Duron and Gottlieb, 2020; Hussain *et al.*, 2022).

5. *Wolbachia*, un symbiote à plusieurs facettes

Au sein de l'ordre des *Rickettsiales* se situe le genre *Wolbachia*. Il s'agit d'alphaprotéobactéries intracellulaires de type Gram négatif (Figure 4A). La découverte de *Wolbachia* est attribuée à Hertig et Wolbach qui ont observé des bactéries de type *Rickettsia* chez plusieurs insectes dont le moustique *Culex pipiens* et la punaise de lit *Cimex lectularius* (Hertig and Wolbach, 1924). Depuis, *Wolbachia* a été identifiée chez près de 60% des arthropodes (Hilgenboecker *et al.*, 2008; Weinert *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2021) et certains nématodes (Grote *et al.*, 2017). Les espèces du genre *Wolbachia* ont été divisées en huit supergroupes monophylétiques différents (A–H) (Figure 4B) (Casiraghi *et al.*, 2001; Baldo and Werren, 2007). La plupart des supergroupes infectent les arthropodes, tandis que trois supergroupes C, D et F infectent les arthropodes et les nématodes filaires (Lo *et al.*, 2002; Werren, Baldo and Clark, 2008).

Les associations à *Wolbachia* présentent des mécanismes variés, des effets contrastés et un tropisme étendu (e.g., système nerveux, intestins, bactériocytes, gonades (Serbus and Sullivan, 2007)). *Wolbachia* est un endosymbiote bien caractérisé, notamment connu pour être un manipulateur de la reproduction (Werren, Baldo and Clark, 2008; Engelstädter and Hurst, 2009). Cependant ces dernières années, *Wolbachia* a été décrite plusieurs fois comme impliquée dans d'autres processus symbiotiques comme la supplémentation nutritionnelle (Hosokawa *et al.*, 2010), la résistance aux pathogènes (Teixeira, Ferreira and Ashburner, 2008), le comportement d'accouplement de son hôte, son métabolisme, sa longévité (Pietri, DeBruhl and Sullivan, 2016). De manière intéressante, les supergroupes A et B, qui sont les plus courants, regroupent des symbioses où *Wolbachia* est majoritairement un manipulateur de la reproduction, tandis que les supergroupes C, D et F regroupent des symbioses où *Wolbachia* induit majoritairement des effets protecteurs ou nutritionnels (Mahmood *et al.*, 2023).

a. Un manipulateur de la reproduction

Le succès des symbioses à *Wolbachia* chez les arthropodes est en partie dû à leur capacité à modifier la reproduction de leur hôte (Werren, Baldo and Clark, 2008), favorisant les femelles infectées par rapport aux non infectées et renforçant ainsi leur propagation dans les populations non infectées (Dobson, Rattanadechakul and Marsland, 2004). Ces manipulations reproductrices passent par la féminisation des hôtes infectés, la parthénogénèse thélytoque où les femelles infectées peuvent donner seule une descendance, l'élimination des mâles infectés ou encore l'incompatibilité cytoplasmique (Kose and Karr, 1995; Hilgenboecker *et al.*, 2008) qui est le phénomène le plus fréquemment identifié et qui consiste en une modification du sperme des mâles infectés le rendant incompatible avec les œufs des femelles non infectées (Figure 4C). Toutes ces manipulations de la reproduction favorisent la valeur sélective des femelles infectées, maximisant la transmission de *Wolbachia* dans la population.

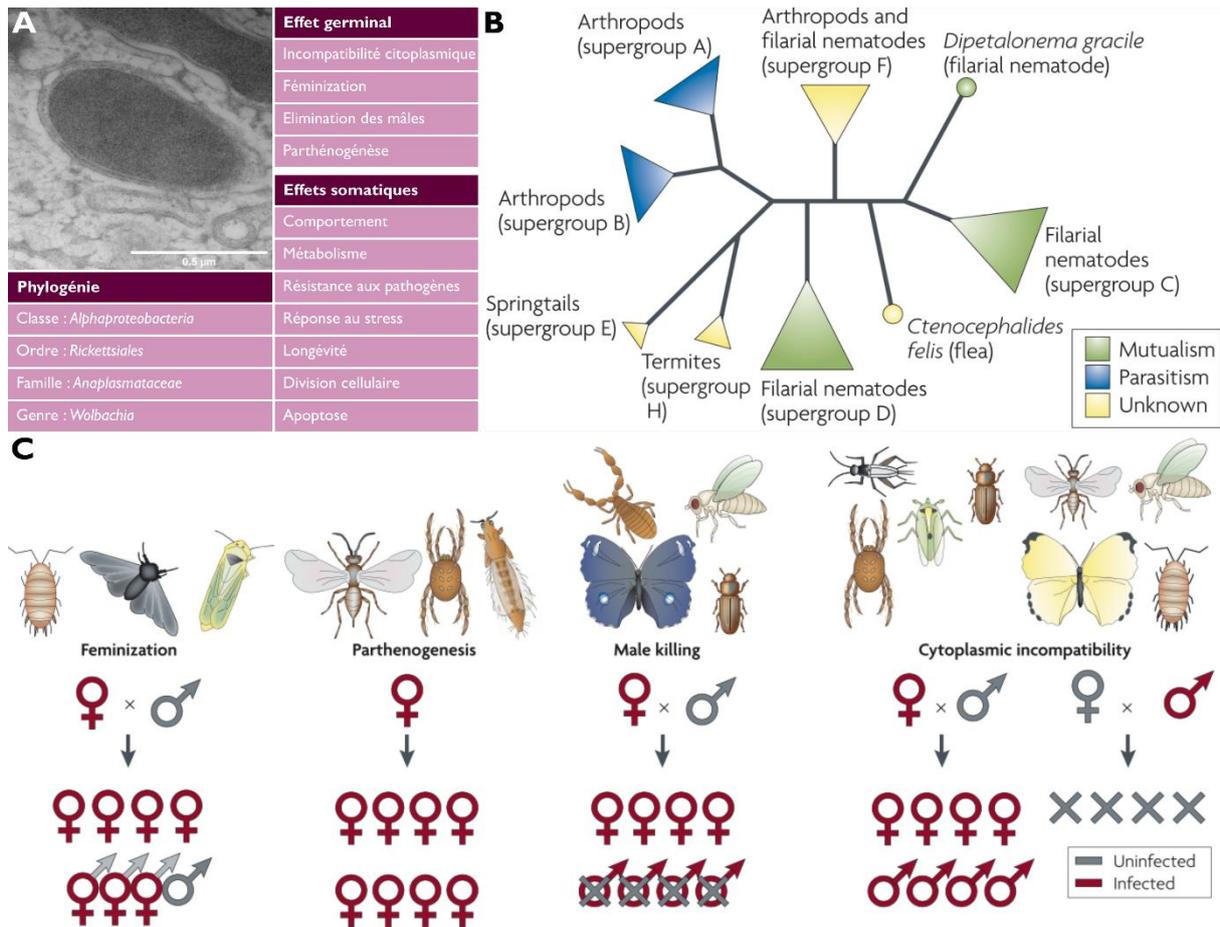


Figure 4. Description de *Wolbachia*. **A.** Phylogénie et effets somatiques ou germinatifs de *Wolbachia* (Porter and Sullivan, 2023). L'image est une observation par électromicroscopie à transmission de *Wolbachia* chez la punaise de lit. **B.** Arbre phylogénétique des principaux supergroupes de *Wolbachia*. Sont présentés les modèles dominants de mutualisme (vert) et de manipulateur reproductif (bleu) dans les supergroupes. Pour certains supergroupes, les effets fonctionnels de *Wolbachia* n'ont pas encore été déterminés (jaune) (Werren, Baldo and Clark, 2008). **C.** Description des mécanismes de manipulation de la reproduction induits par *Wolbachia* (Werren, Baldo and Clark, 2008)

b. Un symbiote mutualiste

Wolbachia est moins connue pour ses effets mutualistes, notamment la résistance aux infections parasitaires et virales (Bruner-Montero and Jiggins, 2023), la résistance aux biocides et environnements hostiles (Darby *et al.*, 2012; Gruntenko *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020; Soh and Veera Singham, 2022), le métabolisme de détoxification (Zhang *et al.*, 2021) et, chez certains arthropodes, la croissance, le développement et la reproduction par supplémentation nutritionnelle par supplémentation des régimes hématophage en vitamines B (Hosokawa *et al.*, 2010; Ju *et al.*, 2020; Newton and Rice, 2020; Serrato-Salas and Gendrin, 2022; Wang, Gao and Aksoy, 2023).

Parmi ces effets, la protection contre les pathogènes est la mieux documentée car beaucoup utilisée en méthode de biocontrôle chez les arthropodes vecteurs d'arbovirus. En effet, chez certains diptères porteurs d'arbovirus comme *Culex quinquefasciatus* ou *Aedes aegypti*, *Wolbachia* permet de réduire la charge virale de certains de ces arbovirus (Hedges *et al.*, 2008). À l'origine, la souche de *Wolbachia* utilisée dans cette méthode de biocontrôle est originaire de la mouche *Drosophila melanogaster*, chez qui elle confère une résistance ou une tolérance à certains virus limitant la mortalité induite par le virus et augmentant sa fertilité (Teixeira, Ferreira and Ashburner, 2008; Bruner-Montero and Jiggins, 2023). La supplémentation nutritionnelle est aussi un effet démontré de certaines souches de *Wolbachia*, bien que moins connu. *Wolbachia* est impliquée dans la supplémentation en vitamines B et dans le transfert de métabolites comme le fer ou certains nucléotides (Newton and Rice, 2020). Très récemment, une étude aurait démontré qu'en absence de son symbiote, *D. melanogaster* subirait une augmentation de la mortalité des pupes, une diminution de l'émergence et de la taille des adultes. Ce phénotype serait restauré par la supplémentation en pyrimidine apporté par *Wolbachia* (Lindsey *et al.*, 2023). Un exemple chez les arthropodes hématophages est la supplémentation du régime sanguin de la punaise de lit *C. lectularius* en riboflavine et biotine par *Wolbachia*, sans lesquelles la punaise pond moins d'œufs viables, ralentit sa phase nymphale, et diminue de taille au stade adulte (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022).

L'importance de *Wolbachia* comme d'autres symbiotes dans la biologie de leur hôte propose des perspectives intéressantes. Les hématophages stricts sont connus pour être des ravageurs potentiellement vecteurs de pathogènes. Des outils de biocontrôle pourraient ainsi perturber ces interactions vitales.



La symbiose comme outils de lutte contre les ravageurs

Sommaire

Les différentes méthodes de lutte utilisant la symbiose.....	15
1. Paratransgénèse	16
2. Associations hétérologues	17
3. Perturbation symbiotique	18
Perspectives des méthodes de lutte utilisant la symbiose	20

Les différentes méthodes de lutte utilisant la symbiose

Au sein des arthropodes, de nombreux insectes sont des ravageurs (regroupant les vecteurs de pathogènes, les ravageurs de culture et autres nuisibles) associés à des symbiotes. Parfois établies depuis plus de 300 millions d'années, ces symbioses ont permis aux ravageurs de coloniser des niches hautement spécialisées créant une spécificité d'interaction et une interdépendance entre un symbiote et son hôte (Cornwallis *et al.*, 2023). Ainsi, la manipulation des symbiotes peut être utilisée comme un outil de biocontrôle ciblé contre un ravageur : soit en modifiant l'impact de ce ravageur en changeant ses caractéristiques (e.g., altération de la plage d'hôtes, tolérance aux conditions abiotiques, réduction de la compétence à transmettre des agents pathogènes), soit en éliminant le ravageur par ajout d'un symbiote exogène ou le retrait du symbiote d'origine, s'il est obligatoire (Arora and Douglas, 2017). Ainsi, diverses stratégies impliquant la symbiose peuvent être mises en place pour lutter contre des insectes ravageurs, notamment pour les insectes vecteurs d'arbovirus. Ces stratégies permettent de répondre aux objectifs actuels visant à garantir la spécificité des agents de biocontrôle vis-à-vis de l'insecte cible sans diffusion de composés bioactifs, de nouveaux microorganismes ou de leurs gènes dans l'environnement non-cible.

I. Paratransgénèse

La paratransgénèse consiste en la modification génétique d'un symbiote afin de lui faire exprimer de nouveaux gènes modifiant l'interaction entre le symbiote et son hôte (Figure 5). Cette technique comporte des avantages, car il est peut-être plus facile de modifier génétiquement un symbiote que son hôte et le symbiote génétiquement modifié peut rapidement coloniser la population cible. Cependant elle comporte aussi des inconvénients. Premièrement, le symbiote doit être cultivable pour pouvoir être manipulé génétiquement, ce qui n'est pas le cas de nombreux endosymbiotes. Deuxièmement, il doit pouvoir être facilement transmissible pour faciliter la diffusion du trait souhaité (Beard, Cordon-Rosales and Durvasula, 2002). Enfin, la paratransgénèse comporte des risques de dissémination des gènes modifiés dans l'environnement par transfert horizontal à d'autres bactéries ou par la dissémination vers des hôtes non ciblés.

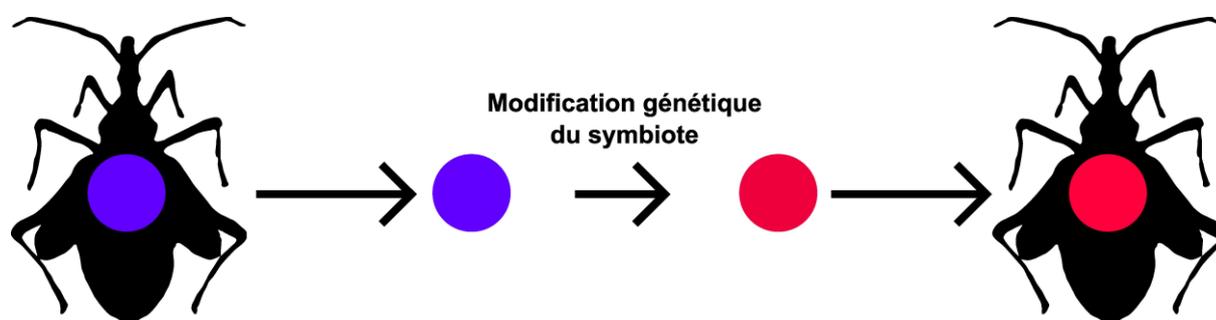


Figure 5. Schéma explicatif de la modification génétique. Le cercle bleu représente un symbiote qui est extrait de l'insecte hôte (ici le réduve) pour être génétiquement modifié pour un caractère souhaité (cercle rouge) avant d'être transféré dans l'espèce receveuse (ici toujours le réduve) (adapté de Arora *et al.* 2017 (Arora and Douglas, 2017)).

a. Suppression de la compétence vectorielle des hôtes

La paratransgénèse peut permettre de supprimer la compétence vectorielle d'un hôte. Chez le réduve *Rhodnius prolixus*, vecteur de *Trypanosoma cruzi*, le parasite responsable de la maladie de Chagas, le symbiote nutritionnel *Rhodococcus rhodnii* a été isolé puis transformé pour exprimer un peptide antimicrobien actif contre le trypanosome. Ainsi, la charge du trypanosome est réduite chez les réduves colonisés par le *R. rhodnii* transformé, et empêche la transmission du parasite à l'homme (Durvasula *et al.*, 1997).

b. Microorganismes génétiquement modifiés comme insecticides

La paratransgénèse peut être utilisée pour faire exprimer au symbiote des éléments toxiques pour l'hôte. Toujours chez le réduve, *R. rhodnii* a été transformé avec un ARNdb contre le gène codant pour la vitelline de *R. prolixus* et, après ingestion, la fertilité et la fécondité de l'insecte ont été considérablement réduites. Cependant, malgré la capacité démontrée des symbiotes génétiquement modifiés à modifier la compétence des vecteurs et à supprimer les populations d'insectes ravageurs, ces méthodes n'ont pas été développées sur le terrain.

2. Associations hétérologues

Les associations hétérologues sont créées par le transfert en l'état d'un symbiote d'une espèce d'insecte à une autre qui n'abrite pas naturellement le symbiote (Figure 6). Ce nouveau symbiote peut altérer la physiologie de l'insecte de différentes manières. Cette technique est aujourd'hui largement utilisée dans le contrôle des populations d'insecte vecteurs d'arbovirus (Bourtzis *et al.*, 2016). Cependant elle connaît quelques limites. Premièrement, le symbiote doit pouvoir coloniser les populations cibles (McMeniman *et al.*, 2009). Deuxièmement, ces associations peuvent évoluer vers des coûts physiologiques plus faibles et donc vers un phénotype anti-pathogène plus faible ou vers une augmentation de la virulence des pathogènes (Vavre and Charlat, 2012; Sinkins, 2013; Monnin *et al.*, 2016; Ross *et al.*, 2017; Vásquez *et al.*, 2022).

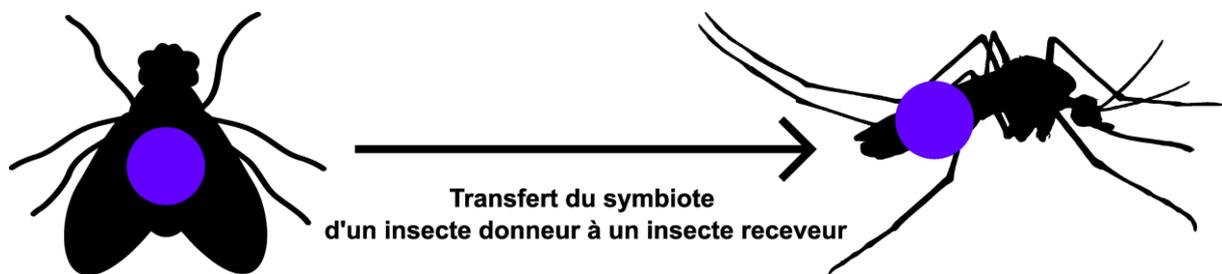


Figure 6. Schéma explicatif de l'association hétérologue. Le cercle violet représente un symbiote qui est transféré d'un insecte (ici la drosophile) à un autre (ici le moustique) (adapté de Arora *et al.* 2017 (Arora and Douglas, 2017)).

a. Suppression de la compétence vectorielle des insectes

L'association hétérologue est utilisée pour le contrôle du moustique *A. aegypti* vecteur de la dengue, la fièvre jaune, le chikungunya ou le Zika (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira, Ferreira and Ashburner, 2008; Dutra *et al.*, 2016; Ankrah, Chouaia and Douglas, 2018; Rocha *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2021; Pimentel *et al.*, 2021; Utarini *et al.*, 2021) ou d'*Anopheles stephensi*, vecteur du parasite *Plasmodium falciparum*. Cette technique consiste à infecter les populations de moustiques avec *Wolbachia* issues de *D. melanogaster* (pour *A. aegypti*) ou de *A. albopictus* (pour *A. stephensi*) pour à la fois créer une incompatibilité cytoplasmique entre mâles traités infectés et femelles natives non infectées et réduire la charge virale chez les femelles infectées (Laven, 1967; Bian *et al.*, 2013) par les mécanismes de protection et de manipulation de la reproduction que nous avons détaillés précédemment. Transmise verticalement, *Wolbachia* a pu coloniser les populations de moustiques y réduisant la prévalence des virus (Hoffmann *et al.*, 2011; Iturbe-Ormaetxe, Walker and O'Neill, 2011). Cependant, certains auteurs suggèrent que la fonction anti-pathogène dépend d'une charge élevée en *Wolbachia* dans les tissus somatiques, avec des coûts physiologiques sensibles. Ces coûts physiologiques favoriseraient la sélection des individus qui soutiennent de faibles populations de *Wolbachia* somatiques et donc n'auraient plus de phénotype bloquant les pathogènes (Martinez *et al.*, 2015; Kamtchum-Tatuene *et al.*, 2017).

b. Symbiotes hétérologues utilisés comme insecticides

Certains symbiotes d'une espèce d'insecte peuvent devenir pathogènes chez une autre. Ce phénomène a été démontré chez deux espèces de guêpes, *Nasonia vitripennis* et *Nasonia girauldi* (Breeuwer and Werren, 1995). Bien que le phénomène ne soit pas encore tout à fait compris, la colonisation d'une espèce par les bactéries du genre *Providencia* et de l'espèce *Proteus mirabilis*, dérivées de chacune des deux espèces parentales d'insectes, induit un dysfonctionnement immunologique qui entraîne la mort de l'hôte hybride (Brucker and Bordenstein, 2013, 2014).

c. Manipulation de la niche

Comme expliqué précédemment, les symbioses ont permis aux arthropodes de coloniser de nouvelles niches. En conséquence, le transfert d'un symbiote hétérologue pourrait permettre de rendre un ravageur spécialisé dans une autre niche. Un exemple rare provient d'études sur les punaises *Megacopta punctatissima* et *Megacopta cribraria*. La première peut utiliser le soja comme source d'alimentation grâce au symbiote bactérien *Ishikawaella* tandis que l'autre non (Couret *et al.*, 2019). Le transfert de ce symbiote à *M. cribraria* lui a conféré la capacité d'utiliser le soja, entrant ainsi en compétition avec *M. punctatissima*, tout en diminuant sa fertilité, ne lui conférant donc pas de trait ravageur (Hosokawa *et al.*, 2007; Basili and Merwin, 2019).

3. Perturbation symbiotique

Il est aussi possible de cibler directement les symbioses préétablies lorsque celles-ci présentent une importance pour la physiologie de l'insecte, entraînant une altération du développement, de la fécondité, de la fertilité de l'hôte ou sa mort (Figure 7). Cette approche est particulièrement pertinente pour les insectes qui dépendent de leur symbiote pour compléter leur régime strict comme les hématophages stricts (e.g., punaises de lit, poux, mouche tsétsé), les phytophages stricts (e.g., mouches blanches, pucerons, psylles, cicadelles)

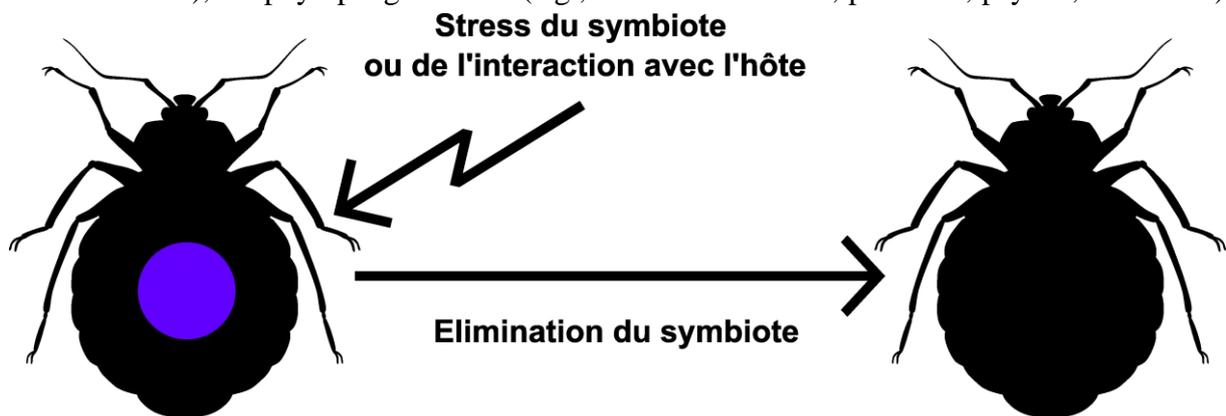


Figure 7. Schéma explicatif de la perturbation symbiotique. Le cercle violet représente un symbiote qui est éliminé dans une population d'insecte (ici la punaise de lit) et se retrouve donc absent de cette population et de sa descendance (adapté de Arora *et al.* 2017 (Arora and Douglas, 2017)).

et les xylophages stricts (e.g., certains coléoptères, termites). Cette approche permet le développement de « symbiocides », des agents de biocontrôle qui perturbent les symbiotes résidents et/ou leurs interactions avec leur hôte. Les insectes hébergeant leurs symbiotes dans des tissus spécialisés comme les bactériocytes, ce qui facilite leur ciblage, sont de bons candidats à cette stratégie de lutte (Douglas, 1989). L'efficacité de cette stratégie dépend grandement de la transmission verticale du symbiote obligatoire. En effet, cette technique reste limitée pour les insectes qui acquièrent des symbiotes par transmission horizontale, étant donné la capacité des hôtes à récupérer leur symbiote par l'environnement.

Le moyen le plus simple auquel on pense pour éliminer un symbiote est l'utilisation d'antibiotiques (Douglas, 1989; Wilkinson, 1998). Des exemples existent déjà, notamment chez les nématodes filaires où *Wolbachia* est un symbiote nutritionnel important pour maintenir la fertilité, la survie et le développement des nématodes (Wu *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2011). Les traitements antibiotiques ciblant *Wolbachia* entraînent la mort de l'hôte et permettent de traiter les maladies filariennes telles que l'onchocercose et la filariose lymphatique (Hoerauf *et al.*, 2000; Chirgwin *et al.*, 2003; Voronin *et al.*, 2012; Ngwewondo, Scandale and Specht, 2021). Cependant, cette technique ne convient pas à une application à grande échelle contre les insectes ravageurs en raison du large spectre des antibiotiques et des préoccupations de coût financier et de santé publique liées à l'apparition de résistance chez les microorganismes environnementaux (Tancos *et al.*, 2016).

Les méthodes de lutte actuelle se concentrent davantage sur des cibles moléculaires spécifiques, liées à l'interaction entre l'hôte et son symbiote qui permettent une forte spécificité (Douglas, 2015). Les cibles physiologiques d'intérêt comprennent l'échange dynamique de nutriments entre l'insecte et son symbiote, ainsi que les contrôles immunologiques de l'insecte sur la dynamique du symbiote (Douglas, 2015). Pour exemple, le peptide antimicrobien Coleopterine A, empêche la cytokinèse de la population de *Sodalis pierantonius* chez le charançon du blé *Sitophilus oryzae* (Login *et al.*, 2011; Zaidman-rémy *et al.*, 2018).

Le transfert des symbiotes vers les ovaires et la transmission verticale par l'œuf peut également fournir des cibles pour la perturbation de ces associations. Encore une fois, le développement de ces applications nécessite des avancées dans la compréhension des interactions moléculaires spécifiques médiant la transmission verticale. Les antagonistes, les toxines et la suppression par CRISPR/ARNi des gènes ou de leur expression qui sous-tendent ces transferts présentent un potentiel pour la perturbation de l'association.

Perspectives des méthodes de lutte utilisant la symbiose

En conclusion, il existe de multiples opportunités d'utilisation de la symbiose pour le contrôle des insectes ravageurs. La diversité de ces stratégies est une force car différentes méthodes peuvent être utilisées pour une même problématique et ainsi représenter des alternatives. Par exemple, lorsque la paratransgénèse nécessite de pouvoir cultiver et manipuler génétiquement les symbiotes, l'association hétérologue constitue une alternative lorsque les symbiotes ne sont pas cultivables, et est utilisée pour le contrôle des populations de moustiques porteurs d'arbovirus. De plus, ces techniques peuvent être appliquées en intelligence avec d'autres méthodes, notamment des stratégies de lutte biologique, des insecticides chimiques, ou des techniques de relargage d'insectes stériles (Bourtzis *et al.*, 2016), pour optimiser le contrôle des cibles génétiquement variables dans des conditions environnementales elles aussi variables (Figure 8).

Cependant, il faut garder à l'esprit que toute stratégie de lutte antiparasitaire sélectionne la résistance, de sorte qu'il ne peut y avoir de solution permanente. Dans le cas des caractères médiés par la symbiose, l'efficacité de la stratégie de contrôle peut être compromise par des changements évolutifs chez l'insecte, son symbiote et leurs interactions (Tabashnik, Van Rensburg and Carrère, 2009; Himler *et al.*, 2011).

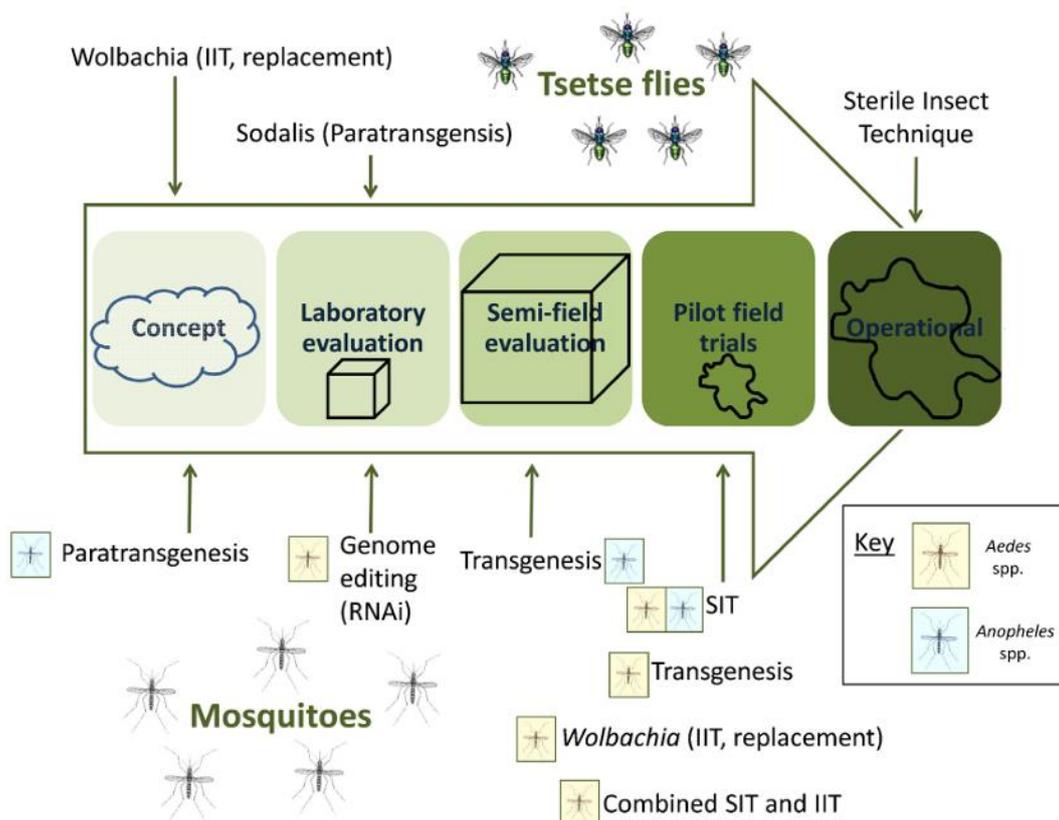


Figure 8. Résumé des stratégies de contrôles contre la mouche tsétsé ou le moustique. IIT : *Incompatible Insect Technique* ; SIT : *Steril Insect Technique*. Figure issue de Bourtzis *et al.* 2016 (Bourtzis *et al.*, 2016).



La punaise de lit et *Wolbachia*

Sommaire

Origine et répartition.....	21
Biologie de la punaise de lit.....	23
1. Écologie, description et cycle de vie.....	23
2. Reproduction et structure des organes reproducteurs.....	24
3. Hématophagie et menace sanitaire.....	26
Endosymbioses chez la punaise de lit.....	28
1. <i>Wolbachia</i> , symbiote nutritionnel obligatoire de la punaise de lit.....	28
2. BEV-like et torix <i>Rickettsia</i> , endosymbiotes secondaires de la punaise de lit ...	30
3. Localisation des endosymbiotes.....	30
Menace sanitaire, économique et sociale.....	32
1. Une infestation qui se répand.....	32
2. Un coût sanitaire et économique important.....	33

Origine et répartition

Les cimicides forment une famille d'insectes spécialisés dans l'hématophagie. Le genre le plus connu est *Cimex spp.* qui infecte toutes les régions habitées du globe (Figure 9A) (Štefka *et al.*, 2022). L'apparition de *Cimex spp.* est estimée à il y a plus de 115 millions d'années, elle parasite les humains, les oiseaux et les chauves-souris (Roth *et al.*, 2019). Au sein de ce genre on retrouve deux espèces bien connues pour parasiter l'humain, la punaise de lit commune, *Cimex lectularius* (Linnaeus 1758) et la punaise de lit tropicale *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) (Figure 9B).

On ne connaît pas exactement à quand remonte le début de l'association entre la punaise de lit et l'homme. Cependant, certains documents évoquent sa présence dans des tombes égyptiennes vieilles de près de quatre millénaires (Panagiotakopulu and Buckland, 1999) (Figure 9C). Aujourd'hui, après une courte période de déclin à la suite de l'utilisation massive de pesticides dans l'après-guerre, les cas d'infestations se multiplient (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007; Štefka *et al.*, 2022; Anses, 2023). En effet, les forts traitements aux pyréthrinoides, dithiothréitol (DTT) et autres pesticides des décennies passées ont sélectionné des punaises résistantes à ces derniers, et la mondialisation qui facilite le fret et flux de passagers multiplie les nouveaux cas d'infestation (Doggett and Lee, 2023). Ainsi, *C. lectularius* a fait son retour dans les régions tempérées, dont de nombreux pays occidentaux (Sakamoto and Rasgon, 2006), et *C. hemipterus* dans les régions tropicales (How and Lee, 2010). Toutes les régions du monde sont touchées, y compris des zones reculées comme l'Alaska, la Sibérie, l'Australie ou l'Amérique du Sud (Zorrilla-Vaca, Silva-Medina and Escandón-Vargas, 2015). Des cas d'infestation de *C. hemipterus* ont été recensés dans des régions autrefois épargnées (Chebbah *et al.*, 2021).

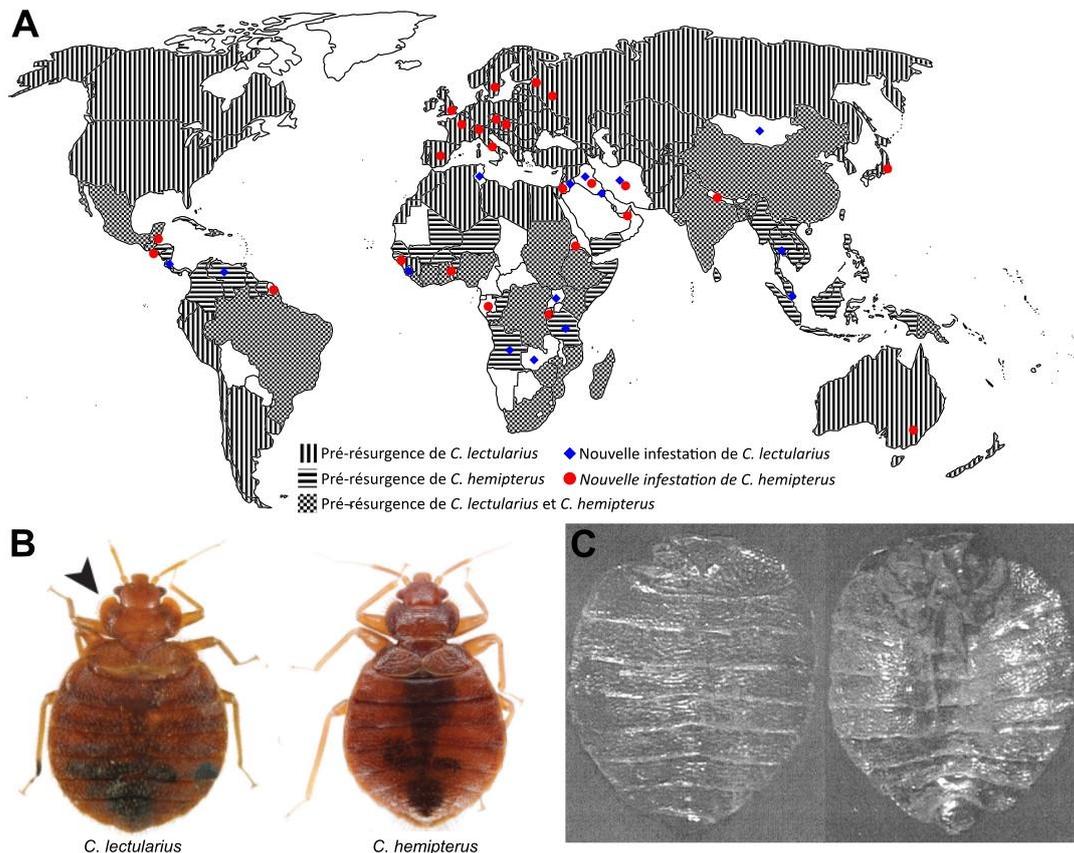


Figure 9. Infectiologie de *C. lectularius* et *C. hemipterus*. **A.** Aire de répartition mondiale de *C. lectularius* et *C. hemipterus* et les nouveaux cas d'infestations (adapté de Štefka *et al.* 2022 (Štefka *et al.*, 2022)). **B.** Photo d'une femelle adulte *C. lectularius* (à gauche) et d'une femelle adulte *C. hemipterus* (à droite) (photos issues de Doggett et Lee, 2023 (Doggett and Lee, 2023)). La flèche montre le prolongement du pronotum chez *C. lectularius*. **C.** Abdomen de *C. lectularius* (face dorsale à gauche et face ventrale à droite) retrouvé à Amama en Egypte dans un village daté d'environ quatre millénaire (Panagiotakopulu and Buckland, 1999).

Biologie de la punaise de lit

I. Écologie, description et cycle de vie

La punaise de lit est un hémimétabole : après éclosion, les nymphes effectuent chaque semaine une prise de repas sanguin nécessaire à leur mue ; à la fin des cinq stades nymphaux, la dernière mue imaginale entraîne quelques changements structuraux dont une cuticule plus sclérosée et la maturation des organes reproducteurs (**Figure 10**). Sous des conditions de température physiologique entre 23 et 25°C, une humidité relative entre 50 et 75% et des repas sanguins non limitants, la complétion d'un cycle de vie peut durer entre 46 et 62 jours (**Jones, 1930; Johnson, 1941; Reinhardt and Siva-Jothy, 2007**), comprenant une période d'incubation d'environ 8 jours et une phase nymphale entre 24 et 29 jours (**Johnson, 1941**). Des températures basses peuvent cependant ralentir les cycles de vie (e.g., 235 jours à 15°C) et des températures chaudes l'accélérer (e.g., 34 jours à 28°C). Une prise de repas sanguin est nécessaire à la fécondité et la fertilité de la femelle, une fréquence hebdomadaire de ces repas favorise la fécondité et la fertilité chez les deux sexes (**Johnson, 1941**). Après le premier accouplement, 3 à 5 jours de maturation sexuelle des femelles suffisent pour poser le premier œuf (**Mellanby, 1939; Johnson, 1941**). La femelle peut déposer jusqu'à 12 œufs par semaine et jusqu'à un total de plusieurs centaines d'œufs sur sa vie si elle est fécondée régulièrement (**Janisch, 1932; Mellanby, 1939**). Les adultes vivent en moyenne pendant 3 à 6 mois.

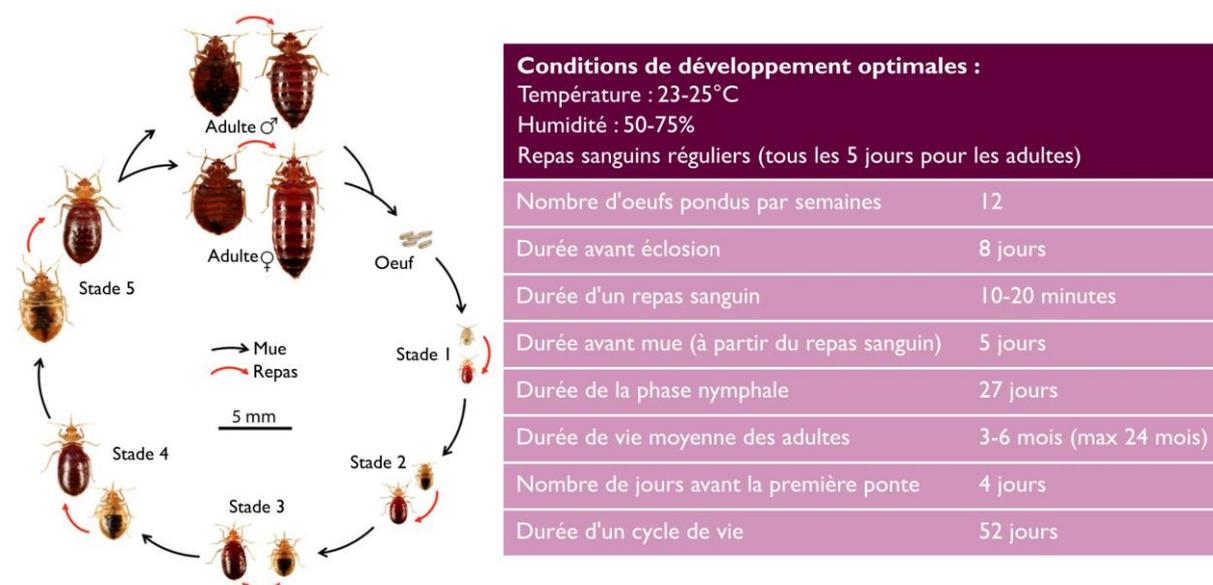


Figure 10. Le cycle de vie des punaises de lit. Les valeurs indiquées dans le tableaux sont des moyennes (**Johnson, 1941**).

Le pic d'activité de la punaise de lit se situe entre 3 et 6 heures du matin (Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Romero, Potter and Haynes, 2010). Une punaise de lit adulte se gorge complètement en 10 à 20 minutes, une fois par semaine. Le temps entre les repas est passé à l'intérieur d'un refuge qui consiste la plupart du temps en un environnement exigu où sont regroupées des punaises avec différents statuts de gorgement (n.b. : le gorgement signifie une prise de repas sanguin, la prise de repas est facilement constatable chez la punaise de lit car son abdomen augmente visiblement de volume), d'accouplement ou de stade (dont un tiers d'adulte avec une répartition équitable des sexes) (Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Wendt, 1941; Stutt and Siva-Jothy, 2001). Les prédateurs de la punaise de lit sont les araignées, les pseudoscorpions, les solifuges, les acariens, les larves de pyralidés, les punaises assassines, les fourmis et les rongeurs (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007). Les populations de punaises de lit font aussi face à des infections par des champignons entomopathogènes comme *Aspergillus flavus*, *Bauveria bassiana* et des bactéries comme *Serratia spp.* (Strand, 1978; Pietri and Liang, 2018).

2. Reproduction et structure des organes reproducteurs

Une des adaptations majeures au cœur de la biologie des cimicides est l'insémination traumatique (Siva-Jothy, 2006). En effet, chez la punaise de lit, l'accouplement ne se fait pas par les voies génitales. Le mâle, qui a détecté la femelle par des signaux chimiques (Harraca, Ryne and Ignell, 2010; Haynes, Goodman and Potter, 2010), monte sur son dos, perce la paroi ventrale de l'abdomen entre le 5^e et le 6^e tergite et injecte ses spermatozoïdes dans le mésospermalège (aussi appelé organe de Berlese) (Davis, 1956; Stutt and Siva-Jothy, 2001) (Figure 11A). Cet organe est un composant paragénital de la femelle (Figure 11B) depuis lequel les spermatozoïdes migrent à travers l'hémolymphe jusqu'aux ovaires (Davis, 1964; Rao, 1971) (Figure 11C) se déplaçant le long d'un gradient d'oxygène (Rao, 1971). Les spermatozoïdes entrent dans les conceptacles séminaux, où ils se réagrègent. La prise de repas chez la femelle entraîne le déplacement des spermatozoïdes vers les ovaires via les canaux remplis d'hémolymphe à l'intérieur des parois de l'oviducte (les spermodes) (Figure 12) (Davis, 1956; Rao, 1971). Les spermatozoïdes arrivent finalement dans le pédicelle puis le vitellarium, où ils fécondent les ovocytes matures (Davis, 1964). De manière intéressante, le spermalège joue un rôle de conservation des spermatozoïdes, ce qui permet à la femelle de rester fertile jusqu'à entre 35 et 50 jours après le dernier accouplement si elle est nourrie régulièrement (Mellanby, 1939; Davis, 1956).

Chez la punaise de lit comme la plupart des cimicides, le processus de maturation des ovocytes est de type télotrophe, ce qui signifie que l'ovocyte dans le germarium et l'œuf dans le vitellarium sont alimentés directement par le cordon nutritif provenant du tropharium. Historiquement désigné comme la "chambre terminale" (Davis, 1956), le tropharium est la structure apicale de l'ovariole, composée de trophocytes, avec des prolongements cytoplasmiques qui fusionnent en un cordon nutritif syncytial (Figure 11D). Sous le tropharium,

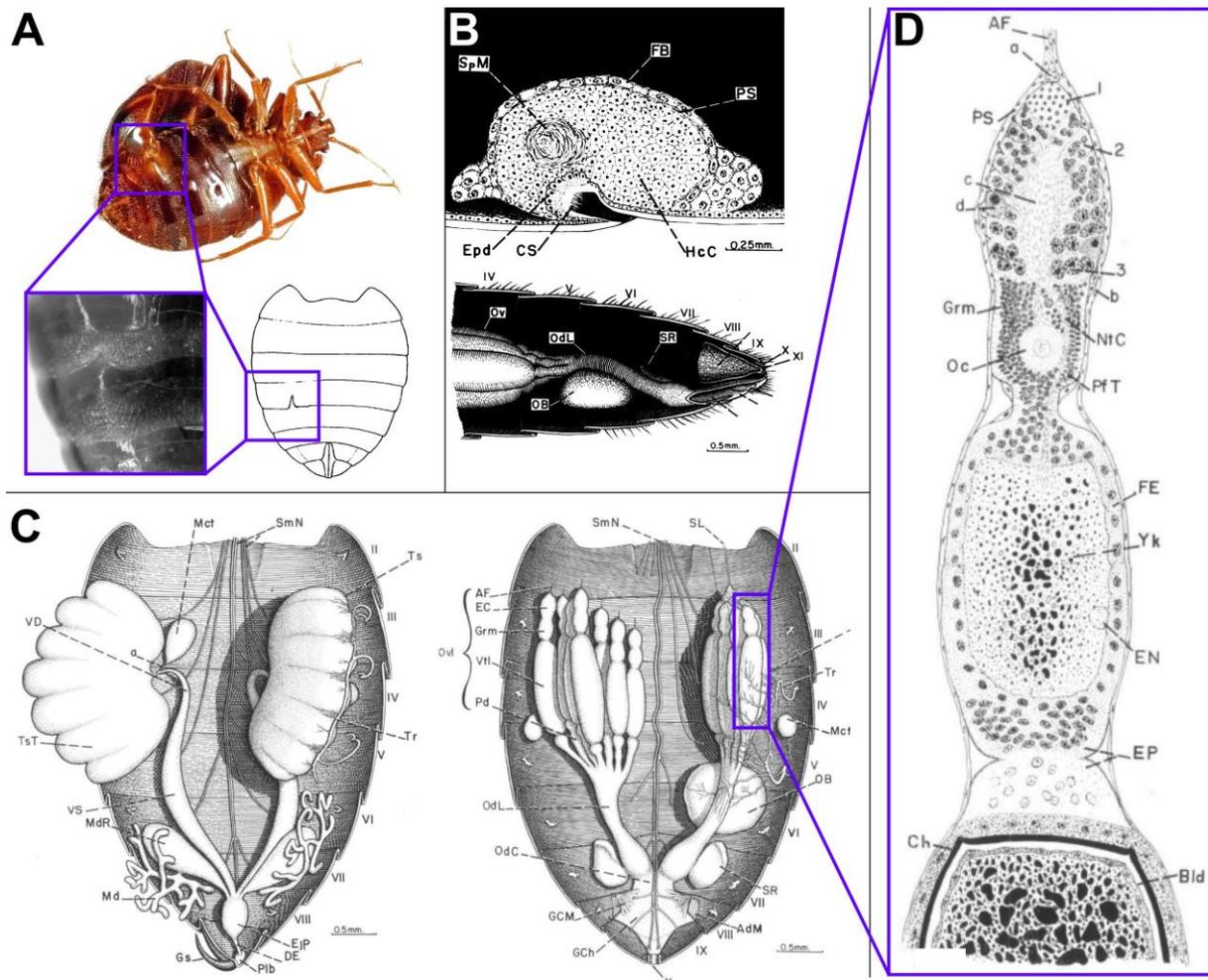


Figure 11. Organes reproducteurs des punaises de lits. **A.** Photo d'un accouplement, le mâle transperce l'abdomen de la femelle au niveau de l'ectospermalège (encadré). Adapté de Siva-Jothy, 2006 (Siva-Jothy, 2006). **B.** En haut : dessin du spermalège ou organe de Berlese (OB) ; en bas, la proximité entre le spermalège et l'oviducte latéral (OdL) facilite le passage des spermatozoïdes (SpM) depuis les voies paragénitales aux voies génitales. Pour la description complète voir (Davis, 1956). **C.** Dessin du système reproducteur de la punaise de lit mâle (à gauche) et femelle (à droite). Le testicule (TsT) mâle est composé de 7 lobes fusionnés entre eux. Accolé à sa partie concave se trouve le bactériome (autrefois appelé mycétome (Mct)) qui est faiblement rattaché au testicule au niveau du canal déférent (VD). L'ovaire (Ovl) femelle est composé de 7 ovarioles. Ces ovarioles sont composés d'un filament terminal (AF) qui relie les tropharium (autrefois appelés chambres terminales (EC)) entre eux, d'un germarium (Grm), d'un vitellarium (Vtl) et d'un pédicelle (Pd) qui se rejoignent au niveau de l'oviducte latéral (Odl). **D.** Dessin d'un ovariole. Les trophocytes (d) forment un coros syncitial (c) au centre du tropharium. Le cordon nutritif (NtC) ainsi formé permet de nourrir l'ovule (Oc) et l'œuf en formation (EN) dans le vitellarium. Le vitellarium est composé d'un épithélium folliculaire (FE) qui entoure l'œuf. L'œuf mature passe par le verrou épithélial (EP) au niveau du pédicelle pour passer dans l'oviducte latéral avant d'être pondu.

le germarium contient des cellules souches de la lignée germinale (GSCs) et des cystoblastes (Davis, 1956). L'œuf mûrit dans le vitellarium et est fécondé lorsque les spermatozoïdes mâles traversent le pédicelle via les voies cellulaires décrites plus haut. Des travaux antérieurs ont montré que la production d'œufs chez la femelle fécondée nécessite un repas sanguin et que le développement ovarien dépend de la présence de spermatozoïdes dans la femelle (Mellanby, 1939). Lors de la maturation, le pédicelle se relâche, permettant à l'œuf de traverser l'oviducte mésodermique et latéral avant la ponte (Davis, 1964).

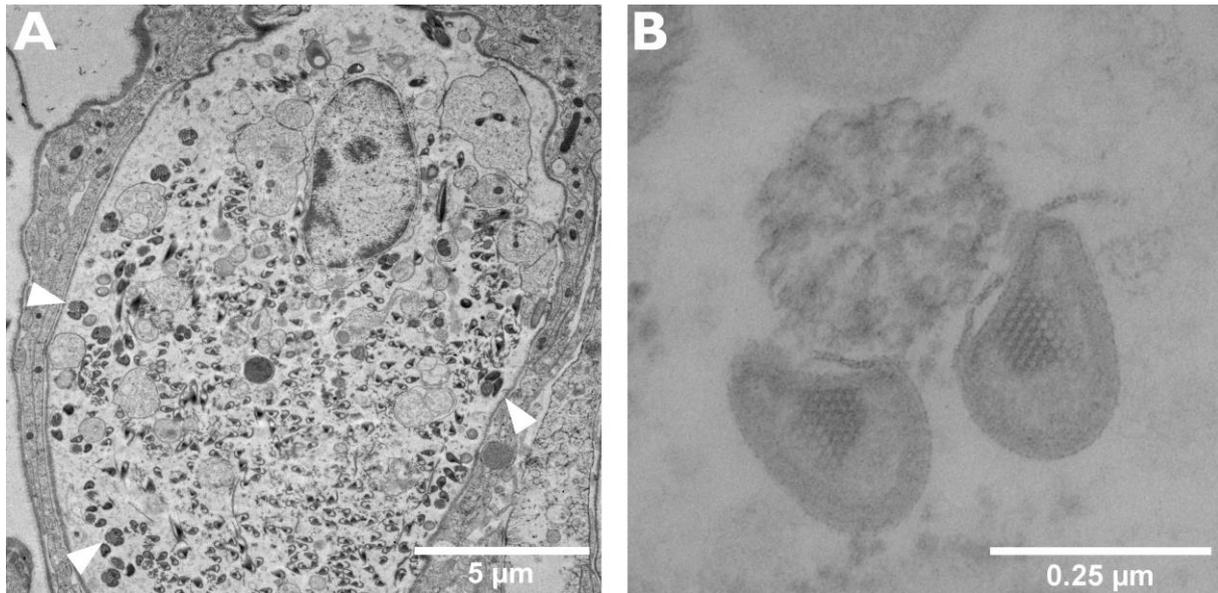


Figure 12. Spermode de femelle fécondée observé par électro-microscopie (TEM). **A.** Visualisation des spermodes (les flèches blanches indiquent quelques exemples de spermatozoïdes). **B.** Visualisation d'un flagelle de spermatozoïde.

3. Hématophagie et menace sanitaire

La punaise de lit, comme tous les cimicides, est un hémaphage stricte (Lehane, 2005). Toutes les étapes du développement nymphal, ainsi que de l'accouplement requièrent la prise de repas sanguins correspondant à entre environ 1 à 2 fois le poids de la punaise (Marshall, 1981). Les nymphes de *C. lectularius* meurent quelques jours après avoir émergé de l'œuf si elles ne se nourrissent pas, et la production d'œufs cesse en quelques jours si les femelles adultes sont empêchées de se nourrir (Mellanby, 1939; Saveer *et al.*, 2021). Dans des conditions optimales de température, d'humidité et de disponibilité de l'hôte, la fréquence d'alimentation est d'environ 7 jours.

Comparée à d'autres insectes hémaphages (Lehane, 2005; Reinhardt and Siva-Jothy, 2007), la punaise de lit a un choix d'hôtes restreint. En effet, *C. lectularius* et *C. hemipterus* sont étroitement associées aux humains mais survivent bien sur les hôtes aviaires, chauve-souris et lapins en laboratoire (Johnson, 1941; De Meillon and Golberg, 1947). Les hôtes des cimicidés partagent plusieurs caractéristiques écologiques. Tous les hôtes se trouvent dans des

assemblages grégaires clos comme les grottes ou les bâtiments ce qui les temporellement et spatialement prévisibles pour la prise de repas de la punaise Tous les hôtes ont une température corporelle relativement élevée. La localisation d'hôte se déroule en trois phases : (a) la recherche appétitive, (b) l'orientation vers l'hôte (c'est-à-dire l'activation par les stimuli de l'hôte) et (c) le contact avec l'hôte (Lehane, 2005). La recherche appétitive se fait par une détection des signaux de chaleur, de kairomones de l'hôte et de CO₂ (Aak *et al.*, 2014; Liu, Chen and Liu, 2017). Des capteurs de température sont présents sur les antennes (Rivnay, 1932). Une fois qu'une punaise de lit est gorgée de sang, elle quitte l'environnement proche de l'hôte (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007).

Chez les hématophages, les cas de transmission de maladies causées par des arbovirus (i.e. *Arthropod Born Viruses*) sont fréquents (Wang, Gao and Aksoy, 2023). De manière non exhaustive, la mouche tsé-tsé est impliquée dans la transmission de la maladie du sommeil (Krafsur, 2009; Attardo, Scolari and Malacrida, 2020); le moustique tigre propage les virus de la Dengue, du Chikungunya ou du Zika (Kraemer *et al.*, 2019) ; la tique est porteuse de l'agent responsable de la maladie de Lyme (Gray, 1998) ; le pou fût un vecteur redouté du typhus et de la fièvre des tranchées (Anstead, 2016) ; et le réduve, insecte hématophage d'Amérique latine, permet le développement de la maladie de Chagas en déposant dans ses excréments le pathogène *Trypanosoma cruzi* (Díaz *et al.*, 2016). Chez la punaise de lit, la diversité d'hôtes, le brassage des personnes sur site infesté et la faculté à se disséminer via l'humain en font un potentiel vecteur de maladies (Burton, 1963; Lai *et al.*, 2016). Bien qu'aucun cas de transmission à l'humain n'ait été montré jusqu'à ce jour, des particules virales de l'hépatite B (Silverman *et al.*, 2001) et des pathogènes responsables de la fièvre récurrente (El Hamzaoui *et al.*, 2019) et de la fièvre des tranchées (Leulmi *et al.*, 2015) ont été observé chez *C. lectularius* plusieurs jours après la prise de repas sur des humains infectés. Enfin, *C. lectularius* est suspectée d'être un vecteur de bactéries résistantes (Lowe and Romney, 2011), mais aucun cas de transmission de pathogène par la punaise de lit n'a pour l'instant été observé chez l'humain. Cependant, des cas de transmissions de certains pathogènes par des punaises ont été observés chez certains animaux (Burton, 1963; Salazar *et al.*, 2015). La punaise de l'hirondelle des falaises, *Oeciacus vicarius*, peut transmettre le virus Buggy Creek et le virus de Fort Morgan (Brault *et al.*, 2009). Les punaises *Stricticimex parvus*, *Cimex adjunctus* et *Cimex brevis* transmettent des virus ou des parasites entre chauves-souris (Williams *et al.*, 1976; Reinhardt and Siva-Jothy, 2007). Pour expliquer l'absence d'observation de cas de transmission, les hypothèses les plus répandues sont que certains symbiotes présents dans son abdomen ont un effet protecteur contre les agents pathogènes. Les punaises de lit ont aussi développé un système immunitaire très efficace pour survivre à leur mode de reproduction traumatisant qui entraîne des infections entre punaises.

Endosymbioses chez la punaise de lit

I. *Wolbachia*, symbiote nutritionnel obligatoire de la punaise de lit

La symbiose a permis à de nombreux arthropodes de coloniser de nouvelles niches en adoptant de nouveau mode de nutrition comme l'hématophagie. En tant qu'hématophages, les punaises de lits ont besoin de compléter leur régime sanguin déséquilibré. La présence d'un symbiote a été observée chez la punaise de lit comme étant une souche de *Wolbachia* (*wCle*) (Hertig and Wolbach, 1924; Sakamoto and Rasgon, 2006). Il a été montré que *wCle* est un symbiote nutritionnel obligatoire de la punaise de lit, transmis verticalement de la mère à l'œuf, et fournissant des vitamines B à son hôte *C. lectularius* (Hosokawa *et al.*, 2010). Il a été classé dans le supergroupe F des *Wolbachia*, composé principalement de mutualistes (Baldo *et al.*, 2006). En effet, l'élimination de *wCle* chez *C. lectularius* par un traitement à la rifampicine entraîne une diminution de l'éclosion des œufs, de l'émergence et de la taille des adultes, ainsi qu'un ralentissement du développement (Chang, 1974; Hosokawa *et al.*, 2010; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022) qui sont corrigés par la supplémentation en vitamines B (biotine et riboflavine) (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Moriyama *et al.*, 2015). Corroborant la fonction essentielle de *wCle* pour son hôte, l'endosymbiote est retrouvé chez toutes les souches de punaises à travers le monde, en Australie (Baldo *et al.*, 2006), au Canada (Floate, Kyei-poku and Coghlin, 2006), aux États-Unis (Sakamoto and Rasgon, 2006), en Zambie (Sakamoto and Rasgon, 2006), au Japon (Hosokawa *et al.*, 2010) et en France (Akhoundi *et al.*, 2016).

Plus précisément, après avoir séquencé les génomes de *wCle* (Nikoh *et al.*, 2014) (Figure 13A) et de *C. lectularius* (Sadílek *et al.*, 2013; Benoit *et al.*, 2016; Rosenfeld *et al.*, 2016), il a été montré que *wCle* codait pour des gènes de biosynthèse de la biotine (vitamine B7) (Figure 13B) et la riboflavine (vitamine B2) (Figure 13C) (Nikoh *et al.*, 2014; Moriyama *et al.*, 2015). Ces gènes auraient été acquis par transfert horizontal provenant d'une bactérie du genre *Cardinium* ou *Rickettsia* (Nikoh *et al.*, 2014). Hormis l'opéron codant pour la voies métaboliques complètes de la biotine, le génome de *wCle* (1.250 kbp) (Figure 13A) est relativement similaire à ceux des autres souches observées chez d'autres *Wolbachia* infectant les arthropodes (Bandi, Slatko and O'Neill, 1999; McCutcheon and Moran, 2012) ou même les nématodes (Foster *et al.*, 2005), chez qui on a retrouvé les gènes codant pour la voie de biosynthèse de la riboflavine (Nikoh *et al.*, 2014). L'acquisition de *Wolbachia* par les punaises daterait de plus d'une centaine de million d'années, période au cours de laquelle de nombreuses associations symbiotiques ont permis la spécialisation à des régimes hématophages, phytophages ou xylophages (Moran, McCutcheon and Nakabachi, 2008; Feldhaar, 2011; Cornwallis *et al.*, 2023).

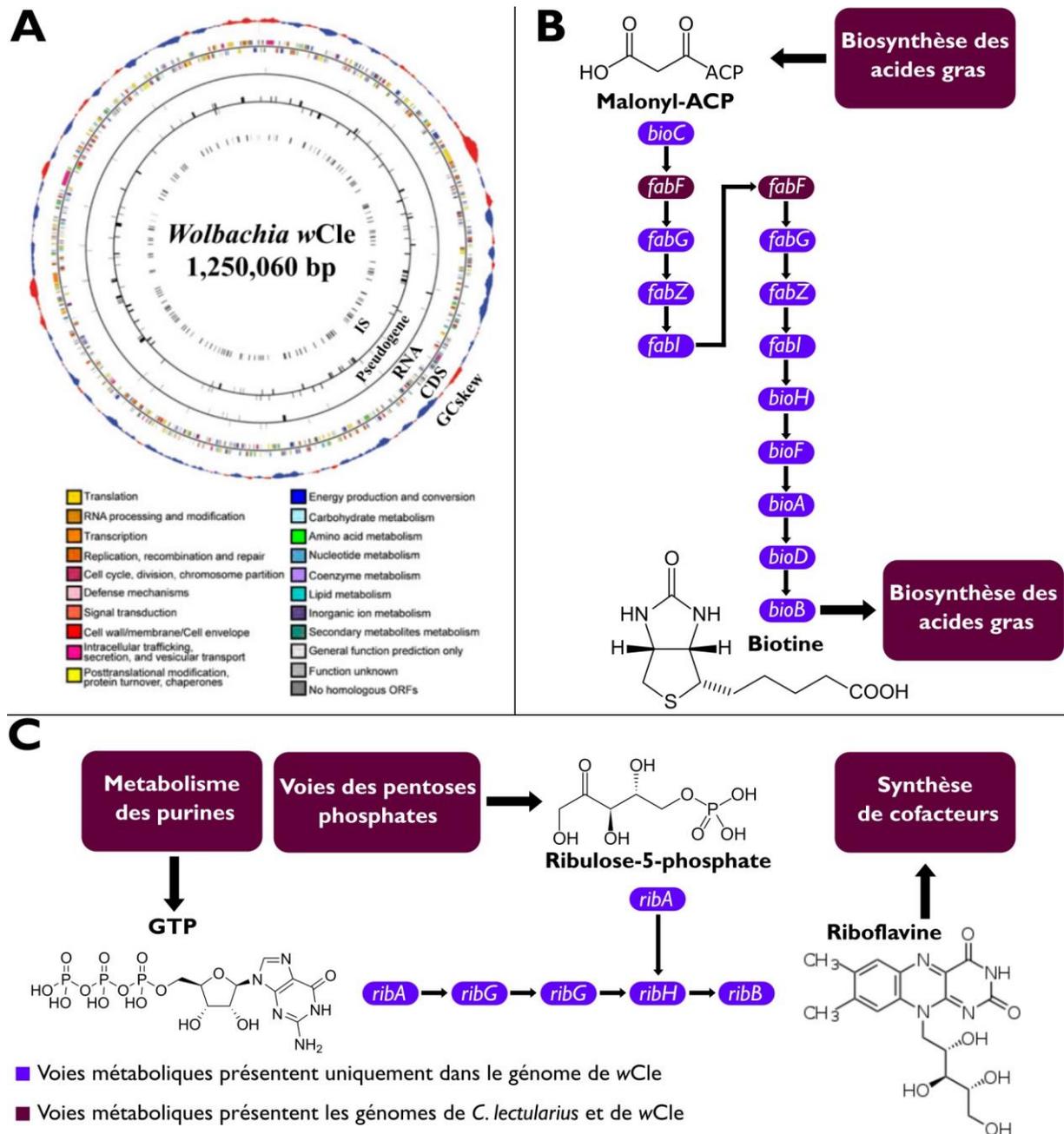


Figure 13. Complémentation métabolique de *wCle*. **A.** Représentation circulaire du génome de *wCle*. Sur le cercle du « GCskew » les zones riches et pauvres en GC sont représentées en rouge et bleues respectivement. Sur le cercle « CDS » les couleurs représentent les catégories de gènes indiquées en légendes. Le cercle « RNA » représente les régions codant pour des ARN non codants. **B.** Voies de biosynthèse de la biotine et **C.** de la riboflavine. Les gènes absents de *C. lectularius* mais présents chez *wCle* sont surlignés en bleu, les gènes présents dans les deux partenaires sont surlignés en violet.

2. BEV-like et torix *Rickettsia*, endosymbiotes secondaires de la punaise de lit

Wolbachia n'est pas le seul endosymbiote de la punaise de lit. Au total, trois souches de punaise avec des profils symbiotiques différents ont été étudiées, tous incluant *wCle*, mais aussi parfois des endosymbiotes secondaires (Sakamoto and Rasgon, 2006). Ces symbiotes sont eux aussi transmis verticalement et aucun cas de transmission horizontale n'a jusqu'à présent été confirmé (Reinhardt, Naylor and Siva-Jothy, 2005). L'un de ces endosymbiotes est une Gamma-protéobactérie, similaire à celles observées chez la cicadelle *Euscelidius variegatus*, et qui porte ainsi le nom de BEV-like (pour Bactérie de *E. variegatus*) (Hypša and Aksoy, 1997; Degan et al., 2011) et récemment assigné au sein du genre *Symbiopectobacterium* (Nadal-Jimenez et al., 2022). La fonction de BEV-like n'est pas connue, son absence dans certaines souches n'a pas montré de phénotypes observable (Hosokawa et al., 2010). L'autre endosymbiote est une torix *Rickettsia*, une alphaprotéobactérie similaire à *wCle* qui est connue pour infecter de nombreux arthropodes (Pilgrim et al., 2017, 2021). La découverte de ce symbiote chez la punaise de lit est récente (Thongprem et al., 2020; Davison et al., 2022). Ainsi, tandis que *wCle* a été observée dans toutes les souches de punaise de lit, la prévalence de BEV-like n'a pas été estimée précisément mais cette bactérie est retrouvée dans toutes les lignées de laboratoire, hormis la lignée JESC (Hosokawa et al., 2010) et dans la majorité des sites échantillonnés par Meriweather et al. (Meriweather et al., 2013). La prévalence de torix *Rickettsia* est estimée à moins de 13% (Potts et al., 2020). Ainsi toutes les souches ne possèdent pas le même microbiote (Figure 14).

3. Localisation des endosymbiotes

Comme expliqué au début de cette thèse, une restructuration des tissus peut accompagner l'association symbiotique. Ceci est d'autant plus vrai pour les endosymbioses obligatoires chez les insectes où la plupart du temps, des organes, appelés bactériomes, hébergent les symbiotes (Wilson and Duncan, 2015). Chez la punaise de lit, les bactériomes sont situés de part et d'autre de la région dorsale de l'abdomen, entre le 4^e et le 5^e tergite (Figure 11C) et ont été observés chez le mâle et la femelle adulte, ainsi que chez le premier stade de la nymphe (Figure 14) (Buchner, 1965). Chez le mâle adulte, chaque bactériome est légèrement rattaché au testicule, alors qu'ils sont séparés des ovaires chez la femelle (Mellanby, 1939; Davis, 1956; Buchner, 1965; Chang and Musgrave, 1973). La fonction de cette connexion reste inconnue à ce jour. Comme dans beaucoup de bactériomes, les cellules sont larges et les noyaux peuvent être plurilobés (Buchner, 1965; Chang and Musgrave, 1973). Globalement, les symbiotes primaires et secondaires sont organisés dans les bactériomes et forment un mélange relativement homogène à l'intérieur avec une domination de *wCle*, qui occupe tout le volume des bactériocytes (*i.e.*, cellules qui composent le bactériome), quand BEV-like et torix *Rickettsia* sont beaucoup moins présentes.

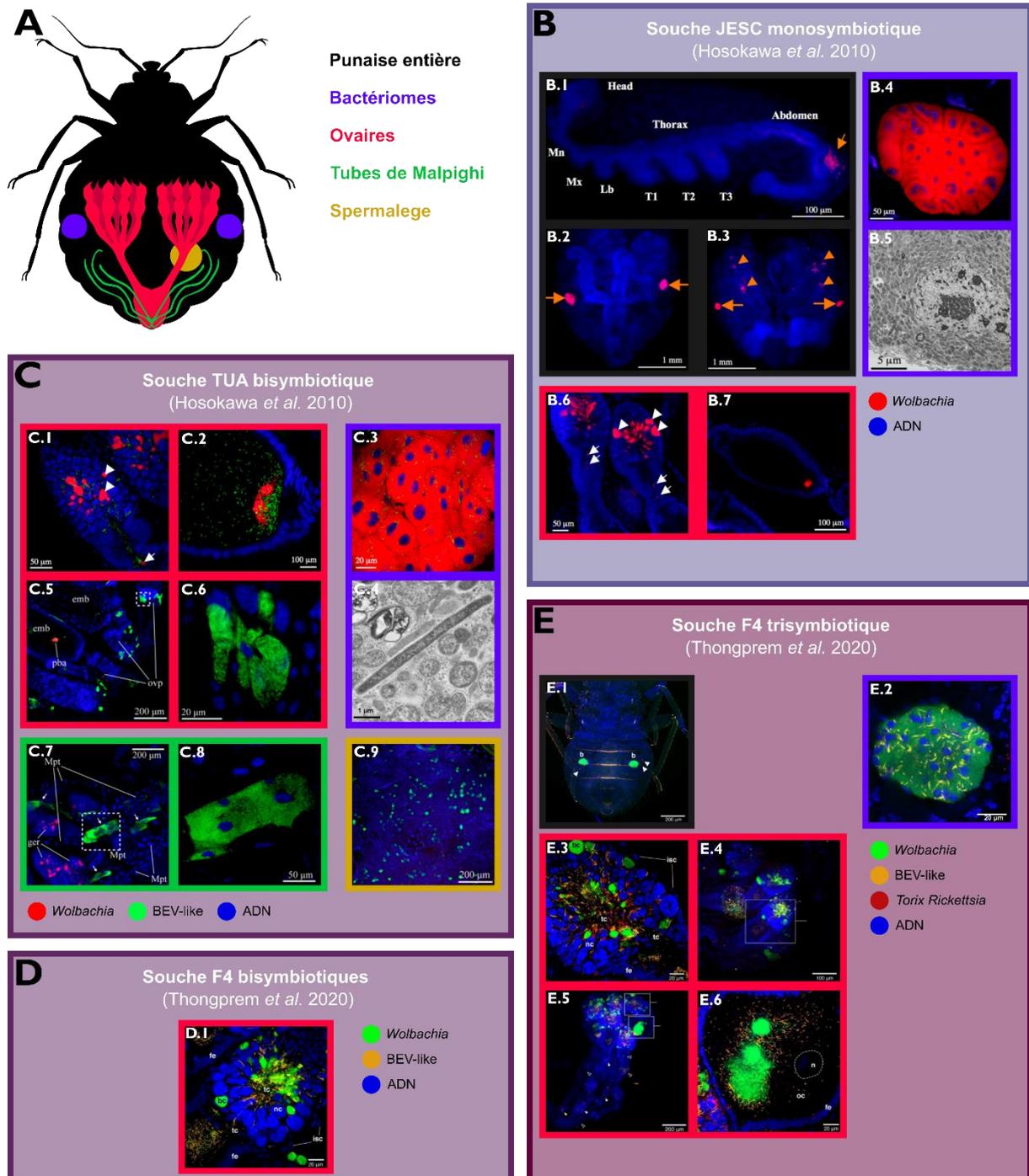


Figure 14. Localisation des symbiotes primaires et secondaires de la punaise de lit. **A.** Schéma de la punaise de lit en entier (noir) avec les organes où ont été observés la présence d'endosymbiotes : bactériome (mauve), ovaire (fushia), tubes de Malpighi (vert), spermalege (jaune). Les couleurs indiquées correspondent aux encadrées des images des figures suivantes pour aider à leur localisation sur le schéma. **B.** Image de microscopie de la souche JESC monosymbiotique. *w*Cle (rouge) est observée dans la région postérieure de l'abdomen de l'embryon (B.1), dans les bactériome du mâles (B.2) et de la femelles (B.3) (flèches oranges) ainsi que dans les ovaires (B.3) (triangles oranges). Le bactériome (B.4) contient une forte densité de *w*Cle (B.5). *WCle* est observé dans les trophocytes (B.6) (triangles blancs) et le

cordon nutritif (B.6) (flèches blanches), ainsi que dans la région postérieure de l'ovocyte (B.7). **C.** Image de microscopie de la souche TUA bisymbiotique, *wCle* (rouge) et *BEV-like* (vert) sont observés dans les trophocytes (C.1) (triangles blancs), le cordon nutritif (C.1) (flèches blanches), la région postérieure de l'ovocyte (C.2) et le bactériome (C.3, C.4). *BEV-like* est aussi observée dans les pédicelles (C.5, C.6), dans les tubes de Malpighi (C.7, C.8) et dans le spermalège (C.9). **D.** Image de microscopie de la souche F4 bisymbiotique, *wCle* (vert) et *BEV-like* (orange) sont observés dans les trophocytes et le vitellarium (D.1). **E.** Image de microscopie de la souche F4 trisymbiotique, *wCle* (vert) est observé dans les bactériomes d'un 1^{er} stade nymphal (E.1, E.2), *BEV-like* (orange) et torix *Rickettsia* (rouge) y sont également observées mais aussi dans les tissus connexes (triangles blancs). Les trois endosymbiotes sont observés dans le tropharium (E.3, E.4) et le vitellarium (E.5, E.6). torix *Rickettsia* est observé dans l'épithélium folliculaire et l'oviducte mésodermique (E.5) (triangles blancs) et *BEV-like* dans le pédicelle (E.5) (triangles noirs). Les images sont issues de travaux précédents (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020).

Historiquement considéré comme l'organe de la symbiose, le bactériome a beaucoup été étudié (Buchner, 1965; Chang and Musgrave, 1973; Chang, 1974). Cependant *wCle*, *BEV-like* et torix *Rickettsia* sont aussi présents dans les ovaires (Figure 14). La quantité relative de *wCle* est environ 100 fois plus forte dans le bactériome que dans les ovaires (Hosokawa *et al.*, 2010). La présence des endosymbiotes dans les ovaires est importante pour leur transmission verticale ou bien potentiellement pour la production de vitamines B nécessaire au début de la maturation des œufs (Usinger, 1966; Sakamoto, Joyce M. and Ragson, 2006), le reste du développement embryonnaire se déroulant après la ponte. Jusqu'à présent, seuls les ovaires d'adultes ont été décrits, montrant des endosymbiotes *wCle*, *BEV-like* et torix *Rickettsia* dans le tropharium, le cordon nutritif, le germarium et le vitellarium (Figure 14)(Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). Récemment, torix *Rickettsia* a été observée dans l'épithélium folliculaire et l'oviducte mésodermique, tandis que *BEV-like* a été observée dans le pédicelle mais aussi dans d'autres tissus de l'abdomen dont principalement les tubes de Malpighi et plus faiblement dans le spermalège (Figure 14) (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020).

Menace sanitaire, économique et sociale

I. Une infestation qui se répand

Après une réduction marquée des taux d'infestation entre les années 1930 et 1980 (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007), les taux d'infestation de *C. lectularius* et de *C. hemipterus* ont beaucoup augmenté dans le monde entier (Doggett *et al.*, 2012). D'après un récent rapport de l'Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), en France, 11 % des foyers ont été infestés par des punaises de lit entre 2017 et 2022 (Anses, 2023). À Londres, entre 1996 et 2001, les cas d'infestation ont quadruplé (Reinhardt and Siva-

Jothy, 2007). L’Australie a vu les cas d’infestation être multiplié entre 5 et 45 fois annuellement (Bai *et al.*, 2011; Doggett *et al.*, 2011; Benoit *et al.*, 2016). Le Japon, la Suède, la Suisse et les Etats-Unis ont aussi vu le nombre d’infestation grimper en une décennie (Štefka *et al.*, 2022).

Comme évoqué précédemment, il existe plusieurs causes : la résistance aux insecticides, la mondialisation, le marché de seconde main, et l’urbanisation. Ainsi, les personnes pratiquant des activités à fortes mobilités (Anderson and Leffler, 2008; Davies, Field and Williamson, 2012; Hentley *et al.*, 2017), partagent trois caractéristiques qui les prédisposent à transmettre les punaises de lits : 1) une forte mobilité et 2) une occupation brève des logements 3) qui sont souvent à regroupés. Les grandes villes dans lesquelles transitent beaucoup de passagers sont fortement touchées et regroupent couramment des infestations mixtes de *C. lectularius* et *C. hemipterus* (Bérenger and Pluot-Sigwalt, 2017; Chebbah *et al.*, 2021, 2023). Ceci s’explique aussi par l’urbanisation, où la proximité entre les logements favorise les transits des punaises (Hwang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2016; Hasnaoui *et al.*, 2023). Dans le même temps, les punaises exprimant une résistance pour des insecticides sont majoritairement observées dans les pays industrialisés ayant un large usage des insecticides (États-Unis, Europe, Australie, Japon, Argentine) (Anderson and Leffler, 2008; Davies, Field and Williamson, 2012; Moshaverinia *et al.*, 2022), bien que certains de ces insecticides y soient maintenant interdits, par exemple le DTT interdit depuis 1971 en France. Les résistances chez la punaise ne sont pas encore tout à fait identifiées, cependant certains travaux ont montré des potentiels signes de résistance, dont des mutations KDR (*i.e. knock down resistance*) sur les canaux sodium voltage-dépendants ou encore un super locus qui serait impliqué dans cette résistance (Zhu *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2017; Haberkorn *et al.*, 2023).

2. Un coût sanitaire et économique important

La menace la plus évidente de la punaise de lit est la prise de repas qui peut entraîner dans 20% des cas la stimulation d’une réponse immunitaire entraînant un prurit. La répétition de ces événements trouble le sommeil jusqu’à provoquer des insomnies, des syndromes paranoïaques et un isolement social. À cela, s’ajoutent des effets psychologiques qui restent cependant mal étudiés (Doggett *et al.*, 2012; Goddard and De Shazo, 2012; Sheppard *et al.*, 2022). Au-delà de la perturbation du sommeil et des nombreux stress qui peuvent se développer, la plupart des victimes d’infestation craignent d’être stigmatisées, ce qui peut les empêcher d’en parler et de mettre en place des actions rapides pour éviter leur dispersion (Anses, 2023). Il est important de préciser que contrairement à une idée reçue, les facteurs sociaux comme le nombre de personnes dans une maison ou le niveau d’hygiène ne sont pas de bons indicateurs de la présence de punaises de lit.

Enfin, la lutte contre la punaise représente un coût économique important. Prenons l’exemple de la France pour lequel un récent rapport de l’Anses estime l’impact économique de la lutte (Anses, 2023). Pour les foyers infestés, le coût de la lutte s’élève en moyenne à 866

€. Pour les propriétaires, le coût moyen de la lutte s'élève à environ 1000 € par intervention. A ce coût s'ajoute un coût sur la santé : en 2019, 79 millions € ont été associés à une baisse de la qualité de vie des ménages, aux troubles du sommeil et aux impacts sur la santé mentale, 3 millions € environ pour les soins physiques et 1 million € pour les arrêts de travail. Ainsi, le coût de cette lutte à l'échelle nationale pour les seuls ménages français atteint 1,4 milliard d'euros pour la période 2017-2022, soit 230 millions d'euros par an en moyenne (Anses, 2023). Aux coûts des ménages viennent s'ajouter ceux de l'industrie du cinéma, des transports, de l'hôtellerie et des foyers communaux (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007), qui sont aussi fortement touchées. Les coûts découlent du paiement pour la lutte antiparasitaire, de l'immobilisation des structures, des dommages à la réputation sociale, du remplacement du mobilier infesté (Hwang *et al.*, 2005) et des demandes de réparations monétaires (Anses, 2023). Toujours en regardant les données de l'Anses, les organismes interrogés ayant répondu avoir engagé des dépenses pour lutter contre les punaises de lit ont dépensé au total 3,8 millions d'euros en 2020 et 5,7 millions d'euros en 2021.

La punaise de lit peut également infester les volailles (González-Morales *et al.*, 2022), les piqûres engendrent aussi des démangeaisons qui peuvent entraîner des changements physiologiques et une altération du succès reproducteur. Ainsi, les impacts économiques de la punaise de lit sur les fermes avicoles est important, car en plus de perturber les travailleurs, les piqûres entraînent une diminution des taux de croissance, une réduction de la production d'œufs, une augmentation de la consommation d'aliments et la présence de taches fécales sur les œufs (R. C. Axtellarends, 1990). La dispersion entre les installations se fait principalement par le transfert d'équipements avicoles infestés mais aussi par la migration d'animaux infestés comme les chauves-souris et les oiseaux (Steelman, 2000).

IV | Objectifs de la thèse

Sommaire

Utilisation de la symbiose dans la lutte contre la punaise de lit	35
Présentation des objectifs de la thèse	37
1. Objectif 1 : Étude des effets de la symbiose sur la biologie de <i>C. lectularius</i> ...	37
2. Objectif 2 : Description de la dynamique quantitative de l'association.....	38
3. Objectif 3 : Description de la localisation de <i>wCle</i> au cours du développement	38

Utilisation de la symbiose dans la lutte contre la punaise de lit

La méthode de lutte la plus utilisée consiste en l'application de produits chimiques sur une grande surface ou concentrés dans une zone choisie. Ces produits peuvent provoquer des intoxications, polluer l'environnement et augmenter la résistance des punaises aux insecticides, réduisant leur efficacité. Le besoin de limiter l'usage des insecticides appelle à l'exploration de nouvelles approches de moyen de régulation ciblée (Siegwart *et al.*, 2015).

Aujourd'hui, il est conseillé aux particuliers et aux professionnels de la désinsectisation de privilégier les méthodes non chimiques, comme le traitement par la chaleur ou la congélation. Si les deux traitements sont considérés comme efficaces, ils restent plutôt applicables à la désinsectisation de petits objets. Une alternative repose sur les outils de lutte biologique, comme l'utilisation de champignons entomopathogènes. Ces produits encore en développement, peuvent avoir des effets encore mal connus sur la santé humaine ou sur l'environnement, en plus d'être difficiles à appliquer avec une efficacité variable (Tableau 1). Enfin, l'utilisation d'antibiotique est exclue, car ne correspondant pas à une application à grande échelle en raison du coût financier et de leur large spectre, ainsi que des préoccupations en matière de santé publique liées à la résistance aux antibiotiques chez les microorganismes environnementaux (Larsson and Flach, 2022). Une solution alternative serait le développement de produits chimiques spécifiques de la punaise, limitant les cas d'intoxication et palliant les résistances existantes aux insecticides usuels. Le développement de nouvelles méthodes spécifiques qui se fondent sur l'utilisation des bactéries symbiotiques de la punaise de lit est donc une piste particulièrement prometteuse.

Tableau 1. Efficacité, applicabilité et risques pour la santé humaine et pour l'environnement des moyens de luttés existants contre la punaise de lit (Anses, 2023).

Méthode de lutte	Efficacité (mortalité des punaises induite par le traitement)	Niveau d'incertitude (sur l'évaluation de l'efficacité)	Applicabilité	Risque pour la santé humaine	Risque pour l'environnement	Limites de la méthode	
Physique	Chaleur sèche	Élevée	Faible	Moyenne* Applicable par des professionnels utilisant des appareils adaptés pour des objets infestés et pour les habitats. L'applicabilité de cette méthode pour les particuliers reste à démontrer	Faible* Risque secondaire lié à l'inhalation des aérosols	Faible* Possible altération de l'objet, voire incendie en cas de non-respect des mesures de sécurité	- Nécessité d'avoir du matériel adapté - Les habitats doivent supporter une température de 60°C (ou supérieur à 46°C pour les petits objets ou des surfaces non protégées) - L'important est d'atteindre une température létale partout. La durée de traitement est par conséquent à ajuster en fonction de l'environnement
	Traitement à la vapeur (chaleur humide ou sèche)	Élevée	Faible	Moyenne* Il est délicat de cibler tous les lieux de repos des punaises dans une pièce infestée	Négligeable*	Moyen* possible altération de l'objet traité	- Nécessité d'avoir du matériel adapté - Rigueur indispensable dans l'application de la vapeur
	Congélation	Élevée	Faible	Moyenne* Applicable pour des vêtements ou de petits objets, voire des meubles en chambre froide	Négligeable*	Négligeable*	- L'important est d'atteindre une température létale à cœur. La durée de traitement est par conséquent à ajuster en fonction de l'environnement
	Cryonite®	Faible*	Élevé	Faible*	Moyen* Brûlure et risque d'intoxication par le CO ₂ relâché en milieu clos	Négligeable*	- Limites logistiques (liées à la mise en œuvre)
	Lavage du linge en machine à 60°C	Élevée	Élevé	Moyenne* Applicabilité réservée à la décontamination du linge	Négligeable*	Négligeable*	- Risque de dissémination des punaises si transport du linge dans de mauvaises conditions - Possible altération du linge
	Séchage du linge à plus de 40° C et pendant 30 min	Élevée	Élevé	Moyenne* Applicabilité réservée à la décontamination du linge	Négligeable*	Négligeable*	- Risque de dissémination des punaises si transport du linge dans de mauvaises conditions
	Trempage du linge à froid (15°C) de 24h	Faible	Élevé	Moyenne* Applicabilité réservée à la décontamination du linge	Négligeable*	Négligeable*	- Aucune
	Nettoyage du linge à sec avec du perchloroéthylène	Élevée	Élevé	Moyenne* Applicabilité réservée à la décontamination du linge	Élevé*	Élevé*	- Toxicité du perchloroéthylène - Risque de dissémination des punaises si transport du linge dans de mauvaises conditions
	Traitement par le vide ou par anoxie	Élevée	Élevé	Faible*	Faible*	Négligeable*	- La mise en œuvre nécessite des conditions de sécurité élevées - Le vide, pour supprimer l'oxygène, est complexe à obtenir
	Saturation de l'atmosphère en CO ₂	Élevée	Élevé	Faible*	Élevé* Risque d'asphyxie	Négligeable*	- La mise en œuvre nécessite des conditions de sécurité élevées
	Nettoyage (aspiration, brossage)	Moyenne*	Élevé	Élevée* Applicable dans tous les habitats infestés	Négligeable*	Négligeable*	- Risque de dispersion de l'infestation - Nécessite une mise en œuvre rigoureuse
	Suppression des objets infestés	Moyenne*	Élevé	Élevée* Applicable dans tous les habitats infestés	Négligeable*	Moyen* Source de contamination d'autres sites	- Méthode à adapter en fonction du niveau de débâblement de l'objet infesté
Pièges couplés aux attractants	Faible	Élevé	Élevée* Applicable dans tous les habitats infestés	Négligeable*	Négligeable*	- Outils mieux adaptés à la surveillance des infestations	
Biologique	Utilisation des bactéries ou des champignons entomopathogènes	Faible à Élevée (selon l'agent entomopathogène utilisé)	Moyen	Faible*	Données insuffisantes sur le risque pour la santé humaine	Données insuffisantes sur le risque pour l'environnement	- Difficultés de mise en œuvre sur le terrain (e.g., contrôle de la température et le taux d'humidité dans une pièce pour optimiser l'action de produits) - À l'heure actuelle aucune demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) n'a été déposée pour des produits à base de <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> destinés à la lutte contre les punaises de lit. De plus, aucun produit à base de <i>Bauvaria bassiana</i> ne peut être commercialisé en Europe (<i>Bauvaria bassiana</i> n'a pas fait l'objet d'une demande d'approbation en tant que substance active biocide)
Chimique	Insecticides chimiques	Voir les rapports d'évaluation des substances actives biocides approuvées et des produits autorisés sur le site de l'ECHA	Élevée* Applicables dans tous les habitats infestés	Élevé* en cas de non-respect des conditions d'utilisation imposées dans les AMM	Élevé* en cas de non-respect des conditions d'utilisation imposées dans les AMM	- Toxicité des produits utilisés à l'intérieur des logements pour l'être humain et les espèces non cibles, en cas de non-respect des conditions d'utilisation imposées dans les AMM - Résistances aux insecticides	
	Terre de diatomées (sel de Kieselguhr)	Moyenne	Faible	Élevée* Applicables dans tous les habitats infestés	Moyen*	Faible*	- Toxicité des produits utilisés à l'intérieur des logements pour l'être humain et les espèces non cibles, en cas de non-respect des conditions d'utilisation imposées dans les AMM
	Dioxyde de silicium synthétique (silice amorphe en gel ou en poudre)	Élevée	Faible	Élevée* Applicables dans tous les habitats infestés	Moyen*	Faible*	- Toxicité des produits utilisés à l'intérieur des logements pour l'être humain et les espèces non cibles, en cas de non-respect des conditions d'utilisation imposées dans les AMM
	Ozone gazeux	Faible	Moyen	Faible*	Élevé*	Élevé*	- Difficile à transposer sur le terrain à cause des limitations logistiques (production et maintien de fortes concentrations d'ozone, mesures de sécurité) - Au regard du règlement sur les biocides, il n'est pas possible d'utiliser l'ozone en tant qu'insecticide

Comme nous l'avons évoqué précédemment, différentes stratégies utilisant la symbiose existent pour lutter contre les insectes ravageurs. En l'occurrence, la punaise de lit est dépendante de *wCle*. Sans la bactérie, *C. lectularius* subit une diminution de 55% de son taux d'éclosion, un rallongement d'une semaine de sa phase nymphale et une diminution de 60% de son taux d'émergence en adulte (Hosokawa *et al.*, 2010; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). La privation en vitamines B, normalement fournie par *wCle*, altère des étapes précoces du cycle de vie. De plus *wCle* est transmise verticalement dans la population et ne peut donc pas être récupérée horizontalement à partir d'autres insectes ou de l'environnement. Une lutte ciblant la perturbation de la symbiose semble donc particulièrement prometteuse (Madhav *et al.*, 2020). Le développement de ce genre de symbiocide nécessite une connaissance des mécanismes liés à l'interaction, qui est mesurable en termes de localisation et de quantité d'endosymbiote.

Présentation des objectifs de la thèse

Les mécanismes de régulation de la densité et de la localisation de *wCle* sont peu connus actuellement chez les punaises de lit, et les bases moléculaires de l'interaction hôte-symbiote ont été étudiées uniquement sous l'angle de la punaise, par des approches de transcriptomique comparative entre les différents stades nymphaux (Bai *et al.*, 2011; Rosenfeld *et al.*, 2016). Les connaissances restent aussi lacunaires pour comprendre pleinement la dynamique de l'association au cours du cycle de vie et des conditions dans lesquelles évolue l'insecte (Fisher *et al.*, 2018).

L'objectif de cette thèse est donc de caractériser plus finement l'interaction entre la punaise de lit et son symbiote nutritionnel obligatoire, *wCle*.

I. Objectif I : Étude des effets de la symbiose sur la biologie de *C. lectularius*

Le modèle de la punaise de lit étant nouveau au laboratoire, nous avons dû établir notre propre élevage de punaise de lit *ex nihilo*. Ainsi, bien que les conditions d'élevage et les traits de vie aient été connus du point de vue de *C. lectularius* et du point de vue de la symbiose (Janisch, 1932; Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Hosokawa *et al.*, 2010), une mise en place était nécessaire afin de vérifier si les souches candidates présentaient des temps de maturation des œufs, des taux d'éclosion, des temps de développement nymphaux, des taux de survie, et des temps et taux de pontes similaires aux études précédentes. Ceci nous a permis de sélectionner notre souche et nos paramètres d'étude. Après ces analyses de mise en place d'un nouveau modèle au laboratoire, l'effet de la symbiose et l'effet de la supplémentation en vitamines ont été étudiés sur la biologie de notre souche candidate.

2. Objectif 2 : Description de la dynamique quantitative de *wCle* au cours du développement

Parce que *wCle* est un symbiote nutritionnel, nous supposons que certains facteurs comme la prise de repas sanguin puisse affecter l'association entre *C. lectularius* et son symbiote. Aussi, le développement en plusieurs stades nymphaux et la maturation des ovaires au stade adulte nous interrogent sur la dynamique de l'interaction au cours de la biologie de la punaise. Une étude réalisée sur les premiers et derniers stades nymphaux indique que la densité augmenterait au cours du développement, et diminuerait en absence de repas sanguin chez la femelle adulte (Fisher *et al.*, 2018). Afin d'identifier des étapes critiques dans l'interaction entre *C. lectularius* et *wCle*, nous avons mis en place une cinétique incluant tous les stades nymphaux, mais également des mâles et des femelles régulièrement nourries ou à jeun.

3. Objectif 3 : Description de la localisation de *wCle* au cours du développement

Nous savons que *wCle* est présente dans les bactériomes du 1^{er} stade nymphal ainsi que des adultes (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020) et est également localisée dans les ovaires de la femelle adulte. Ces observations questionnent sur la dynamique de *wCle* dans ces tissus au cours du développement. Premièrement, la dynamique d'infection des ovaires reste encore peu étudiée. Deuxièmement, puisque *wCle* est un symbiote nutritionnel, l'effet du développement et de la prise de repas sur la localisation de *wCle* au niveau tissulaire mais aussi au niveau cellulaire doit être investiguée. Afin de préciser la localisation tissulaire et cellulaire des bactéries au cours du développement, nous avons réalisé des observations tissulaires de fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) en microscopie à épifluorescence et confocale ainsi que des observations cellulaires en microscopie à transmission électronique (TEM).

En résumé, cette thèse propose une meilleure compréhension de l'association entre la punaise de lit et son symbiote primaire en identifiant des temps clés de cette symbiose en termes de dynamique de quantité et de localisation. Les résultats permettront une meilleure compréhension du modèle symbiotique punaise/*wCle*, afin d'étudier ensuite les mécanismes par lesquels les punaises maintiennent *wCle* tout en contrôlant leur multiplication. À terme, les résultats de cette recherche pourraient ouvrir la voie au développement d'un outil de traitement spécifique et efficace pour contrôler les populations de punaises de lit, répondant ainsi aux besoins des professionnels de la désinsectisation et des clients conscients de l'impact environnemental des traitements chimiques non spécifiques. De plus, les méthodes et les connaissances acquises dans ce projet pourront être appliquées à d'autres modèles biologiques, notamment les symbioses hématophages strictes, élargissant ainsi leur portée scientifique.



**-Partie II-
Études**

I | Effets de la symbiose sur les traits d'histoire de vie de *C. lectularius*

Sommaire

Contexte de l'étude	41
Étude	42
1. Introduction	42
2. Matériel et méthode.....	46
3. Résultats	51
4. Discussion	54
Figures supplémentaires.....	56
Conclusion de l'étude et perspectives	57

Contexte de l'étude

Cette thèse a commencé avec la mise en place d'élevages de punaises de lit au laboratoire. La mise en place a nécessité plusieurs étapes. Premièrement, il a fallu choisir un moyen de nourrissage qui permette un contrôle des repas ingérés afin de supplémenter le sang en antibiotiques et/ou vitamines quand nécessaire. Un système Hémotek® a été mis en place au début du projet (Figure 15). Deuxièmement, il a fallu choisir un sang pour nourrir les punaises. Le sang humain a été choisi car correspondant le plus aux objectifs finaux du projet qui visent à comprendre l'interaction métabolique entre *wCle* et la punaise, notamment lors de la prise de repas sanguin chez l'humain. Troisièmement, il a fallu sélectionner une souche de punaises pour nos expériences. Des souches de terrains ont tout d'abord été prélevées sur les sites de Vénissieux et Villeurbanne en France mais n'ont pas pu être maintenues en élevage car se nourrissant mal sur le système de nutrition artificiel. Des punaises de la souche *London Field* se nourrissant sur sang d'origine murine, porcine, et aviaire ont été achetées auprès de l'entreprise Cimexstore®. Cette souche a été testée par PCR pour la présence de gène de *wCle*,

BEV-like et torix *Rickettsia* et nous avons détecté la présence de chacun des endosymbiotes testés. Afin de séparer l'effet de *Wolbachia* de celui de torix *Rickettsia*, nous avons contacté un laboratoire en Allemagne (Oliver Otti ; Dresden, Allemagne) qui possédait des lignées isofemelles de punaises piégées à Londres en 2008 et qui ne sont pas infectées par torix *Rickettsia*. Nous avons choisi cette souche F4 pour les élevages qui sont aujourd'hui entretenus au laboratoire.

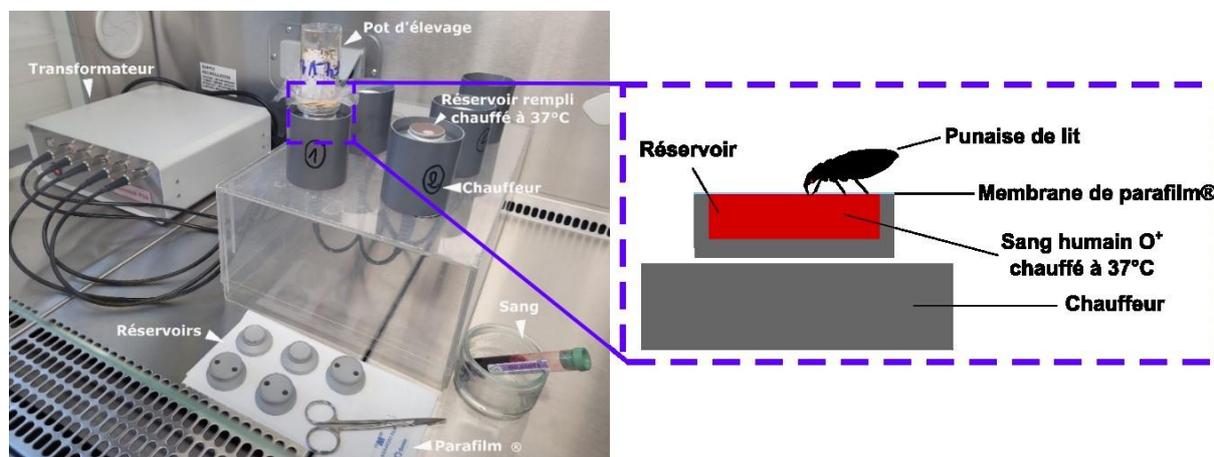


Figure 15. Présentation du système Hémotek et schéma du mode de nourrissage.

Étude

I. Introduction

Au cours du dernier siècle, la biologie de la punaise de lit a été particulièrement bien étudiée (Janisch, 1932; Mellanby, 1939; Johnson, 1941). Cependant ces études n'étaient centrées que sur la punaise, et l'impact de la symbiose était négligé, même si parfois effleuré (Takano-Lee *et al.*, 2003). C'est en 2010, lorsque Hosokawa *et al.* (Hosokawa *et al.*, 2010) présentent *wCle* comme un symbiote nutritionnel associé aux bactériomes et aux ovaires, que l'effet de la symbiose sur la biologie de la punaise est étudié. Cependant, la suppression de *wCle* par antibiotique sur une génération n'avait pas permis une parfaite élimination du symbiote. Douze années plus tard, Hickin *et al.* (Hickin, Kakumanu and Schal, 2022) adaptent le protocole de Hosokawa *et al.* (Figure 16), afin de vérifier l'effet de *wCle* et de la supplémentation vitaminique dans la biologie de *C. lectularius*. Le traitement antibiotique, complété en vitamines B, est réalisé pendant 15 mois, permettant l'élimination totale de *wCle*. La complémentation vitaminique est réalisée à partir d'un cocktail de vitamines Kao & Michayluk (KM) [K3129, Millipore Sigma] qui permet une meilleure reproductibilité mais dont la composition et les concentrations sont légèrement différentes de celles utilisées par Hosokawa (Tableau 2). Ces adaptations permettent également deux améliorations. Premièrement, les suivis étant réalisés à la deuxième génération après relâche du traitement antibiotique, l'effet direct de la rifampicine est supprimé dans les populations suivies. Deuxièmement, les suivis

étant réalisés à la troisième génération après relâche de la supplémentation vitaminique, l'effet simple de la vitamine B peut être étudié dans ses populations.

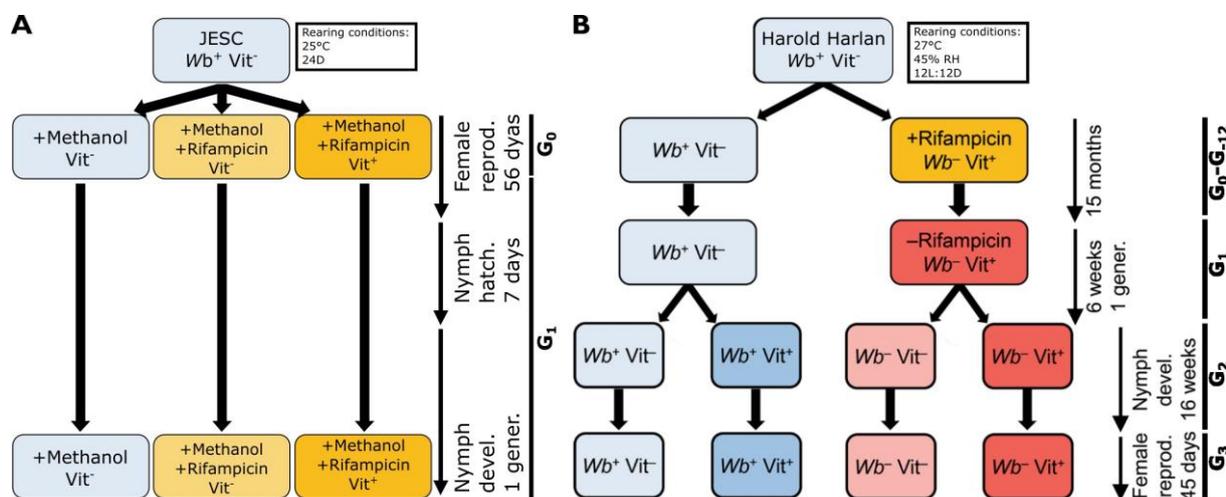


Figure 16. Schéma des protocoles expérimentaux de générations de lignées aposymbiotiques. **A.** Hosokawa *et al.* 2010. **B.** Hickin *et al.* 2022. Les générations sont notées sur la gauche de chaque figure.

Tableau 2. Compositions des solutions vitaminiques utilisées dans les protocoles de **A.** Hosokawa *et al.* 2010 et de **B.** Hickin *et al.* 2022

A. Solution Hosokawa et al. 2010		B. Solution Hickin et al. 2022	
Composé	µg/mL	Composé	µg/mL
D-Biotine	1	D-Biotine	1
Riboflavine	20	Riboflavine	2
Thiamine	100	Thiamine hydrochloride	100
Acide folique	30	Acide folique	40
Pyridoxine	100	Pyridoxine hydrochloride	100
Cobalamine	1	Cyancobalamine	2
Choline chloride	185	Choline chloride	100
Acide pantothenique	100	D-Calcium pantothenate	100
Acide nicotinique	100	Nicotinamide	100
Meso-inositol	118	Myo-inositol	10000
		L-Asorbic acide	200
		Acide p-aminobenzoïque	2
		Vitamine A	1

Cette nouvelle étude confirme que l'absence de *wCle* entraîne une baisse du taux d'éclosion des œufs (Figure 17B), un ralentissement de la phase nymphale (Figure 17C) et une diminution de la taille des adultes (Figure 17E), qui sont restaurés par la supplémentation du repas sanguin en vitamines B. Des différences sont aussi observées. Le nombre d'œufs pondus n'est pas significativement différent entre les femelles contrôles et les femelles traitées avec de l'antibiotique dans l'expérience de 2010, tandis que dans l'expérience de 2022 les femelles aposymbiotiques non supplémentées en vitamines ont montré un taux de ponte sensiblement plus faible que les autres femelles (Figure 17A). Aussi, pour ces mêmes populations, la durée moyenne du développement des nymphes traitées aux antibiotiques par rapport à celle des nymphes contrôles augmente en moyenne de cinq semaines dans l'expérience de Hosokawa *et al.* 2010 et de deux semaines dans l'expérience de Hickin *et al.* 2022 (Figure 17D).

Plusieurs éléments peuvent expliquer les différences observées entre les deux études. Premièrement, les protocoles de génération de populations aposymbiotiques diffèrent entre les deux études. Dans l'étude de 2010, les suivis ont été réalisés sur la 1^{ère} génération de punaises après avoir été traités à la rifampicine sans supplémentation en vitamines B pendant 8 semaines tandis que dans celle de 2022 les suivis ont été réalisés sur la 2^e génération de punaises après avoir éliminé *wCle* à la suite de 15 mois de traitement antibiotique supplémenté en vitamines. Ainsi, le protocole de Hickin *et al.* permet une meilleure élimination de *wCle*, tout en évitant l'effet secondaire du traitement antibiotique, alors que des *wCle* restaient observables chez les populations traitées de l'étude de Hosokawa *et al.*

Deuxièmement, les deux études ont été faites sur des souches différentes. La souche de punaises de lit utilisée dans l'étude de 2010 était la souche monosymbiotique du *Japan Environmental Sanitation Center* (JESC), alors que la souche Harold Harlan (HH), coinfectée par *wCle* et BEV-like, a été utilisée dans l'étude de 2022. Il est possible que BEV-like soit un symbiote nutritionnel encore non caractérisé comme tel, et qu'il ait été éliminé par le traitement antibiotique. Ceci pourrait expliquer la récupération seulement partielle de plusieurs caractères avec une supplémentation en vitamine B.

Troisièmement, de telles différences entre ces deux expériences peuvent s'expliquer par les différences de conditions d'élevage : Hickin *et al.* élèvent leur souche à 27°C, et utilisent une solution de vitamines qui diffère de la solution de vitamines B utilisée par Hosokawa *et al.*, qui par ailleurs élèvent leur souche à 25°C. De telles différences de température et nutrition peuvent grandement affecter la biologie de l'insecte (Johnson, 1941; Reinhardt and Siva-Jothy, 2007).

Enfin, il est possible que les communautés bactériennes intestinales (Potts *et al.*, 2021) ou ovariennes (Bellinvia, Johnston, Mbedi, *et al.*, 2020; Bellinvia, Johnston, Reinhardt, *et al.*, 2020) aient été affectées par les traitements et que tous les traits d'histoire de vie n'aient pas pu être entièrement récupérés chez les punaises de lit traitées après supplémentation en vitamines.

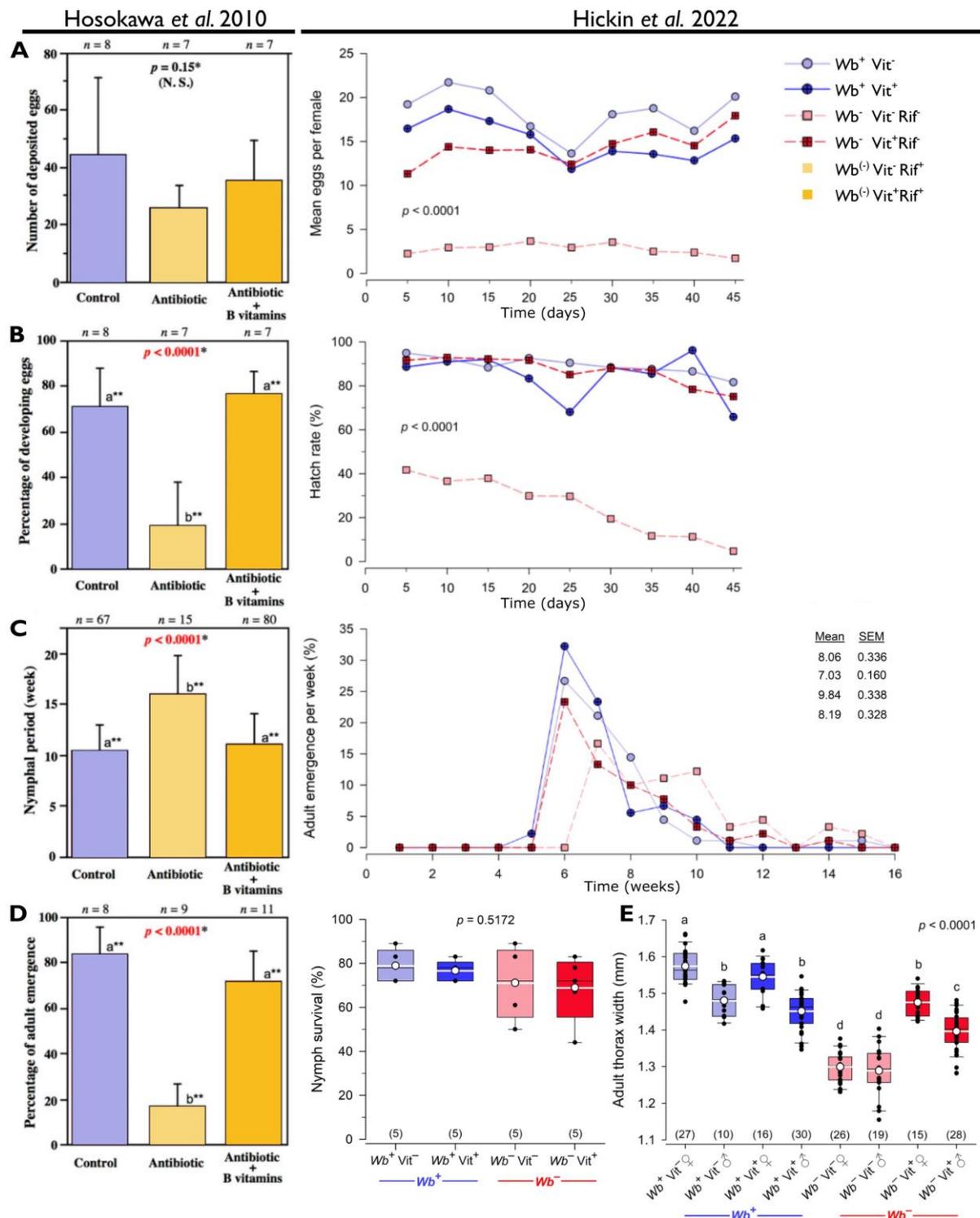


Figure 17. Résumé des études sur les traits d’histoire de vie de la punaise réalisées par Hosokawa *et al.* 2010, et Hickin *et al.* 2022. Effets de *wCle* et de la supplémentation en vitamines sur **A.** la fécondité à G0/G3 ((Hosokawa *et al.* 2010)/(Hickin *et al.* 2022)) ; **B.** l’éclosion des œufs à G1/G3 ; **C.** la période nymphale à G1/G2 ; **D.** la survie des nymphes à G1/G2 ; et **E.** la taille des adultes à G1. Les couleurs des colonnes sur les figures issues de l’étude de Hosokawa *et al.* 2010 ont été adaptées pour correspondre aux couleurs de l’étude de Hickin *et al.* 2022, soit bleu clair pour les punaises possédant *wCle* (*wCle*+*Vit*-), bleu foncé si ces dernières ont des repas supplémentés en vitamines (*wCle*+*Vit*+), rouge clair pour les

punaises ayant suivies un traitement antibiotique à la génération G0 et dont les suivies sont réalisés sans antibiotique à la génération G1, G2 et G3 (wCle-Vit-Rif-), rouge foncé si ces dernières ont des repas supplémentés en vitamines (wCle-Vit+Rif-), jaune clair pour les punaises ayant suivies un traitement antibiotique à la génération G0 et dont les suivies sont réalisés toujours sous antibiotique à la génération G1 (wCle-Vit-Rif+), jaune foncé si ces dernières ont des repas supplémentés en vitamines (wCle-Vit+Rif+).

La souche F4 utilisée dans notre étude est une souche différente de celles des deux études précédentes (Thongprem *et al.*, 2020). Initialement maintenue à 26°C et 70% d'humidité relative et arborant deux endosymbiotes wCle, BEV-like, cette souche a un temps de développement nymphal d'environ 28 jours et un taux de fertilité d'environ 75%. Nous avons choisi d'étudier une lignée bisymbiotique arborant wCle et BEV-like compte-tenu de la faible prévalence de torix *Rickettsia* (Potts *et al.*, 2020). Nous avons maintenu cette souche à 24°C et 60% d'humidité, suivant les indications d'élevage d'autres études (Jones, 1930; Johnson, 1941). Compte-tenu du fait que les traits d'histoire de vie peuvent varier selon les différents critères cités précédemment, nous avons réalisé notre propre étude de suivi des traits d'histoire de vie, en prenant en compte l'effet de la symbiose. L'objectif de cette étude préliminaire est de caractériser notre souche de laboratoire pour les différentes conditions de symbiose et de suppléments vitaminiques. Les résultats obtenus seront discutés en miroir des études de suivis déjà réalisées (Johnson, 1941; Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020; Hicken, Kakumanu and Schal, 2022). Aussi, la description des traits d'histoire de vie des populations nous permettra d'établir les protocoles expérimentaux nécessaires à la réalisation des prochaines études présentées dans cette thèse.

2. Matériel et méthode

a. Insectes, alimentation, élevage

La souche F4 de *C. lectularius* a été échantillonnée à Londres (Royaume-Uni) en 2008 (Thongprem *et al.*, 2020). La lignée isofemelle F4-V48 a été créée immédiatement après le prélèvement et a été élevée sur du sang humain dans le laboratoire d'Oliver Otti jusqu'en 2021 (Dresde, Allemagne). Cette lignée a été confirmée par PCR comme étant infectée par wCle et BEV-like et négative pour torix *Rickettsia*. Nous avons nourri les punaises de lit sur le système Hemotek® avec du sang humain fourni par l'Établissement Français du Sang (EFS) (groupe sanguin : O/A avec 170 UI Héparine/Sodium ; membrane : parafilm®), et chauffé à $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les élevages ont été maintenus dans des bocaux ronds en plastique contenant des abris en carton ondulé (41 mm x 30 mm), à 24 °C, 60 % d'humidité relative et avec une photopériode de 12L:12D. Les couples ont été nourris chaque semaine avec 1 mL de sang humain pendant 10 minutes.

b. Génération de populations

Le protocole de génération des populations a été adapté des protocoles réalisés par Hosokawa *et al.* 2010 (Figure 16A) et Hickin *et al.* 2022 (Figure 16B). La figure 18 montre la conception expérimentale globale. Cependant, des temps de générations plus long et des taux de mortalités importants ont été observés.

Stocks

Les populations stocks d'origine sont des populations F4-V48 symbiotiques. Un stock de punaises symbiotiques (SS pour Stock Symbiotique) a été formé à partir de 20 couples de stade 5 dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang (Figure 18, bleu clair). Au même moment, afin de générer des populations stocks sans *w*Cle (SA pour Stock Antibiotique), 20 couples de stade 5 ont été isolés de la population stock d'origine dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang additionné d'une solution de rifampicine-méthanol [1 mg/mL ; 10 µL/mL de sang] et d'une solution de vitamines Kao & Michayluk (KM) [K3129, Millipore Sigma ; 10 µL/mL de sang]. Ce protocole a été maintenu 15 mois (Figure 18, bleu clair et jaune).

Populations parentales

Après 15 mois, 3 populations ont été générées en parallèle, maintenues pendant 24 semaines (~3 générations). Pour la génération des Contrôles Parentaux Symbiotiques (PSC), 20 couples de stade 5 ont été retirés de la population SS, placés dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang uniquement (Figure 18, bleu clair). Pour la génération des populations Parentales-Symbiotiques avec supplémentation en Vitamines (PSV), 20 couples de stade 5 ont été prélevés du stock F4-V48, placés dans des pots ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang supplémenté avec une solution de vitamines KM [10 µL/ mL de sang] (Figure 18, bleu). Pour éviter tout effet secondaire du traitement antibiotique utilisé pour générer la population SA et former les populations Parentales-Aposymbiotiques avec supplémentation en Vitamines (PAV), 20 couples de stade 5 ont été retirés de la population SA, placés dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris sur 1 ml de sang additionné d'une solution de vitamines KM [10 µL/mL de sang] (Figure 18, rouge).

Populations suivies

Après 24 semaines, 4 populations ont été générées en parallèle. Premièrement, pour former les populations symbiotiques contrôles (SC), 20 couples d'adultes ont été isolés de PSC dans des pots ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang (Figure 18, bleu clair). Deuxièmement, pour tester l'effet de la supplémentation en vitamines, 20 couples d'adultes ont été isolés de PSV dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang supplémenté avec une solution de vitamines KM [10 µL/mL sang], pour former les populations supplémentées en vitamines symbiotiques (SV) (Figure 18, bleu). Troisièmement, pour tester

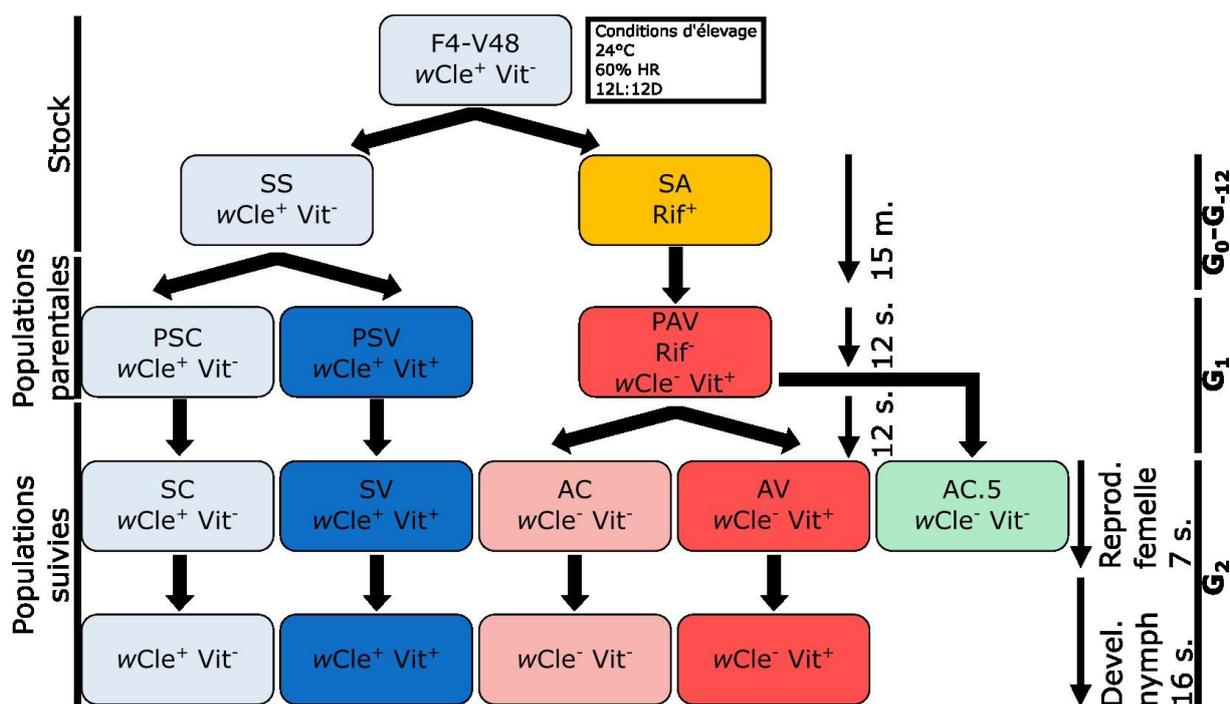


Figure 18. Schéma du protocole expérimental de génération de lignées aposymbiotiques utilisé dans cette étude. La lignée F4-V48 infectée par *wCle* (*wCle*⁺) a été nourrie avec du sang non supplémenté en vitamine (*Vit*⁻). La lignée a été divisée en deux stock, SS *wCle*⁺*Vit*⁻ et SA traités à la rifampicine (*Rif*⁺) pendant 15 mois. Pour éliminer l'antibiotique de la population, des punaises de lit PAV aposymbiotiques (*wCle*⁻) ont été élevées pendant 24 semaines (~ trois générations) sur du sang sans rifampicine (*Rif*⁻) supplémenté avec le mélange de vitamines (*Vit*⁺). Les premiers stades 5 émergés à 12 semaines ont été placés dans un groupe de traitement AC.5 *wCle*⁻*Vit*⁻. Les groupes PSC *wCle*⁺*Vit*⁻ et PSV *wCle*⁺*Vit*⁺ ont été alimentés simultanément avec du sang non supplémenté et supplémenté en vitamines. Lorsque les adultes ont émergé dans les groupes PSC et PSV, ceux-ci ont été placés dans de nouveaux pots SC *wCle*⁺*Vit*⁻ et SV *wCle*⁺*Vit*⁺ respectivement. Lorsque les adultes ont émergé dans le groupe PAV, ceux-ci ont été répartis dans des nouveaux pots AC *wCle*⁻*Vit*⁻ et AV *wCle*⁻*Vit*⁺. Les populations SC, SV, AC, AV et AC.5 ont été nourries suivant leur traitement toutes les semaines pendant 7 semaines et les œufs comptés toutes les semaines. Les nymphes émergées des quatre groupes de traitement SC, SV, AC et AV (pas de larve pour AC.5) ont été nourries chaque semaine et leur développement a été enregistré pendant 16 semaines. Au fur et à mesure de leur apparition, les femelles et les mâles adultes du même groupe de traitement ont été comptés jusqu'à 16 semaines. Des adultes issues de PAV (n=3) ont été échantillonnées pour la quantification de *wCle* par qPCR.

l'effet de la dépendance en vitamines chez les punaises de lit aposymbiotiques, 20 couples d'adultes ont été isolés de PAV dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang, pour former des populations aposymbiotiques sans vitamines (AC) (Figure 18, rose). Quatrièmement, pour tester l'effet de la supplémentation vitaminique et former les populations aposymbiotiques supplémentées en vitamines (AV), 20 couples d'adultes ont été isolés de PAV

dans des bocaux ronds en plastique (x2) et nourris avec 1 mL de sang supplémenté avec une solution de vitamines KM [10 µL/mL sang] (Figure 18, rouge).

Pour tester si l'effet d'une supplémentation en vitamines a un impact différent sur les traits d'histoire de vie des punaises lorsqu'elle est arrêtée avant ou après la mue imaginale dans les populations aposymbiotiques, 10 et 20 couples du stade 5 ont été isolés de PAV à 12 semaines (en raison des disponibilités) chacun dans des pots ronds en plastique et nourris avec 1 mL de sang, pour former des populations aposymbiotiques privées vitamines avant la mue imaginale (AC.5) (Figure 18, vert).

c. Vérification par qPCR de l'absence de symbiote

À chaque changement de population, la présence de *wCle* a été vérifiée par PCR quantitative (qPCR). Un test par qPCR en temps réel ciblant l'ADNr *wCle*-16S a été utilisé pour obtenir une quantification de *wCle* dans les punaises de lit échantillonnées, avec un mélange réactionnel de 10 µL contenant 5 µL de SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Bio -Rad), 500 nM de chaque amorce, 300 nM de chaque sonde et 2 µL d'ADN extrait préalablement dilué au 1/20. Nous avons utilisé les amorces 5'-AGT CAT CAT GGC CTT TAT GGA-3' et 5'-TCA TGT ACT CGA GTT GCA GAG T-3'. La sonde (5'-FAM-TGG TGT CTA/ZEN/CAA TGG GCT-TAMRA-3') a été fournie par IDT DNA Technologies et comprend deux activateurs, Iowa Black® à l'extrémité 3', et un autre interne appelé ZENTM ainsi qu'un fluorophore FAM à l'extrémité 5'. La qPCR en temps réel a été réalisée avec QuantStudio 6 Flex™ (Applied Biosystems) avec le programme suivant : une étape initiale de dénaturation à 95 °C pendant 30 s, suivie de 40 cycles à 95 °C pendant 10 s, à 60 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s. L'efficacité du test qPCR a été déterminée et confirmée à chaque analyse en construisant une courbe étalon utilisant des dilutions en série d'un amplicon purifié et quantifié de chaque cible. La spécificité et l'absence d'inhibiteurs dans les échantillons ont été évaluées en amont à l'aide de dilutions d'extraits d'ADN réalisés dans les mêmes conditions.

d. Mesures des traits d'histoire de vie

Effet de la symbiose et de la supplémentation sur la fécondité et la fertilité

Pour estimer l'effet de la symbiose et de la supplémentation en vitamines sur la fertilité et la fécondité, le nombre d'œufs pondus a été compté chaque semaine après la prise de repas des adultes (n=2 pour chaque condition SC, SV, AC et AV sur 7 semaines). Les cartons sur lesquels les femelles ont pondu ont été transférés dans un nouveau pot rond en plastique (x2) pour chaque condition et de nouveaux cartons ont été ajoutés dans les pots contenant les adultes. La semaine suivante, le nombre de nymphe de premier stade ayant émergé a été compté (n=2 pour chaque condition SC, SV, AC et AV sur 6 semaines).

L'analyse de l'effet de la symbiose et de la supplémentation vitaminique sur la fécondité a été réalisée par ANOVA (anova_test (Eggsrel ~Symbiotic*Vitamins)) où Eggsrel est le nombre

d'œufs pondus par femelle, Symbiotic pour si la population suivie est symbiotique ou non et Vitamins si la population suivie est nourrie avec du sang supplémenté en vitamine ou non. L'analyse de l'effet de la symbiose et de la supplémentation vitaminique sur la fertilité a été réalisée par ANOVA (anova_test (St1rel ~ Symbiotic*Vitamins)) puis avec un test de Tukey (tukey_hsd (St1rel ~ Symbiotic*Vitamins)) où St1rel est le nombre de premiers stades par rapport au nombre d'œufs pondus une semaine auparavant, Les dynamiques de ponte et l'éclosion n'ont pas été testées à cause d'un nombre de réplica trop faible ($n = 2$).

Effet de la symbiose et de la supplémentation sur le développement et l'émergence

Pour estimer les effets de la symbiose et de la supplémentation sur la vitesse de développement des nymphes, chaque semaine à partir de leur éclosion, le nombre de nymphes ayant muées pendant la semaine a été compté ($n=2$ pour chaque condition SC, SV, AC et AV sur 6 semaines). Les nymphes qui n'ont pas mué sont retirées de l'expérience. Le suivi hebdomadaire se poursuit jusqu'au stade 5 inclus. Le nombre de semaines avant l'émergence en adulte est ensuite compté.

L'analyse de l'effet de la symbiose et de la supplémentation vitaminique sur le l'émergence a été réalisée par ANOVA (anova_test (EmergenceA ~Symbiotic*Vitamins)) puis avec un test de Tukey (tukey_hsd (EmergenceA ~ Symbiotic*Vitamins)), où EmergenceA est le pourcentage d'adultes émergés par rapport au nombre d'œuf pondu initialement. Les dynamiques de développement n'ont pas été testées à cause d'un nombre de réplica trop faible ($n = 2$).

Effet de la supplémentation vitaminique sur la fertilité des aposymbiotiques

Pour estimer l'effet du moment de suspension de la supplémentation vitaminique sur la reproduction des punaises aposymbiotiques, chaque semaine le nombre d'œuf pondu a été compté chez des punaises aposymbiotiques pour lesquelles la supplémentation alimentaire a été levée avant ou après leur mue imaginale (AC.5 et AC respectivement) ($n=2$ pour chaque condition, sur 7 semaines).

L'analyse de l'effet du moment d'interruption de la supplémentation vitaminique sur la fécondité chez les punaises aposymbiotiques a été réalisée par ANOVA (anova_test (Eggsrel ~ Int)) puis avec un test de Tukey (tukey_hsd (Eggsrel ~ Int)) où Int est le moment de l'interruption de la supplémentation vitaminique (avant ou après le repas précédant la mue imaginale).

3. Résultats

a. Effet de l'interruption de la supplémentation sur la ponte des aposymbiotiques

Afin de déterminer si la perte de *wCle* entraîne une baisse du nombre d'œufs pondus et si la supplémentation vitaminique du repas sanguin permet de restaurer cette fécondité, nous avons compté le nombre d'œufs pondus par femelle (2x20 femelles pour chaque condition initiale, $n = 14$ par condition). Nous n'avons observé aucun effet du traitement sur la fécondité pendant les 7 semaines de relevés (Figure 19A, Tableau S1).

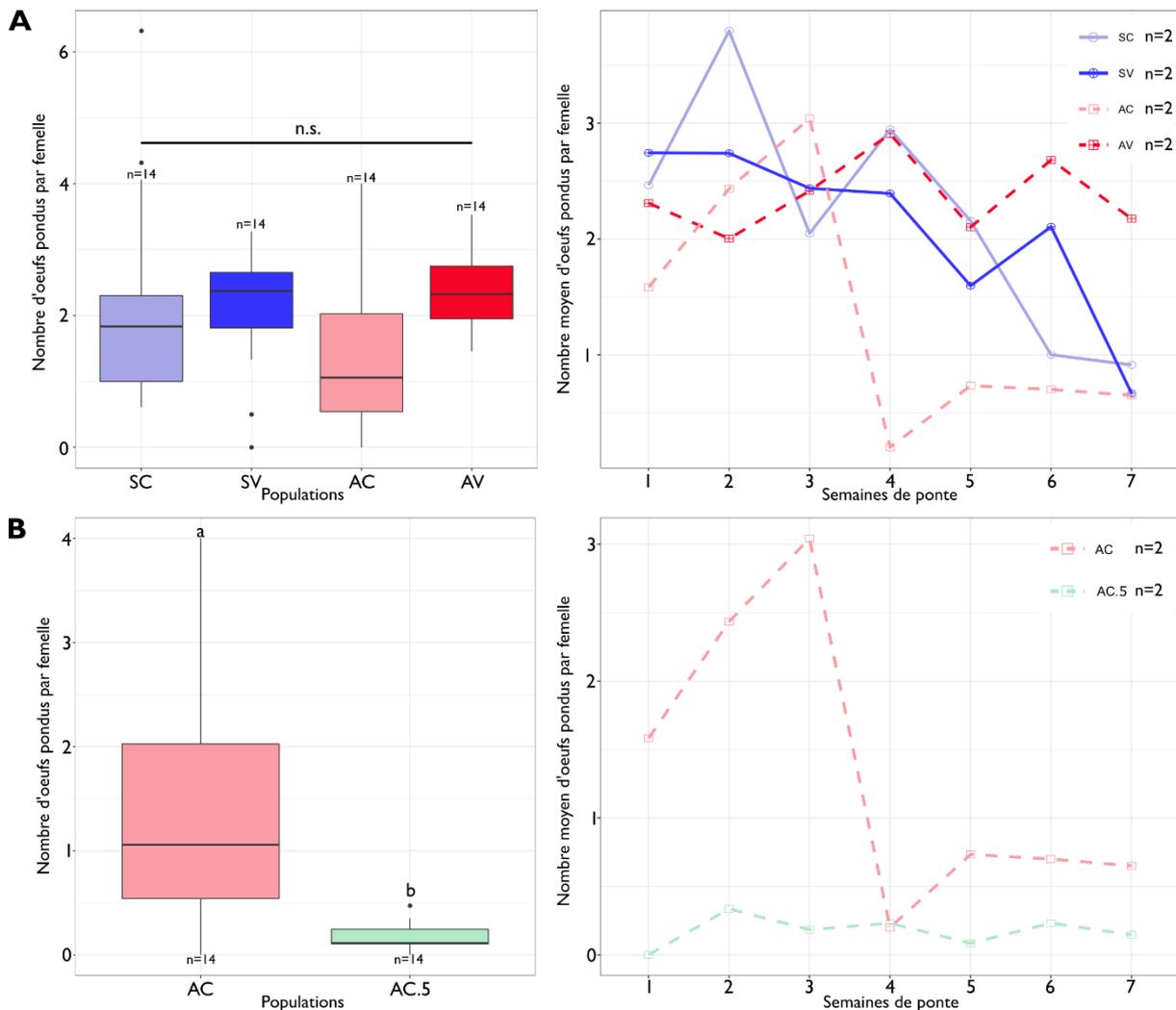


Figure 19. Effets de *wCle* et de la supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus. **A.** À gauche, nombre moyen d'œufs pondus par femelle et par semaine (suivi pendant 7 semaines) pour les populations SC (*wCle*+Vit-), SV (*wCle*+Vit+), AC (*wCle*-Vit-), AV (*wCle*-Vit+). À droite, nombre moyen d'œufs pondus chaque semaine pendant 7 semaines. Chaque point représente le nombre moyen d'œufs pondus pendant la semaine qui précède l'observation. **B.** À gauche, nombre moyen d'œufs pondus par femelle pendant 7 semaines pour les populations AC, AC.5. Les groupes qui ne partagent pas les mêmes lettres sont statistiquement différents (test de Tukey, $p < 0.05$). À droite, nombre moyen d'œufs pondus chaque semaine pendant 7 semaines. Chaque point représente le nombre moyen d'œufs pondus pendant la semaine qui précède l'observation.

Aussi, afin de déterminer si le moment d'interruption de la supplémentation vitaminique a un effet sur la fécondité des femelles aposymbiotiques, nous avons compté le nombre d'œufs pondus par femelle (2x20 femelle pour la condition initiale de AC et 10 et 20 femelles pour la condition initiale de AC.5) sur 7 semaines chez des punaises aposymbiotiques pour lesquelles le repas sanguin ayant précédé la mue imaginale était supplémenté ou non en vitamines. Nous avons observé une diminution significative du nombre d'œufs pondus lorsque l'interruption de la supplémentation en vitamines avait eu lieu lors du dernier repas avant la mue imaginale (AC.5), mais pas lorsque celle-ci avait eu lieu lors du dernier repas après la mue imaginale (AC) (Figure 19B, Tableau S2).

Ainsi, le régime n'affecte pas le nombre d'œufs pondus mais le moment de l'interruption de la supplémentation vitaminique l'affecte chez les aposymbiotiques qui ne prennent pas de repas supplémentés en vitamines.

b. Effet de la supplémentation sur le taux d'éclosion des aposymbiotiques

Afin de déterminer si la perte de wC_{le} entraîne une diminution de l'éclosion et si la supplémentation vitaminique permet de restaurer ce taux d'éclosion, nous avons estimé le pourcentage de stades I émergés au bout d'une semaine par rapport au nombre d'œufs pondus (Figure 20A). Globalement, l'interaction entre le statut symbiotique et la supplémentation en vitamines impacte significativement le taux d'éclosion (Tableau S3). Les individus aposymbiotiques non supplémentés éclosent significativement moins que ceux supplémentés en vitamines B.

Enfin, bien que l'on observe une baisse du taux d'éclosion à partir de la 4^e semaine chez les populations aposymbiotiques non supplémentées en vitamines, le faible effectif statistique nous empêche de tester correctement cette dynamique (Figure 20B).

c. Effet de la symbiose sur l'émergence

Afin de déterminer si la perte de wC_{le} entraîne un ralentissement du développement et si la supplémentation vitaminique permet de restaurer ce développement, nous avons compté le pourcentage de nymphes muant chaque semaine. Nous n'avons pas observé de différence de la dynamique de développement entre les quatre populations SC, SV, AC et AV (Figure 21A), mais ces observations ont été réalisées sur un effectif faible, du fait d'un délai de développement et/ou d'une mortalité accrue au début du développement nymphal dans toutes les conditions expérimentales.

Enfin nous avons compté le nombre d'adultes émergeant pour chaque population ($n = 6$ pour chaque population). Des émergences ont été observées seulement dans les populations symbiotiques SC et SV (Figure 21B). Cette différence liée à l'effet de la symbiose est significative (Tableau S4).

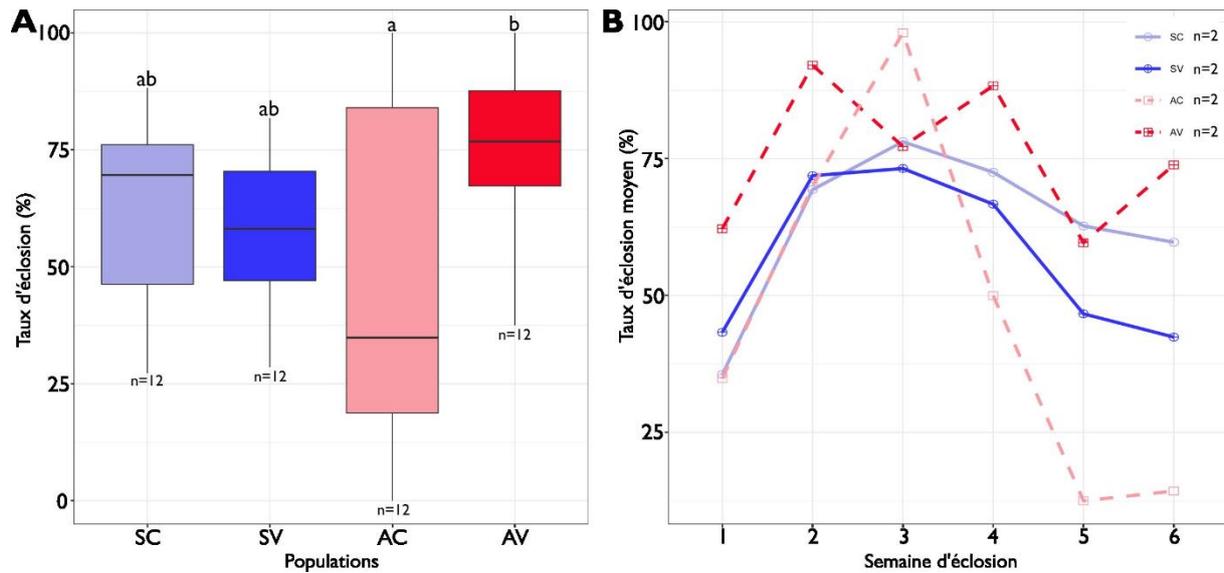


Figure 20. Effets de *wCle* et de la supplémentation vitaminique sur le taux d'éclosion des œufs pour les populations SC (*wCle*+Vit-), SV (*wCle*+Vit+), AC (*wCle*-Vit-) et AV (*wCle*-Vit+). **A.** Pourcentage d'éclosion des œufs pondus pendant 6 semaines. Les groupes qui ne partagent pas les mêmes lettres sont statistiquement différents (test de Tukey, $p < 0.05$). **B.** Taux d'éclosion moyen des œufs par semaine pendant 6 semaines. Chaque point représente le nombre moyen d'œufs éclos pendant la semaine qui précède l'observation.

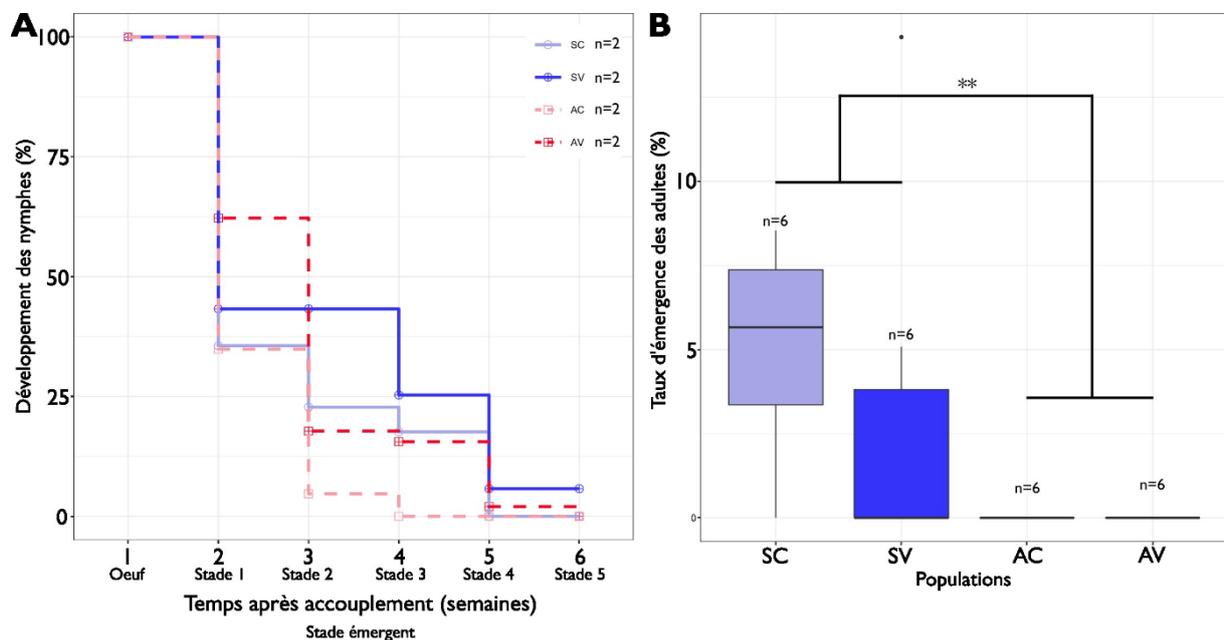


Figure 21. Effets de *wCle* et de la supplémentation vitaminique sur le développement des nymphes des populations SC (*wCle*+Vit-), SV (*wCle*+Vit+), AC (*wCle*-Vit-) et AV (*wCle*-Vit+). **A.** Pourcentage moyen de nymphe émergée au cours de chaque semaine par rapport au nombre d'œufs pondus initialement. Les punaises qui n'ont pas mué pendant la semaine sont considérées comme mortes. **B.** Pourcentage moyen d'adultes émergés 17 semaines après l'accouplement des parents par rapport au nombre d'œufs pondus initialement. Les groupes statistiquement différents sont désignés par des astérisques (test de Tukey, $p < 0.05$).

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons décrit comment la symbiose et la supplémentation en vitamines affectaient la biologie de la souche de punaise de lit F4. Trois points sont à retenir de cette étude. Premièrement, le nombre d'œufs pondus est légèrement réduit chez les femelles aposymbiotiques, mais uniquement lorsque l'arrêt de la supplémentation en vitamines survient avant la mue imaginale. Le taux d'éclosion semble quant à lui affecté par la perte de la symbiose et de la supplémentation en vitamines lorsque cet arrêt survient après la mue imaginale. Seuls les individus symbiotiques ont produit des descendants viables dans les conditions expérimentales testées.

Les résultats de cette étude sont surprenants car ils ne correspondent pas entièrement aux observations des études de 2010 et de 2022 (Hosokawa *et al.*, 2010; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). L'explication principale est que nos conditions d'expérience se sont avérées non optimales, étant donné que nous avons observé des temps de générations rallongés et un pourcentage de développement limité, même dans les conditions symbiotiques. Le fait d'individualiser les individus pour les suivis limite probablement l'humidité et impacte la survie et la reproduction des punaises de lit. Bien que nous comptions reproduire le protocole de Hickin *et al.* 2010, ce défaut de développement nous a conduit à modifier notre protocole, et les mesures réalisées ont été réduites à des effectifs très faibles qui limitent leur analyse. Une optimisation du protocole de mesure des traits d'histoire de vie en conditions contrôlées est donc à réaliser. Nous ne pouvons cependant pas complètement exclure d'autres explications pour expliquer ces différences. Les souches et les conditions d'élevages sont différentes entre chaque étude, ce qui rend compliqué les comparaisons. Les différences des conditions d'élevages entre les souches JESC (25°C, Figure 16A), HH (27°C, 45% HR, Figure 16B) et F4 (26°C, 60% HR, Figure 18) utilisées dans les études de Hosokawa *et al.*, Hickin *et al.* et celle-ci respectivement, peuvent affecter la dynamique des populations (e.g. des températures élevées diminuent la durée d'éclosion et de la phase nymphale) (Janisch, 1932; Johnson, 1941). Cependant, les changements de conditions d'élevage de la souche F4 entre notre étude (24°C, 60% HR) et celle de Thongprem *et al.* 2020 (26°C, 70% HR) ne semblent pas affecter le nombre d'œufs fertiles pondus par une population d'une vingtaine de couple (Thongprem *et al.*, 2020). Des différences de dynamique entre souches seraient donc plus probables. Enfin, dans cette étude du sang humain est utilisé, là où Hosokawa *et al.* et Hickin *et al.* utilisent du sang de lapin. L'origine du sang fourni aux punaises peut aussi affecter leur biologie. Par exemple, les femelles pondent plus d'œufs et les nymphes résultantes se développent plus rapidement lorsqu'elles se nourrissent sur du sang de souris, plutôt que sur du sang humain (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007).

Malgré ses limites, cette étude permet de soulever quelques points intéressants. Chez les femelles aposymbiotiques, lorsque la supplémentation en vitamine est arrêtée avant le dernier repas entraînant la mue imaginale, le nombre d'œufs pondus est fortement réduit par rapport aux femelles qui réalisent leur mue imaginale avec un repas sanguin supplémenté en vitamines. Ce résultat suggère que l'apport en vitamines avant la mue imaginale est important pour la fécondité. Nous proposons deux hypothèses pour expliquer l'importance sur la fécondité d'une supplémentation après la mue imaginale : soit les femelles ont de faibles réserves de vitamines qui sont épuisées lors de leurs développement imaginal alors qu'elles en ont besoin pour produire et pondre les œufs, soit la supplémentation en vitamines est nécessaire au développement d'organes reproducteurs fonctionnels après la mue imaginale. Un moyen de vérifier cette dernière hypothèse serait de faire reprendre un repas supplémenté en vitamines à des femelles ayant été privées de supplémentation avant leur mue imaginale et comparer avec la fécondité des femelles n'ayant pas interrompu la supplémentation avant la mue imaginale. Une restauration de la fécondité suggèrera une problématique de stockage, quand un maintien de la perte de fécondité suggèrera une problématique de développement des ovaires. Nous pourrions aussi observer si une différence morphologique existe entre des ovaires de femelles incluant ou non la supplémentation jusqu'à la mue imaginale. L'hypothèse du stockage fait sens, les insectes ayant généralement une faible capacité de stockage des vitamines B (Douglas, 2017), quand l'hypothèse de points de contrôles ovogénétiques médiés par les vitamines B n'a, à notre connaissance, pas encore été observé chez les insectes. Les observations quant à la dynamique de ponte et d'éclosion tendent à montrer une tendance à la baisse après trois semaines imaginale chez les femelles aposymbiotiques pour lesquelles la supplémentation a été suspendue après la mue imaginale. Si ces résultats venaient à être confirmés sur plus de réplica, ceci suggèrerait que le stock de vitamines s'épuise rapidement chez les femelles aposymbiotiques et que ceci affecte négativement leur ponte dans les semaines après l'arrêt de la complémentation.

Enfin, l'absence de restauration du phénotype symbiotique chez les femelles aposymbiotiques complémentées en vitamines B peut paraître *a priori* très surprenant, mais ne reflète que cette expérience (et ses conditions d'élevage particulières), car nous réussissons à maintenir des lignées aposymbiotiques complémentées en vitamines B en élevage sur plus de 10 générations. Ces lignées dans lesquelles l'absence de *Wolbachia* a été confirmée régulièrement par PCR quantitative seront utilisées dans les études présentées dans la suite de cette thèse.

Figures supplémentaires

Tableau S1. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus par femelle.

anova_test(Eggsrel ~ Vitamins*Symbiotic)					
Effect	DFn	DFd	F	p	ges
Vitamins	1	52	2.420	0.126	0.044
Symbiotic	1	52	0.916	0.343	0.017
Vitamins:Symbiotic	1	52	3.447	0.069	0.062

Tableau S2. Statistiques des effets globaux du facteur d'interruption de la supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs pondus par femelle.

anova_test(Eggsrel ~ Int)								
Effect	DFn	DFd	F	p	ges			
Int	1	26	14.693	7.21e-4	0.361			
tukey_hsd(Eggsrel ~ Int)								
term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
<chr>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>
Int	AC.A	AC.5	0	-1.16	-1.78	-0.538	7.21e-4	***

Tableau S3. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le nombre d'œufs éclos.

anova_test(St1rel ~ Vitamins*Symbiotic)								
Effect	DFn	DFd	F	p	ges			
Vitamins	1	44	2.454	0.124	0.053000			
Symbiotic	1	44	0.015	0.904	0.000335			
Vitamins:Symbiotic	1	44	5.406	0.025*	0.109000			
tukey_hsd(St1rel ~ Vitamins*Symbiotic)								
term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
<chr>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>
Vitamins	no	yes	0	11.7	-3.34	26.7	0.124	ns
Symbiotic	no	yes	0	-0.904	-15.9	14.1	0.904	ns
Vitamins:Symbiotic	no:no	yes:no	0	29.0	0.860	57.1	0.0412	*
Vitamins:Symbiotic	no:no	no:yes	0	16.4	-11.7	44.5	0.413	ns
Vitamins:Symbiotic	no:no	yes:yes	0	10.8	-17.4	38.9	0.738	ns
Vitamins:Symbiotic	yes:no	no:yes	0	-12.6	-40.7	15.5	0.634	ns
Vitamins:Symbiotic	yes:no	yes:yes	0	-18.2	-46.3	9.90	0.321	ns
Vitamins:Symbiotic	no:yes	yes:yes	0	-5.65	-33.8	22.5	0.95	ns

Tableau S4. Statistiques des effets globaux et des interactions des facteurs de symbiose et de supplémentation vitaminique sur le taux d'émergence des adultes.

anova_test(EmergenceA ~ Vitamins*Symbiotic)								
Effect	DFn	DFd	F	p	ges			
Vitamins	1	20	0.461	0.505	0.023			
Symbiotic	1	20	9.408	0.006*	0.320			
Vitamins:Symbiotic	1	20	0.461	0.505	0.023			
tukey_hsd(EmergenceA ~ Vitamins*Symbiotic)								
term	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
<chr>	<chr>	<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<dbl>	<chr>
Vitamins	no	yes	0	-0,918	-3.74	1.90	0.505	ns
Symbiotic	no	yes	0	4,15	1.33	6.97	0.00608	**
Vitamins:Symbiotic	no:no	yes:no	0	-1,67e-15	-5.35	5.35	1	ns
Vitamins:Symbiotic	no:no	no:yes	0	5,07	-0.286	10.4	0.0676	ns
Vitamins:Symbiotic	no:no	yes:yes	0	3,23	-2.12	8.58	0.355	ns
Vitamins:Symbiotic	yes:no	no:yes	0	5,07	-0.286	10.4	0.0676	ns
Vitamins:Symbiotic	yes:no	yes:yes	0	3,23	-2.12	8.58	0.355	ns
Vitamins:Symbiotic	no:yes	yes:yes	0	-1,84	-7.19	3.51	0.773	ns

Conclusion de l'étude et perspectives

En conclusion, cette étude a permis de répondre à un questionnement soulevé dans d'autres études quant à l'importance de la levée de la supplémentation vitaminique chez les punaise aposymbiotiques (Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). Nous supposons donc que les réserves de vitamines B étant faibles, cette supplémentation vitaminique est nécessaire et pleinement consommée avant la mue imaginale, rendant infécondes les femelles émergées.

Cette étude a aussi permis, de mieux appréhender la gestion de nos élevages. Ainsi, il apparaît que les taux de pontes dans nos élevages sont en moyenne 5 fois plus faibles que dans les élevages de Hosokawa *et al.* 2010 et Hickin *et al.* 2022. Aussi, nous avons observé une perte d'effectif d'en moyenne 30% entre chaque mue. Alors que les faibles taux de pontes correspondent aux résultats de suivi obtenus dans l'étude de Thongprem *et al.* 2020 travaillant sur la même souche, les fortes pertes d'effectifs lors de l'application du protocole sont quant à elles améliorables puisque les populations arrivent à être maintenue en élevage. Une piste pourrait être lié la densité ou de ratio au sein des population des populations. Les populations de suivi sont générées sur des effectifs faibles de moins d'une centaine d'individus du même stade. Augmenter la diversité des individus dans les lignées de suivi ainsi que leur nombre irait dans le sens de la biologie naturelle de la *C. lectularius* (Saenz *et al.*, 2014; Balvín, Chajma and Naylor, 2019) et permettrait le maintien des lignées expérimentales.



Dynamique de la quantité de *wC*le chez *C. lectularius*

Sommaire

Contexte de l'étude	60
Development, feeding, and sex shape the relative quantity of the nutritional obligatory symbiont <i>Wolbachia</i> in bed bugs	61
1. Abstract	62
2. Introduction	62
3. Materials and methods	63
4. Results	68
5. Discussion	73
6. Supplementary Material	76
Conclusion de l'étude et perspectives	84



Cette étude comprend un article prochainement soumis dans un journal.
L'article est rédigé dans la langue de sa soumission, l'anglais.

Contexte de l'étude

La dynamique de l'interaction entre *wCle* et la punaise de lit a été décrite partiellement dans une étude réalisée en 2018 par Fisher *et al.* (Fisher *et al.*, 2018). Cette étude indique que la densité augmente entre le début et la fin de la phase nymphale, et diminue en absence de repas sanguin chez la femelle adulte (Figure 22). Une complétion de cette étude est nécessaire à la compréhension de la dynamique de l'interaction afin d'y identifier des étapes critiques qui pourront ensuite être étudiées afin de définir les mécanismes actifs du maintien ou de la perturbation de la symbiose. Nous avons mis en place une analyse plus complète de la dynamique de la charge en *wCle* incluant tous les stades nymphaux, mais également des mâles et des femelles régulièrement nourries ou à jeun.

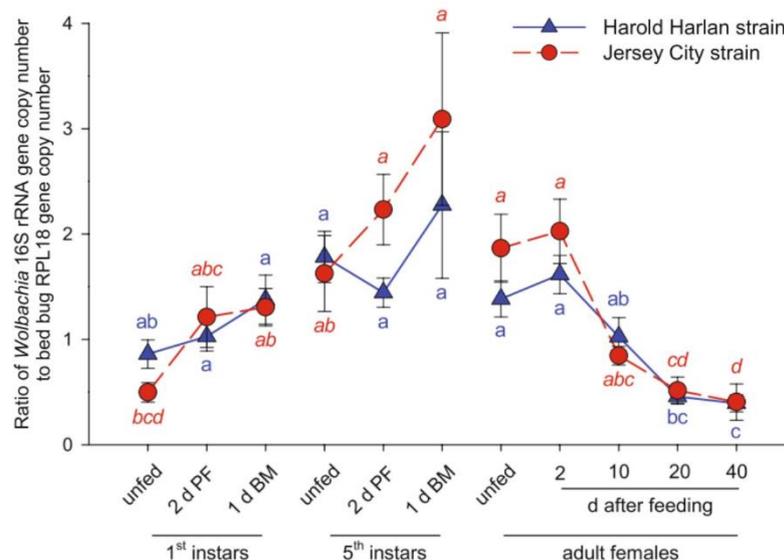


Figure 22. Dynamique de la quantité du gène de référence *wCle* 16S par rapport à l'ADN de *C. lectularius* chez les souches Harold Harlan (HH) et Jersey City (JC). Pour les deux stades nymphaux, les nymphes nouvellement émergées (unfed), 2 jours après la prise de repas (2 d PF) et 1 jour avant la mue (1 d BM) sont représentées. Pour les femelles adultes, les jours après la prise de repas sont indiqués. Chaque moyenne \pm ES représente $n = 7-9$ punaises. Les moyennes ne partageant la même lettre et la même couleur sont significativement différentes ($p < 0,05$) au sein de chaque souche.

Dans ce travail, notre premier objectif était de quantifier avec précision *wCle* au cours du cycle de vie de son hôte, et de décrire les changements morphologiques potentiels associés dans les bactériomes. Notre deuxième objectif était de déterminer l'impact du statut alimentaire et du sexe sur la dynamique bactérienne. Nos résultats mettent en évidence que la quantité relative de *wCle* augmente exponentiellement au cours du développement des punaises de lit, tandis que *wCle* reste localisée dans les bactériomes dont la taille relative reste stable. Nous montrons également que la densité de *wCle* diminue légèrement chez les adultes, sauf chez les mâles nourris une fois par semaine. Ces résultats identifient l'ingestion de sang chez la nymphe, son développement, le passage au stade adulte et le sexe des adultes comme étant des étapes critiques dans la dynamique de l'interaction.

Development, feeding, and sex shape the relative quantity of the nutritional obligatory symbiont *Wolbachia* in bed bugs

Marius Poulain^{1,2,3*}, Elodie Rosinski¹, Hélène Henri¹, Séverine Balmand⁴, Marie-Laure Delignette-Muller¹, Abdelaziz Heddi², Romain Lasseur³, Fabrice Vavre¹, Anna Zaidman-R emy^{2,5*}, Natacha Kremer^{1*}

¹ Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgroSup, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558, 69622 Villeurbanne, France

² Univ Lyon, INSA-Lyon, INRAE, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France

³ Izinovation SAS, 69006 Lyon, France

⁴ Univ Lyon, INRAE, INSA-Lyon, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France

⁵ Institut Universitaire de France, 75231 Paris, France

* Correspondence:

Marius Poulain

marius.poulain@univ-lyon1.fr

Anna Zaidman-Rémy

anna.zaidman@insa-lyon.fr

Natacha Kremer

natacha.kremer@univ-lyon1.fr

Keywords: *Cimex lectularius*, *Wolbachia*, nutritional symbiosis, bacterial growth dynamics, development, bacteriome.

Author contributions: N. Kremer, A. Zaidman-Rémy, and F. Vavre, conceived the study with the help of A. Heddi and R. Lasseur; E. Rosinski and M. Poulain bred the bed bugs; H. Henri and M. Poulain performed the qPCR experimentation; S. Balmand and M. Poulain performed microscopic analyses; M.-L. Delignette-Muller, N. Kremer and M. Poulain performed statistical analyses and representation of the outputs. M. Poulain, N. Kremer, A. Zaidman-Rémy and F. Vavre wrote the article. All authors read the article.

Funding: This work was funded by the CIFRE contract n o2019/1626, the Pack Ambition Recherche Rhone-Alpes SymBed (20 009583 01), the ANR PRC FBI (ANR-21-CE35-0011), the Scientific Breakthrough Project Micro-be-have (Microbial impact on insect behavior) of Université de Lyon, within the program ‘Investissements d’Avenir’ (ANR-11-IDEX-0007; ANR-16-IDEX-0005) and the Institut Universitaire de France (A. Zaidman-Rémy, junior member).

Acknowledgement: We thank Oliver Otti for providing us bed bugs. We thank the Symbiotron platform from the FR3728 BioEEnViS (and especially Angelo Jacquet) and the Equipex+ InfectioTron (ANR-21-ESRE-0023) for facilities and equipment for rearing and experimentation on bedbugs. TEM imaging was performed at Centre Technologique des Microstructures EZUS LYON - Université Claude Bernard Lyon1 (CT mu), and we more specifically thank Lucie Geay for realizing the ultra-thin sectioning of the tissues for TEM. I thank the members of my thesis comity, Olivier Duron, Delphine Destoumieux-Garzon and François Leulier for fruitful discussions.

1. Abstract

The common bed bug, *Cimex lectularius*, is a hemipteran insect that feeds only on blood, and whose bites cause public health issues. Due to globalization and resistance to insecticides, this pest has undergone a significant and global resurgence in the number of infestations in recent decades. Blood is an unbalanced diet, lacking notably B vitamins. Like all strict hematophagous arthropods, bed bugs host a nutritional symbiont supplying B vitamins. In *C. lectularius*, this nutritional symbiont is the intracellular bacterium *Wolbachia* (*wCle*). It is located in specific symbiotic organs, the bacteriomes, as well as in ovaries. Experimental depletion of *wCle* cause longer nymphal development and low fecundity, which phenotypes are rescued following supplementation with B vitamins. Understanding the interaction between *wCle* and the bed bug may help to develop new pest control methods targeting the disruption of this symbiotic interaction. The objective of this work was to quantify accurately *wCle* over the life cycle of the host, and to describe potential associated morphological changes in the bacteriome. We also determined the impact of sex, feeding status, and adult ageing on the bacterial population dynamics. We showed that the relative quantity of *wCle* continuously increases during the bed bug development, while the relative size of the bacteriome remains stable. We also showed that adult females harbor more *wCle* than males, and that *wCle* density decreases slightly in adults with age, except in weekly-fed males. These results help defining critical points of the symbiotic interaction during the bed bug's life cycle.

2. Introduction

Bed bugs have undergone a major and worldwide resurgence in the number of infestations during the last decades due to globalization (Štefka *et al.*, 2022), urbanization, (Hwang *et al.*, 2005; Booth *et al.*, 2012; Hasnaoui *et al.*, 2023) and selection of insecticide resistance (Zhu *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2017). Bed bugs are mainly found in habitats associated with humans (Parola and Izri, 2020): individual houses, collective housing, those linked to tourism (hotels, seasonal rentals) or health (hospitals, retirement homes), but also locations associated with culture (e.g. cinema) or transportation (e.g. trains). Bites lead to itchy lesions and rashes, and infestations cause sleep disturbances, psychological distress, and stigma (Doggett *et al.*, 2012). Thus, bed bugs are a growing health and socio-economic burden and new control methods, alternative to the use of insecticides, need to be considered to control their populations.

The common bed bug, *Cimex lectularius*, is a strict hematophagous pest insect. These hemimetabolous insects undergo five nymphal stages before the final molt in adult. Each instar requires a blood meal to proceed to the molting in one week and both sexes bite at the adult stage. Like other strict hematophagous or insects living on nutritionally unbalanced diet (Janson *et al.*, 2008; Rio, Attardo and Weiss, 2017; Duron and Gottlieb, 2020), bed bugs have evolved a long-term association with endosymbionts providing essential nutrients that lack in their diet, and notably B vitamins. As far as known, *C. lectularius* microbiota is composed of one to three endosymbionts, one of them being an obligate nutritional symbiont. The obligate endosymbiont

is *Wolbachia* (*w*Cle) (Sakamoto and Rasgon, 2006) and provides two essential B vitamins (*i.e.*, biotin and riboflavin) (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). The experimental depletion of *w*Cle results in a decrease in the number of laid eggs, a decrease in hatching rate, an increase in nymphal development, and a smaller adult size (Chang, 1974; Hosokawa *et al.*, 2010; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). The two facultative endosymbionts are a γ -proteobacterial endosymbiont (Hypša and Aksoy, 1997; Hosokawa *et al.*, 2010) of the Symbiopectobacterium family, known as BEV-like, for “Bacterial symbiont of *Euscelidius variegatus*” (Degnan *et al.*, 2011; Nadal-Jimenez *et al.*, 2022) and a torix *Rickettsia* (Potts *et al.*, 2020; Thongprem *et al.*, 2020; Pilgrim *et al.*, 2021). Little is known about these facultative endosymbionts, but their effect on fitness appears limited (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). All three endosymbionts are present in the ovaries, which ensure their vertical transmission through eggs (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). Endosymbionts are also observed in specialized host cells called the bacteriocytes. These cells form oblong shaped organs, the bacteriomes, which are localized on the left and right side of the insect, between the 4th and 5th abdominal tergites (Hertig and Wolbach, 1924; Chang and Musgrave, 1973; Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020).

Disruption of the nutritional symbiosis could thus be a promising control method, for instance by inducing a break-down in symbiosis or a stop in metabolic supplementation. To develop such a control strategy and develop symbiocides (*i.e.*, killing symbionts or disrupting the association), it is essential to understand the dynamics of *w*Cle throughout the insect development, and as a function of sex and feeding. Previous studies have reported the presence of *w*Cle in the eggs, the 1st instars, and the adults of both sexes (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). *w*Cle relative quantity was shown to be higher in the 5th instar stage than in the 1st nymphal stage and to decrease in adult females starved for at least 21 days (Fisher *et al.*, 2018), raising the question of the impact of development and natural ageing (independent of starvation), but also of the dynamics of *w*Cle in males. Here, we thus present a detailed characterization of the interaction between *C. lectularius* and its nutritional obligatory endosymbiont *w*Cle using cohorts. We describe the dynamics of *w*Cle load in *C. lectularius*, and the effect of feeding, at all nymphal stages. We also document the development of the bacteriome during nymphal development. Finally, we quantify the evolution of the relative quantity of *w*Cle after adult emergence, and specifically test the impacts of sex, ageing and starvation on the relative quantity of *w*Cle in adults.

3. Materials and methods

a. Insects, feeding and rearing

The “F4” strain of *C. lectularius* was sampled in London (UK) in 2008 (Thongprem *et al.*, 2020). Isofemale lines were created immediately after sampling and were reared on human blood in Oliver Otti’s lab (Dresden, Germany) until 2021. For our experiments, we used three of these isofemale lines, kindly provided by O. Otti: F4-V1, F4-V6 and F4-V48. These lines

were confirmed by PCR to be negative for torix *Rickettsia* and are positive for BEV-like. We fed bed bugs on the Hemotek® system with human blood (blood group: O/A with 170 IU Heparin/Sodium; membrane: parafilm®) provided by the *Etablissement Français du Sang* (EFS), and heated at 36.5 ± 0.5 °C. Colonies were maintained in round plastic jars containing corrugated cardboard harborage shelters (41 mm x 30 mm), at 24 °C, 60% relative humidity, and with a photoperiod of 12L:12D.

b. Cohort generation and sampling for bacterial dynamics in nymphs

Couples from either F4-V1, F4-V6 and F4-V48 lines were fed weekly on 1 mL of human blood for 30 minutes. The cohorts were generated as follows: fed couples were isolated in 24-well plates to mate and oviposit for 5 days, then males were removed. After two weeks, females were removed, and nymphs were gathered in round plastic jars containing corrugated cardboard harborage shelters. For each cohort and each nymphal stage, unfed (UF) nymphs (1 to 3 nymphs per cohort) were sampled from the first nymphs hatched (#1 in Fig. S1) and the remaining nymphs were fed. Nymphs that did not feed were discarded. Sampling was completed at each nymphal stage by collecting nymphs one-day post-feeding (1DPF, #2 in Fig. S1), and five-days post-feeding (5DPF, #3 in Fig. S1). Molting to the next instar occurred one week after the last meal; nymphs that did not molt were discarded, and samplings were performed (UF, 1DPF, 5DPF) as described previously for the following stages (2nd, 3rd, 4th, and 5th instar). Bed bugs were frozen immediately after collection and kept at -20 °C until DNA extraction. A total of 168 nymphs were sampled, originating from 6 cohorts (1 F4-V1, 2 F4-V6 and 3 F4-V48).

c. Cohort generation and sampling for bacterial dynamics in adults

Nymphs at the 5th instar were taken from either F4-V1, F4-V6 and F4-V48 lines and were fed on 1 mL of human blood for 30 minutes. To quantify *Wolbachia* density over the nymph-to-adult transition, 5DPF fifth instars were sampled for both sexes, the sex being determined at that stage by a combination of approaches described in Langer, Froschauer and Reinhardt (2020) (Langer, Froschauer and Reinhardt, 2020). One week after the 5th instar feeding, residual nymphs were discarded.

To determine the effect of sex, feeding, and ageing on *Wolbachia* density, 1DPF male and female adults were sampled, and populations were divided equally in two round plastic jars. One jar was fed weekly (condition: weekly feeding), while the other one was not fed (condition: starvation after feeding at day 1). Each week, for four weeks, males and females of both jars were sampled at the date corresponding to 1DPF for the fed population (Fig. S2). Bed bugs were frozen immediately after collection and kept at -20°C until DNA extraction. A total of 146 fifth instars and adults were sampled, originating from 6 cohorts (1 F4-V1, 2 F4-V6 and 3 F4-V48).

d. DNA extraction

DNA was extracted using the MACHEREY-NAGEL NucleoSpin® 96 Tissue kit, following the protocol for genomic DNA from tissue, except for small individuals (*i.e.*, from 1st to 3rd instar). Small instar samples were placed in 0.2 mL tubes with three 1.5-mm stainless steel beads while large instar samples were placed in 2 mL tubes with one 5-mm diameter bead. All samples were left for 15 minutes at -80 °C before being ground with a Tissue Lyzer (Retsch, Qiagen) for 2 min at 20 Hz. The following steps of the protocol followed the supplier's recommendations, except for the small individuals. Indeed, for small individuals, the volume of lysis and wash buffers was divided by 3 compared to the recommendations and compared to the samples considered as large (*i.e.*, from the 4th nymphal stage to the adult stage). For all samples, pre-lysis was carried out for 2 h at 56 °C, washes were performed under vacuum, while elution was performed by centrifugation at 5600 g for 2 min with 100 µL of elution buffer. Eluted DNA was stored at -20 °C until qPCR quantification.

e. Presence/absence of symbionts using PCR amplification

Conventional PCR was used to verify the presence/absence of symbionts. The *w*Cle 16S rRNA gene (INT2F, INT2R; 136 bp (Sakamoto and Rasgon, 2006)), the *γ*-*protobacteria* 16S rRNA gene (BEV_F, BEV_R; 420 bp (Hosokawa *et al.*, 2010)), the torix *Rickettsia gltA* gene (RiGltA405_F, RiGltA1193_R; 786 bp (Pilgrim *et al.*, 2017)), and the *C. lectularius* ribosomal protein (RPL18) gene (RPL18F, RPL18R; 137 bp (Fisher *et al.*, 2018)) were PCR-amplified as follows on a subset of unfed 5th instars (n = 10). A 25-µL reaction containing 2.5 µL 10X DreamTaq® Green Buffer, 0.5 µL of dNTP (10 µM), 0.1 µL of DreamTaq® DNA Polymerase (5U/µL), 0.5 µL of each primer set (10 µM) (primer sequences in Tab. S1), and 2 µL of template DNA previously diluted to 1/20 was prepared. All PCR reactions were performed in a Bio-Rad C1000 Touch™ thermal cycler with the following program: an initial denaturation step at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, T_m °C for 30 s and 72°C for 1 min. A final extension step of 72°C for 5 min was included. To visualize the amplicons, 5 µL of the PCR products migrated at 100 mV for 25 min (TBE 0.5X, 1% agarose, 0.5% BIOTIUM GelRed® Nucleic Acid Gel Stain).

f. *Wolbachia* quantification using Real-time PCR

A real-time quantitative PCR (qPCR) duplex assay targeting the *w*Cle-*I6S* rDNA and bed bug *RPL18* gene was used to obtain relative quantification of *w*Cle in each bed bug with a 10-µL reaction mix containing 5 µL SsoAdvanced™ Universal Probe Supermix (Bio-Rad), 500 nM of each forward and reverse primer, 300 nM of each probe and 2 µL of extracted DNA previously diluted to 1/20. We used primers and probes previously described (Tab. S1). The probes were provided by IDT DNA Technologies and included two quenchers, Iowa Black® at the 3' end, and another internal quencher called ZEN™. Each probe also had a specific fluorophore at the 5' end, FAM for *w*Cle, and HEX for the RPL18 gene of *C. lectularius*. Real-time qPCR was performed in QuantStudio 6 Flex™ (Applied Biosystems) with the following

program: an initial denaturation step at 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. The qPCR assay efficiency (primer efficiency in Tab. S1) was determined and confirmed in every run by constructing a standard curve using serial dilutions of a purified and quantified amplicon of each target. In addition, the specificity and absence of inhibitors in the samples were assessed upstream using dilutions of DNA extracts produced under the same conditions.

g. Statistical analysis of the relative quantity of Wolbachia

The relative quantity (RQ) of *Wolbachia* within the insect was calculated based on equation 1 of Michael Pfaffl (Pfaffl, 2001). E_{target} is the PCR efficiency measured for the *wCle* gene amplification, while E_{ref} is the PCR efficiency measured for the insect gene.

$$RQ = \frac{E_{ref}^{Cq_{ref}}}{E_{target}^{Cq_{target}}}$$

Each measurement was made in duplicate. Values for which the delta of Cq between replicates was greater than 0.5 cycles were discarded as well as the values of Cq higher than 35 cycles (*wCle*-16S: 7.14% (n = 12), RPL18: 5.36% (n = 9; 8 in common with *wCle*-16S)). Most of these discarded samples were young nymphal stages (71.42% are 1st instars).

We used the R software (version 4.1.0) for all analyses and plots (R Core Team, 2023).

To test the effect of different factors (*i.e.*, development, feeding, sex) and their interactions on relative *wCle* quantities, we analyzed \log_{10} -transformed data using a Linear Mixed Effect Model (LMER) with the lme4 R package (Bates *et al.*, 2015). For “nymphal” samples, we tested the following model: $\text{lmer}(\log_{10}(RQ) \sim \text{Age_N} + \text{Feeding_State} + \text{Age_N}:\text{Feeding_State} + (1|\text{Cohort}))$, where *Age_N* is a quantitative factor associated to nymphal development (weeks), *Feeding_State* is a qualitative factor associated to blood feeding status (UF/1DPF/5DPF), and *Cohort* is a random effect linked to replicate sampling (A to F). Unfed (UF) 1st instars are considered as references in the models.

For “adults” samples, we first tested on 5th instars 5DPF and adults 7DPF of both sexes (n = 26) the effect of development (5th stage to adult) on the relative quantity in *wCle* in both sexes, with the following model: $\text{lmer}(\log_{10}(RQ) \sim \text{Age} + \text{Sex} + \text{Sex}:\text{Age} + (1|\text{Cohort}))$, using the 5th instar females as reference. We then tested on adults only the effect of ageing, blood feeding and sex, with the following model: $\text{lmer}(\log_{10}(RQ) \sim \text{Age_A} + \text{Sex} + \text{Feeding}:\text{Age_A} + \text{Sex}:\text{Age_A} + \text{Feeding}:\text{Sex}:\text{Age_A} + (1|\text{Cohort}))$, using the weekly fed-1st week females as reference. *Age* and *Age_A* are quantitative factors associated to development and ageing, respectively, *Sex* is a qualitative factor (female, male), *Feeding* is a qualitative factor associated to blood feeding status (fed, unfed), whose dynamics depends on the ageing/duration of starvation, and *Cohort* is a random effect linked to replicate sampling (G to L).

Normality and homoscedasticity were checked graphically on residuals for each fitted

model. Residuals were also checked for homogeneity of variance. Statistics for global effects of factors and their interactions are reported in supplementary data (Tab. S2, S3). Model coefficients are reported with their confidence intervals (0.95) in figures (Fig. 23B-C, 24B-E). Interaction effects can be interpreted as an additive effect compared with the reference. Because calculating P-values from LMER is complex and subject to controversy, P-values estimated using the lmerTest R package (Kuznetsova, Brockhoff and Christensen, 2017) are only specified in supplementary data (Tab. S2, S3) (Wasserstein *et al.*, 2016; Wasserstein, Schirm and Lazar, 2019).

h. Wolbachia localization using Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

We documented the localization of *wCle* for each nymphal stage after molting (10 nymphs per instar) in the F4-V48 line, using the FISH technique (Thongprem *et al.*, 2020). Tissues were dissected in 1X PBS and preserved immediately in Carnoy solution (chloroform: ethanol: glacial acetic acid = 6:3:1) overnight. All samples were cleared by incubation in 6% H₂O₂ in ethanol for at least 24 hours for 1st and 2nd instars to five weeks (until the body was transparent) for 3rd to 5th instars. We then used a tungsten micro-needle to make micropores in the nymph cuticle to allow the fluorescence probes to diffuse through the cuticle during the hybridization step. The samples were hybridized by incubating the tissues overnight in a hybridization buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.9 M NaCl, 0.01% Sodium dodecyl sulfate 30% formamide) with 10 pmol/mL of rRNA specific probes for *wCle* (Hosokawa *et al.*, 2010) (probe sequences in Tab. S1). After incubation, tissues were washed in buffer (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, 0.01% sodium dodecyl sulfate) and mounted onto a slide using fluoro Gel with DABCO (Electron Microscopy Science) as a mounting medium. Slides were then observed under Leica THUNDER Imager 3D Assay epifluorescence microscope.

i. Evolution of bacteriome size over development

Length of bacteriome and thorax were measured on ImageJ 1.53c (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012) taking the maximum length (L_b) and width (W_b) of both bacteriomes, and the length (L_p) and width (W_p) at the middle of the pronotum. Relative bacteriome sizes were calculated by the ratio between pronotum estimated area ($L_p \times W_p$) and the mean estimated area ($\pi \times (1/2)L_b \times (1/2)W_b$) of both bacteriomes. We used the R software (version 4.1.0) for all analyses and plots (R Core Team, 2023).

To test the effect of the age on the absolute area of the bacteriome, we analyzed data using a Linear Model (LM). We tested the following model: $\text{lm}(\log_{10}(\text{Mean_area_bact}) \sim \text{Stage})$, where Stage is a qualitative factor associated to nymphal development (1st to 5th instar) and Mean_area_bact is the mean of the estimated area of both bacteriomes in a nymph.

To test the effect of the age on the relative area of the bacteriome, we analyzed data using the following model: $\text{lm}(\text{Mean_ratio_area} \sim \text{Stage})$, where Mean_ratio_area is the mean of the

estimated area of both bacteriomes relatively to the estimated area of the thorax in the nymph.

Normality and homoscedasticity were checked graphically on residuals for each fitted model. Residuals were checked for homogeneity of variance. LM statistics were given for global effect of factor. To compare the means of either the area or the relative size of the bacteriome between stages, we performed post-hoc Tukey tests (see the supplementary data for the complete output of each model (Tab. S4)).

j. Characterization of cryofixed bacteriomes using Electro-Microscopy (EM)

We performed the following manipulations at the *Centre Technologique des Microstructures* (CTμ, Université Claude Bernard Lyon 1, France). To avoid losing the samples during the procedure, bacteriomes of 5th instar females were dissected in PBS together with the proximal ovary and the surrounding cuticula. Samples were placed into brass planchettes previously covered with lecithin 10% and 2% osmium tetroxide. Planchettes were directly loaded into the HPM 010 high pressure freezer and fast frozen. After freezing, samples were placed into a Leica EM AFS II Freeze substitution machine and incubated at -90 °C for 30 h in substitution buffer (1% osmium, 0.25% uranyl, 0.5% glutaraldehyde, 1.5% H₂O in acetone) and then gradually heated to -30 °C (+5 °C/hour) and maintained at reached temperature for 24 h. Samples were washed with -30 °C-cold acetone and then gradually heated to 20 °C (+10 °C/h). Samples were placed in 25% epon in acetone for 3 h, 50% epon in acetone for 17 h, 75% epon in acetone for 3 h. Then samples were washed 3 times in epon. Infiltration and embedding in BDMA 1.7% in epon resin were performed at room temperature and incubated 4 days at 60 °C.

Sectioning was performed on an Ultracut E ultramicrotome using a diamond knife (Diatome) and mounted on uncoated copper grids. Ultra-thin sections (100 nm) for Transmission Electro-microscopy (TEM) were observed at 80 keV using a JEOL 1200 electron microscope. Semi-thin sections (200 nm) were observed under Leica THUNDER Imager 3D Assay epifluorescence microscope. Electron micrographs of standard sections were taken with EMMenu 4.0.9.31 software (Tietz) and further analyzed using ImageJ 1.53c.

4. Results

a. The relative quantity of wCle increases exponentially over nymphal development

To analyze the dynamics of the obligatory endosymbiont *wCle* during nymphal development, we measured by qPCR duplex assay the relative quantity of *wCle* in 157 nymphs at different stages of development. *wCle* quantity was below the level of detection in 2.55% of the samples ($n = 4$), which were all 1st instars. We tested the effect of development and feeding status on *wCle* density on the remaining 153 samples, considering the variability observed between cohorts as a random effect in the model (Fig. S3).

The log₁₀-transformed relative quantity of *wCle* linearly increased with age (Fig. 23) with a

slope equal to 0.68 ± 0.06 (*i.e.*, equivalent to an increase by 4.68 of the relative quantity of *wCle* at each nymphal stage); The \log_{10} -transformed absolute quantity of *wCle*, as measured by quantification of its *16S* rDNA, increased ~ 2 times more strongly than that of the bed bug gene *RPL18* genes (Fig. S4). This result confirms an increase of the *wCle* quantity relatively to the number of hosts cells over nymphal development.

The blood feeding status also impacted the relative *wCle* density, with an increase of 0.73 ± 0.23 on \log_{10} -transformed relative quantity (*i.e.*, equivalent to an increase by 5.37 of the relative quantity) between unfed and 5DPF (Days Post Feeding) nymphs. This positive impact of blood feeding on the *wCle* relative quantity dimmed as the nymph was growing (see interaction Age_N*Feeding State 5DPF Fig. 23B).

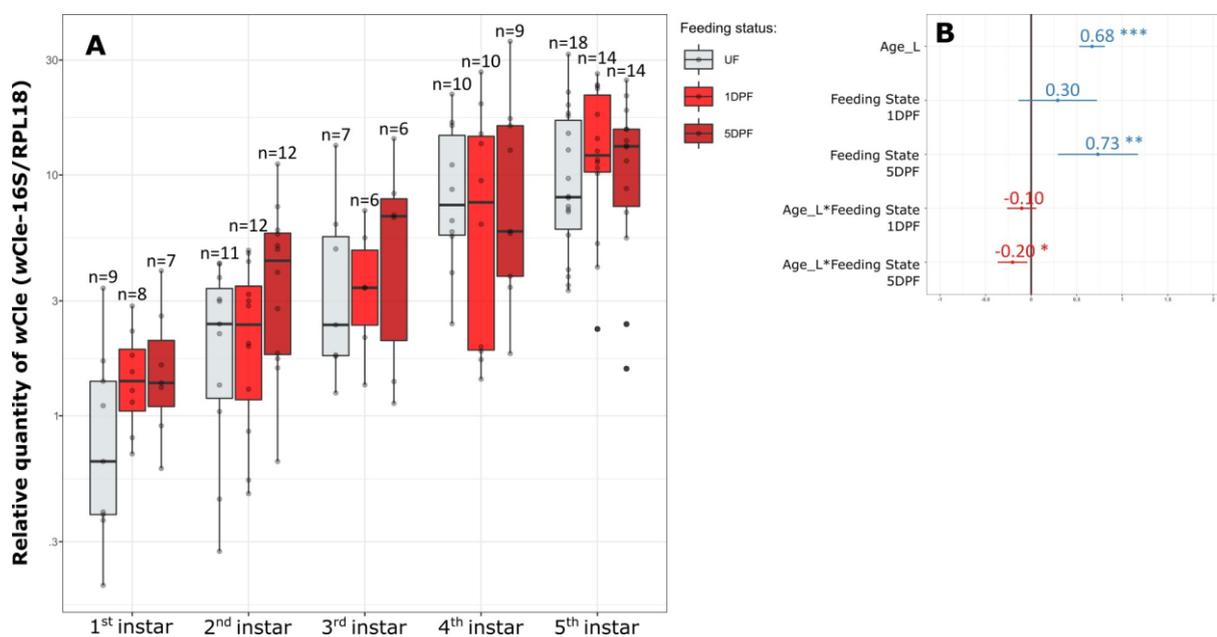


Figure 23. Dynamics of the *wCle* relative quantity in nymphal bed bugs over development and associated statistics. **A)** *wCle* relative quantities of unfed (UF) newly molted nymphs, 1-day post-feeding nymphs (1DPF), and 5-day post-feeding nymphs (5DPF) are represented as boxplots for each nymphal instar (1st to 5th). Each boxplot represents $n = 6-18$ individual nymphs (1 to 3 sampled nymphs per cohort). **B)** Resume statistics of the mixed model $\log_{10}(\text{RQ}) \sim \text{Age_N} + \text{Feeding_State} + \text{Age_N}:\text{Feeding_State} + (1|\text{Cohort})$, where Age_N is a quantitative factor (number of weeks) and Feeding_State a qualitative factor (UF, 1DPF, 5DPF, with UF set as reference). Estimate values and their associated standard errors are indicated on the panel (blue when positive effect, red when negative effect). As example for this analysis: $\log_{10}(\text{RQ})$ increases by 0.68 ± 0.06 each week for UF individuals, $\log_{10}(\text{RQ})$ increases by 0.73 ± 0.23 between the UF reference and 5DPF, and $\log_{10}(\text{RQ})$ increases by $0.68 - 0.20 = 0.48$ each week for 5DPF individuals. For detailed statistics, see supplementary data (Tab. S2).

b. The relative size of the bacteriome remains stable during nymphal development

To determine if the increase in *w*Cle density is associated with a change in the bacteriome shape or an over-growth of endosymbiont within the bacteriome, we performed Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) using probes targeting the endosymbiont 16S rRNA. *W*Cle was detected in bacteriomes of each sex at all instars during nymphal development (Fig. 24A-F). No noticeable change in shape was observed according to stage or sex. All the bacteriocytes observed within a bacteriome were infected, and their cytoplasm was packed with *w*Cle (Fig. 24A-E and S5). TEM observation performed on 5th instar female confirmed that *w*Cle exhibit a 3-layers membrane presumably composed of the two membranes of the symbionts and an individual vacuolar membrane of insect origin similarly to what has been described 50 years ago (Chang and Musgrave, 1973) (Fig. 24G).

To determine if the increase in *w*Cle density is associated with an increase in symbiotic organ size, we measured the size of the bacteriome in 39 nymphs of both sexes (n = 6-10/stage). While the bacteriome absolute area doubled at each stage between 1st and 4th instar (Fig. 24H), its relative area to the thorax remained unchanged between the 1st and the 5th instar (Fig. 24I).

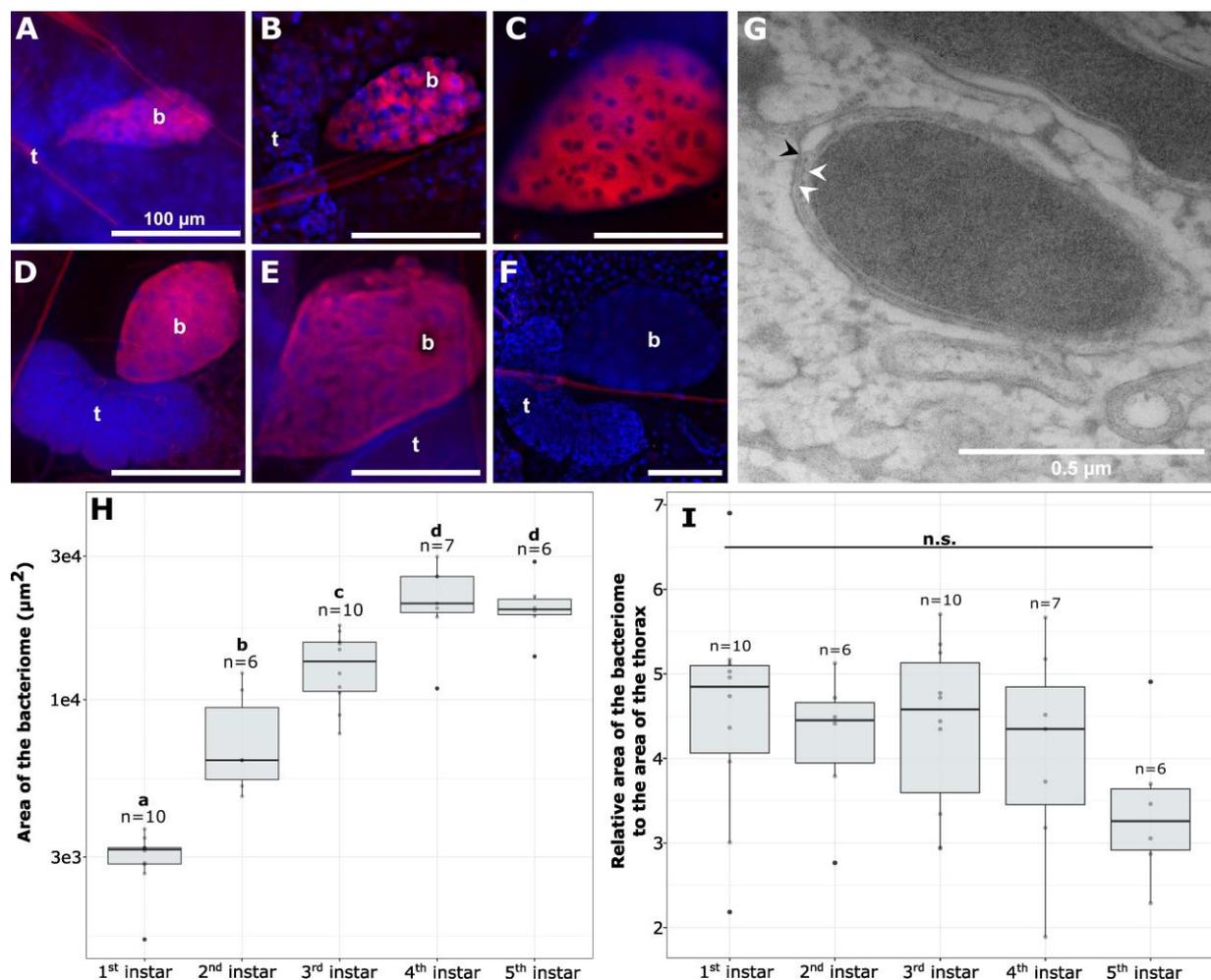


Figure 24. Visualization of the bacteriome and endosymbiont dynamics over bed bug development. (A-F) FISH visualization of *wCle* in male bacteriome (A) 1st instar; (B) 2nd instar; (C) 3rd instar; (D) 4th instar; (E) 5th instar; (F) Negative control (without probe) of a male 3rd instar bacteriome. On all pictures, the primordial testis (t) is linked to the infected bacteriome (b). In red: *wCle*; in blue: bacteriocyte nuclei (DAPI). Scale bars: 100 μ m. (G) TEM of *wCle* in a 5th instar female. White arrows show the two inner membranes of the endosymbiont, while the black one shows the peripheric third vacuolar membrane. (H-I) Dynamics of the bacterial size over development: (H) Absolute area or (I) relative area of the bacteriome at each nymphal instar (1st to 5th). Each boxplot represents n = 6-10 individual nymphs (F4-V48 line). Boxplots sharing the same letter are not significantly different (t-test, p > 0.05). For statistics, see supplementary data (Tab. S4).

c. *The dynamic of wCle is positively affected by feeding in males but not in females*

We first aimed to determine whether the increase in *Wolbachia* relative quantity during nymphal development persists after the last molt. We thus measured the relative quantity of *wCle* in 5th instars (5DPF) and newly emerged adults (7DPF) a few days after feeding (data used symbolized by * on Fig. 25C (females) and 25D (males); statistics: Fig. 25E). We showed a significant increase with development, as $\log_{10}(\text{RQ})$ of adult females increases by 0.63 ± 0.22 (equivalent to an increase by 4.57 of the relative quantity) compared to their 5th instar counterparts. No significant effect of sex on the bacterial density was detected.

We then focused on adults and determined the effect of sex, ageing and feeding on the relative quantity of *wCle*. We chose a weekly feeding protocol to mimic the natural feeding rate of bed bugs (Reinhardt and Siva-Jothy, 2007; Saveer *et al.*, 2021). We thus measured the relative quantity of *wCle* weekly during 28 days after emergence, in weekly fed or starved adults of each sex (total = 119 adults) and analyzed data using a global statistical model (Fig 25F). Overall, males have significantly less *wCle* than females, as $\log_{10}(\text{RQ})$ of males is 0.62 ± 0.16 times less the one of females (equivalent to a 4,2-fold difference in relative quantity, Fig. 25 A-D). The relative quantity of *wCle* also slightly decreased with age in female (slope on \log_{10} -transformed data = -0.11 equivalent to a decrease of 0.78 each week; Fig. 25A,C). In males however, the relative quantity of *wCle* increased with time in weekly-fed males (slope on \log_{10} -transformed data = $0.27 - 0.11 = 0.16$, equivalent to an increase of 1.44 each week; Fig. 25B), while it decreased with time in starved males (slope on \log_{10} -transformed data = $0.16 - 0.28 = -0.12$, equivalent to a decrease of 0.76 each week; Fig. 25D).

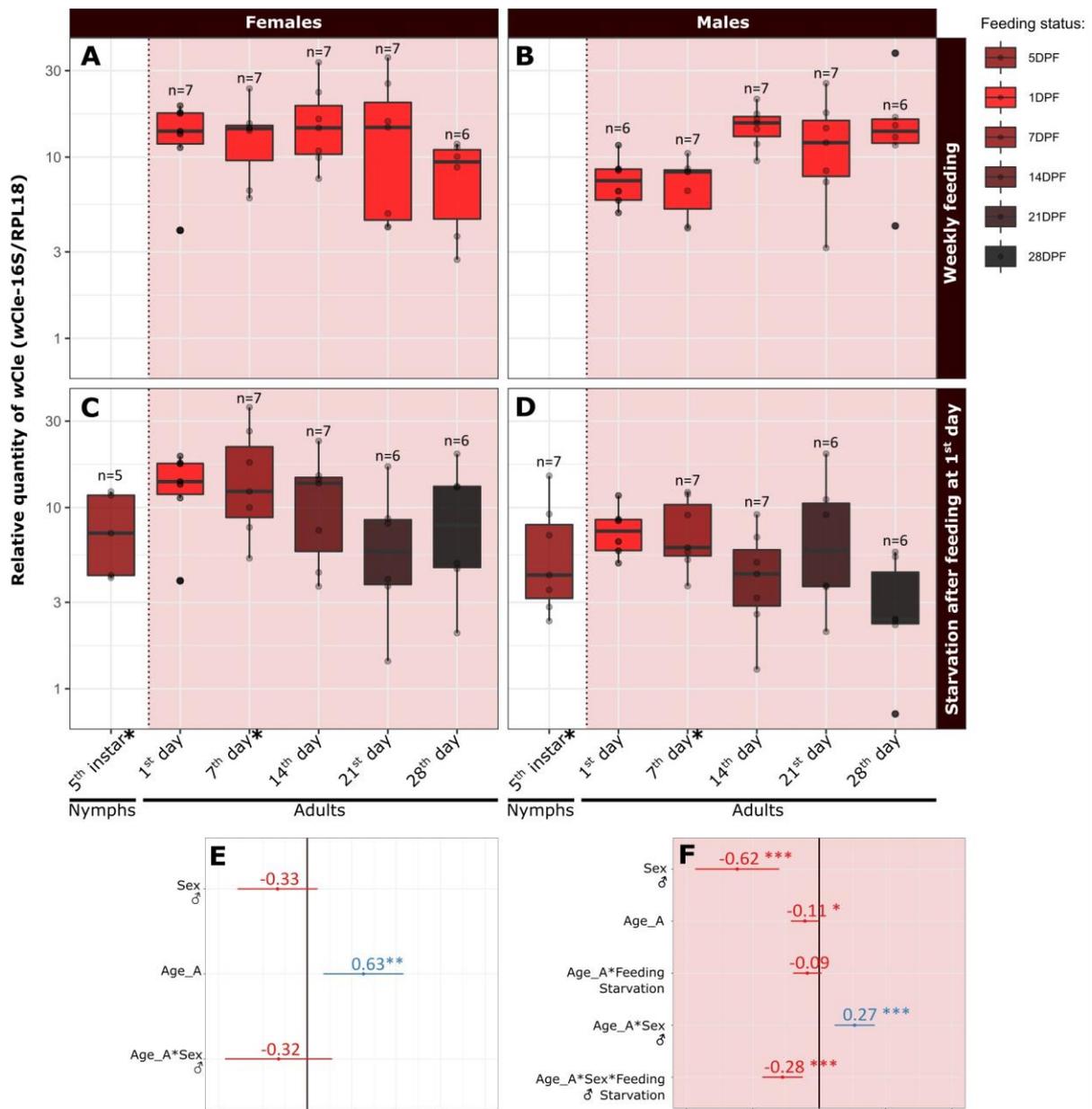


Figure 25. Dynamics of the relative quantity of *wCle* from the 5th instar to adulthood, and during 5 weeks of adulthood. Concerning the relative density dynamics during last metamorphosis (*i.e.*, between 5th instar (5DPF) and adulthood (7DPF) according to sex, data used are marked with an asterisk on panels C and D, and analyzed using a linear mixed model: $\log_{10}(\text{RQ}) \sim \text{Age} + \text{Sex} + \text{Sex}:\text{Age} + (1|\text{Cohort})$, where Age is a quantitative factor (weeks) and Sex a qualitative factor (female, male ; female set as reference; resume statistics on panel E)). Concerning the relative density dynamics in adult bed bugs according to sex, ageing and feeding, data used are presented in the red squares on the right of the dashed lines: relative quantity of *wCle* in (A) females and (B) males fed every week (collection: 1DPF), or in (C) females and (D) males starved after the first-week meal (collected concomitantly with fed individuals). The data were analyzed using a linear mixed model $\log_{10}(\text{RQ}) \sim \text{Age}_A + \text{Sex} + \text{Feeding}:\text{Sex}:\text{Age}_A + (1|\text{Cohort})$, where Age_A is a

quantitative factor (weeks), Sex a qualitative factor (female set as reference) and Feeding is a qualitative factor (weekly fed, starved ; weekly fed set as reference; resume statistics on panel F). Each box represents $n = 6-7$ individuals. Estimate values and their associated standard errors are indicated on panels E and F (blue when positive effect, red when negative effect). For detailed statistics, see supplementary data (Tab. S3).

5. Discussion

In this study, we described the dynamics of *wCle*, the nutritional obligatory symbiont of bed bugs. We observed that (a) the largest increase in relative *wCle* quantity occurred exponentially during the nymphal development; (b) this increase was positively impacted by the development of nymphal instars and the feeding; (c) the size of the bacteriome increased together with the development of the nymph, but in an allometric way; (d) except for continuously fed males, *wCle* relative quantity slightly decreased during the first four weeks of adulthood, independently of the feeding status; (e) the *wCle* density doubled in 21 days in males that were weekly fed.

This study shows that the increase in *wCle* density was exponential over nymphal development. Once adulthood was reached, *wCle* relative quantity started to slightly decrease, except in weekly-fed males. These data complete and corroborate the results obtained by Fisher *et al.*, which showed that *wCle* relative quantity was higher in the 5th nymphal stage than in the 1st nymphal stage (Fisher *et al.*, 2018) but did not precise the dynamic between these two instars. Their data indicated an increase of ~15-fold and ~22-fold in *wCle* absolute quantity between the end of the 1st instar and the start of the 5th instar in Jersey City and Harold Harlan strains, respectively. The increase was stronger in our F4 strain, with a ~39-fold increase. In the adult stage, our data confirm the decrease they reported in starved females. However, a stronger tendency was observed in Fisher *et al.*'s work, as titers in three-week starved females approached the low titer observed in 1st instars, while in our study, the decrease in the *wCle* titer in four-week starved females only approached the titer measured in 5th instars. Fisher *et al.* (2018) observed that one of their two strains retained more *wCle* through starvation than the other. One possible explanation could be differences in the way strains respond to starvation, as we used here the F4 strain (Thongprem *et al.*, 2020) that is different from the strains used in the work of Fischer *et al.* (Fisher *et al.*, 2018).

An increase in endosymbiont load from egg to adult stage (*i.e.* along nymphal, larval or pupal stages, depending on the insects) has been reported in several other nutritional endosymbiotic associations, such as the tsetse fly *Glossinidia glossina/Wigglesworthia glossinidia* (Rio *et al.*, 2006), the cereal weevil *Sytophilus oryzae/Sodalis pierantonius* (Vigneron *et al.*, 2014), and the pea aphid *Acertosyphon pisum/Buchnera aphidicola* (Simonet *et al.*, 2016). In the pea aphid and the weevil, this was associated with a change in the number of the bacteriocytes or bacteriomes. In this study, the increase of *wCle* relative quantity in

nymphs is associated with an increase in the absolute bacteriome size, which could result from two non-exclusive mechanisms: an increase in the bacteriocyte number, or an increase in the bacteriocyte size. The respective contribution of these two alternatives is difficult to evaluate in a species such as the bed bug. Indeed, bacteriocytes form very cohesive bacteriomes and it would require dissociating the organ in order to count and measure bacteriocytes. This analysis was performed in the *A. pisum/B. aphidicola* association, where bacteriocytes do not group into a cohesive bacteriome (Buchner, 1965; Douglas, 1989). In this association, the increase in the endosymbiont load during development correlates with both an increase of the quantity and of the size of bacteriocytes (Simonet *et al.*, 2016, 2018). While bacteriocyte mitotic activity has not yet been reported, bacteriocyte enlargement and polyploidy has been proposed in several models to participate to bacteriome growth (Koch, 1959; Douglas, 1989; Moran, Telang and Smith, 1998; Baumann, Moran and Baumann, 2006; Orr-Weaver, 2015; Alarcón *et al.*, 2022; Nozaki and Shigenobu, 2022). Further experiments are needed to analyze the precise cellular mechanism of bacteriome growth in the bed bug.

We noticed that blood intake had a positive effect after 5 DPF on the *wCle* relative quantity in nymphs. This could indicate that blood ingestion brings profuse nutritional elements for *wCle* proliferation. Based on this and previous works (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022), the following succession of critical steps in the interaction could be considered: i) blood ingestion allows the increase in bacterial load, ii) this increase allows higher provision of B vitamins by the host, iii) the host molt once a critical threshold in B vitamin is reached, one week post blood-feeding. However, measuring the dynamic of *wCle* in week-starved nymphs is required to demonstrate that it is indeed the blood ingestion that enhance the developmental increase of *wCle*, and that it is not simply due to aging.

After the increase of the *wCle* quantity in nymphs up to adult emergence, the decrease in *wCle* density in both weekly fed and starved females is intriguing. The decrease observed in starved females does not reach the 1st instar's quantity of *wCle* like in Fisher *et al.* (2018). Because *wCle*-synthesized B vitamins are necessary for fecundity and egg viability, we could expect either an increase or at least a steadiness in *wCle* density in sexually mature fed females (*i.e.* ~5 days post emergence (Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Davis, 1964)). While the same pattern is observed between starved adults and weekly fed females, the slow decrease of *wCle* could have different origins. In starved adults, nutritional scarcity could prevent allocation of resources to endosymbiont growth or maintenance. Additionally, nutritional stress could trigger active mechanisms of endosymbiont elimination, including a recycling of the symbionts for nutritive needs. For example, starved adults could engage in *wCle* lysis by autophagy to retrieve nutrients through endosymbiont digestion in period of nutritional scarcity. This process, known as wolbophagy, drives the elimination of few damaged *Wolbachia* in healthy cells under stress conditions, and has been described in *Drosophila* (Deehan *et al.*, 2021; Hargitai *et al.*, 2022), but not in *Wolbachia*-nutritional endosymbiosis. Drastic endosymbiont clearance by autophagy has been described in several associations, such as in some aphids (Hinde, 1971), the whitefly

(Wang *et al.*, 2022), or the carpenter ant (Gonçalves *et al.*, 2020). This phenomenon is particularly exemplified in cereal weevils where the endosymbiont *S. pierantonius* grows dynamically during early adulthood, and provide essential amino acids for the host cuticle synthesis (Vigneron *et al.*, 2014; Dell’Aglio *et al.*, 2023). However, gut-associated endosymbionts are eliminated through apoptotic and autophagic mechanisms, starting one week after adult emergence, when the cuticle is fully synthesized and functional (Vigneron *et al.*, 2014). The moderate decrease in *wCle* quantity we observed along four weeks of adulthood in the bed bug could be the result of a moderate and progressive wolbophagy, which does not exclude a more drastic elimination later in the life cycle. To note, the mechanisms of transfer of nutrients from the endosymbionts to the host, especially B vitamins, remain unidentified so far in the bed bug-*wCle* association, and could itself potentially rely on moderate wolbophagy, allowing the host to maintain a *wCle* population while “harvesting” the B vitamins from the endosymbionts accordingly to its physiological needs.

Surprisingly, the weekly fed females also present a slow decrease of *wCle* in the four weeks of observation, despite having abundant nutritional resources. However, this apparent abundance of nutritional resources must be put in perspective of their physiological needs. Indeed, weekly blood-feeding increases the mating rate (Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Saveer *et al.*, 2021). Mating is traumatic in bed bugs (Stutt and Siva-Jothy, 2001; Reinhardt, Naylor and Siva-Jothy, 2003; Reinhardt and Siva-Jothy, 2007), a high-mating rate can up-regulate their induced immunity (Siva-jothy *et al.*, 2019) and potentially impacts *wCle* density regulation. Weekly blood-feeding also increases the number of laid eggs (Mellanby, 1939; Johnson, 1941; Saveer *et al.*, 2021). This increased reproductive activity (mating and egg production) of weekly-fed females likely requires a higher metabolic investment that could constrain the resource allocation to the endosymbionts despite the recurrent host feeding. Finally, a part of *wCle* could be “lost” in the vertical transmission to the eggs. Counting the *wCle* quantity in laid eggs and their correlation with the remaining endosymbiont quantity in ovaries in the mother could be a way to confirm the potential “loss” of *wCle* quantity by the mothers to the benefit of the transmission to progeny.

We also analyzed the *wCle* dynamics in males, which had not been previously studied. At emergence, no effect of the sex was observed on *wCle* load, despite the presence of a symbiotic population in the female germline responsible for *wCle* vertical transmission to the eggs. This suggests that the quantity of *wCle* in the ovaries is minor compared to the quantities in bacteriomes, corroborating other works (Hosokawa *et al.*, 2010). Surprisingly, after emergence, weekly fed males exhibit an increasing dynamic of *wCle* density that contrasts with the decrease in *wCle* quantities observed in starved males but also in starved or weekly fed females. This increasing quantity in weekly fed males is even more intriguing in males, in which the impact of an elimination of *wCle* has a very limited effect on life history traits such as the thorax size (Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). We can envision two non-exclusive hypotheses to explain the contrasting dynamics between weekly fed females and males. First, while they both

have access to food, they do likely not have similar metabolic needs, given the very costly investment the females make in reproduction. Therefore, *wCle* could maintain and proliferate better in weekly fed males because of a higher availability of metabolic resources in these individuals. In addition, the bacteriome and gonad have been described to remain connected in adult males but not in females (Davis, 1956; Buchner, 1965; Chang, 1974). We cannot exclude that this connection is important to maintain proliferation of *wCle* in adults under blood feeding conditions.

Altogether, our main hypothesis to explain the regulation of *wCle* behind the observed dynamics would be that, in nutritional abundance conditions like weekly feeding, *wCle* can proliferate to fulfill the host needs. In contrast, during the host developmental critical steps, where host metabolic needs are higher, such as the adult metamorphosis, the mating, the starvation, or the egg formation, the symbiotic cost is in detriment of *wCle*, which decreases in quantity. This decrease in quantity could be the results of either a decrease in proliferation due to nutritional scarcity, or an active recycling of endosymbionts by the host for example by wolbophagy. However, regulation of both *wCle* location and load could also involve active immune mechanisms such as production of reactive oxygen species (ROS) (Pan *et al.*, 2012; Zug and Hammerstein, 2015) or of antimicrobial peptides (AMP) (Login *et al.*, 2011) by the host, as described in other symbiotic associations.

In sum, this work shows a dynamic of *wCle* that is positively impacted by blood ingestion during nymphal stages and in the adult males. This description of the dynamics of *wCle* along the life cycle of its host allows to unveil that feeding is a critical step in the interaction, which should be considered in future research to decipher the molecular dialogue between partners and envision the development of new symbiocides.

6. Supplementary Material

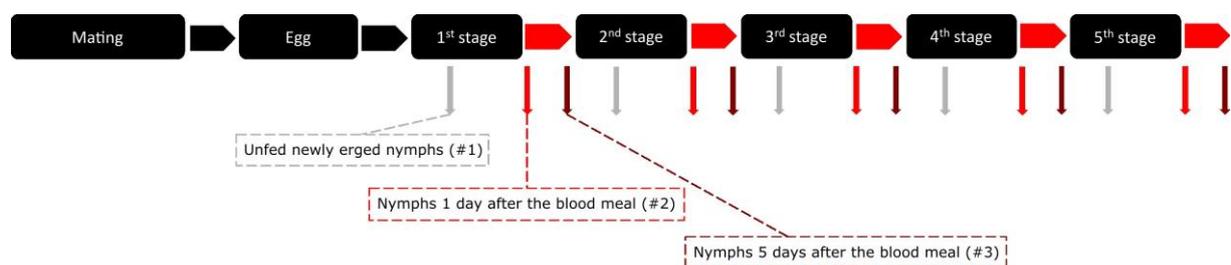


Figure S1. Experimental layout of the nymphal sampling. Each framed step is one weeklong. Grey arrows represent sampling of unfed newly emerged nymphs (#1: UF). Light red arrows represent sampling of nymphs one day post feeding (#2: 1DPF). Dark red arrows represent sampling of nymphs five days post feeding (#3: 5DPF).

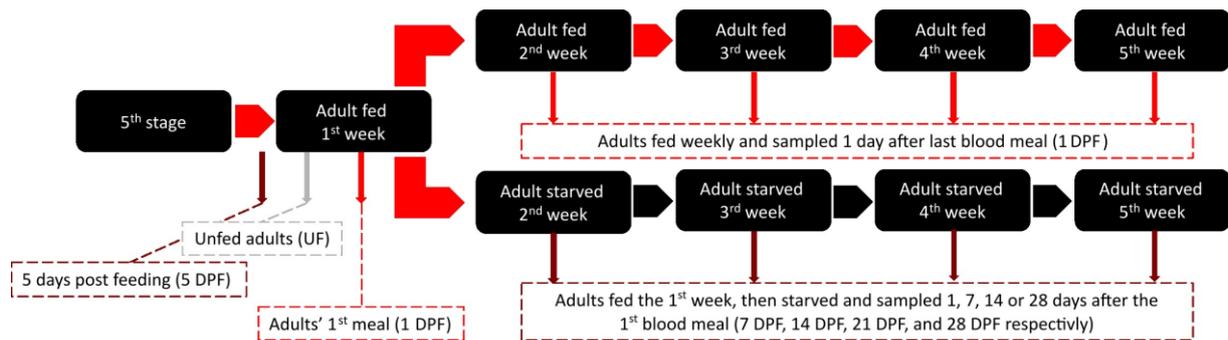


Figure S2. Experimental layout of the adult sampling. Each framed step is 1 weeklong. Large red arrows represent a weekly feeding. Large black arrows represent the beginning of a new week without feeding. Grey arrows represent sampling of unfed newly emerged adults (UF). Light red arrows represent sampling of adults that were fed weekly and sampled 1 day after blood meal (1DPF). Dark red arrows represent sampling of 5th instars or adults that were fed 5, 7, 14, 21 or 28 days post feeding.

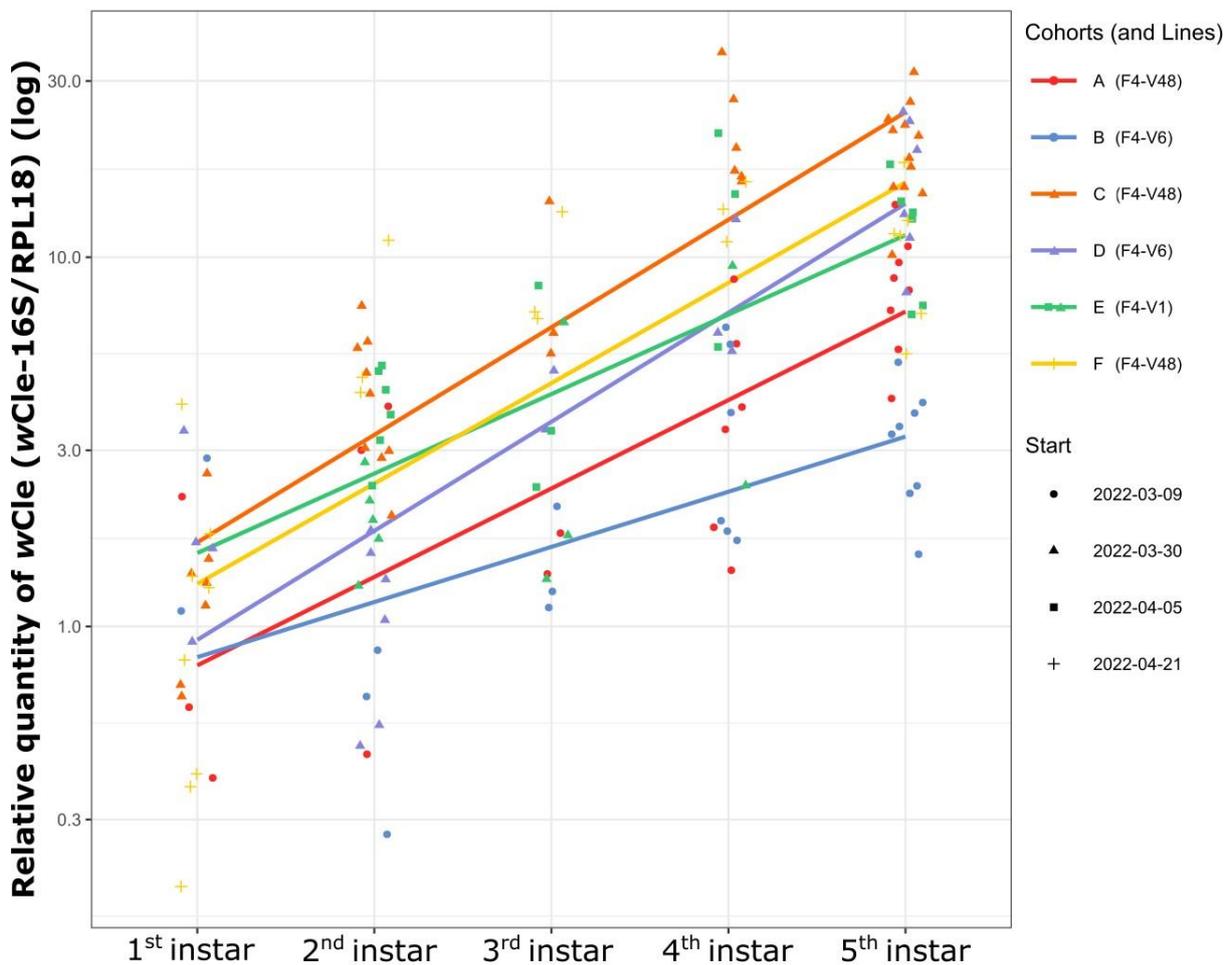


Figure S3. Relative quantity of *wCle* over development, according to the sampling cohort. Dots correspond to cohorts shown in the legend, and lines to linear correlations between *wCle* relative quantity and time (in developmental stage).

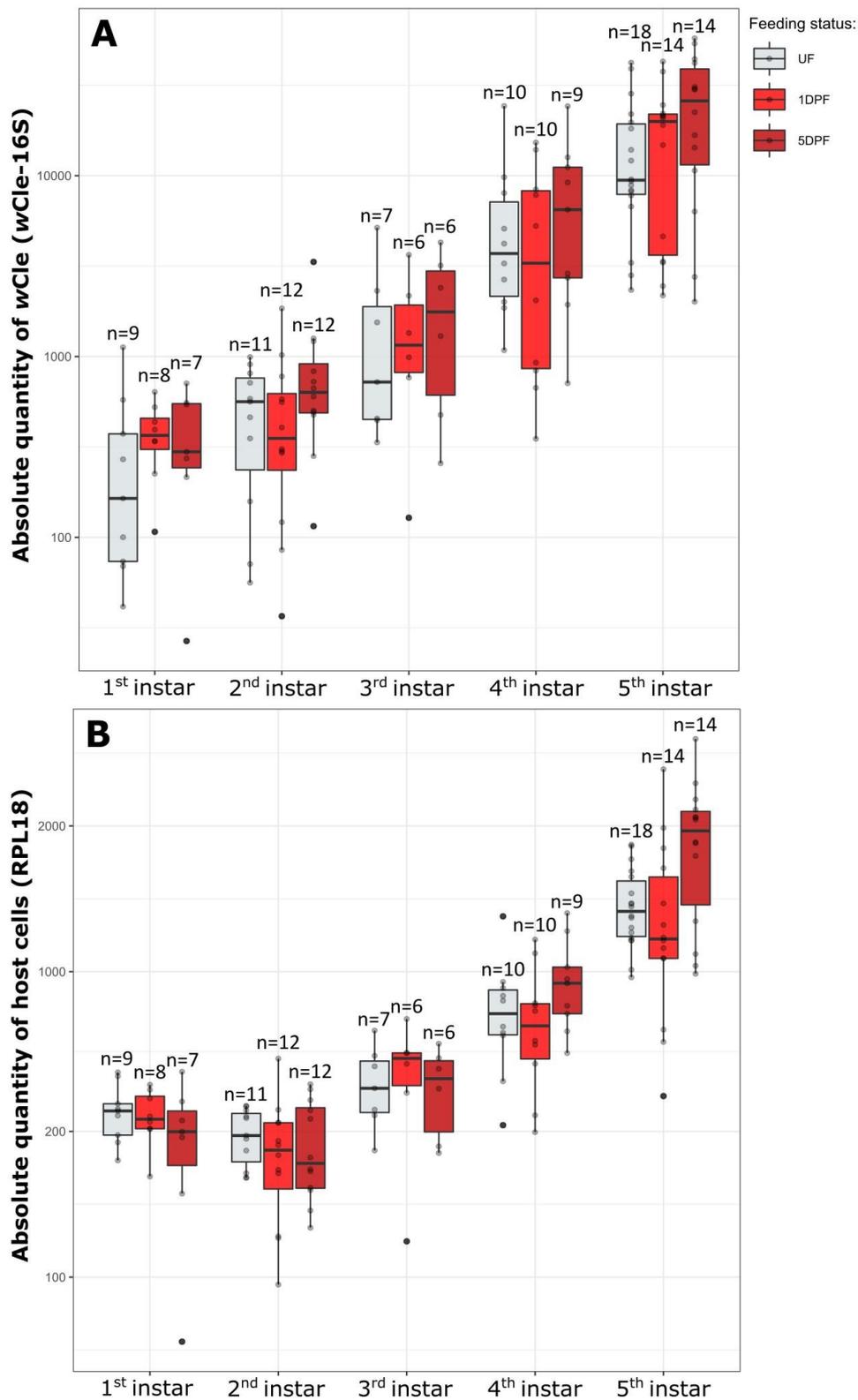


Figure S4. Dynamics of the absolute quantity of *Wolbachia* and host cells in nymphal bed bugs over development. **A**) *Wolbachia* wCLe and **B**) RPL18 bed bug absolute quantity: Unfed (UF) newly molted nymphs, 1-day post-feeding nymphs (1DPF), and 5-day post-feeding nymphs (5DPF) are represented as boxplots for each nymphal instar (1st to 5th). Each box represents n = 6-18 individual nymphs (1 to 3 sampled nymphs per cohort).

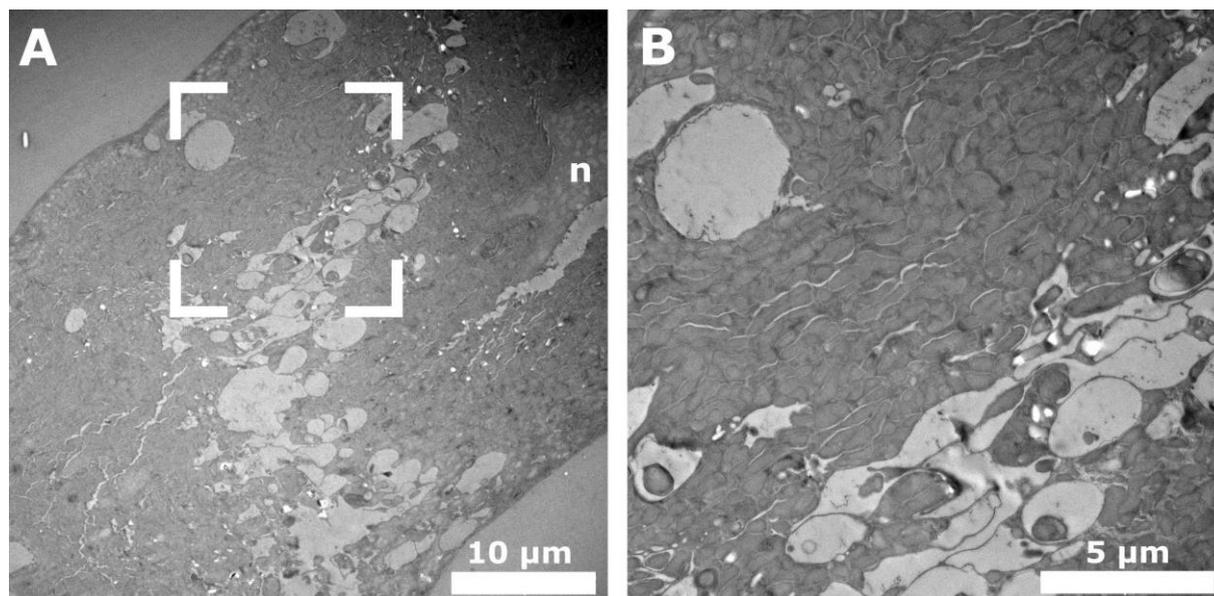


Figure S5. (A) TEM visualization of *wCle* in a 4th instar female bacteriome and (B) zoom on an area of interest. *WCle* occupies the cytoplasm and surrounds the nucleus (n).

Table S1. PCR primer and fluorescence probe sequences used in this study. All the fluorescence probes are labelled with a fluorophore at the 5' end, indicated below in square brackets.

Target organisms Target gene	Primer/Probe name	Sequence (5'-3')	qPCR Efficacy (%)	T _m (°C)	Size (bp)	Ref.
C. lectularius						
ribosomal protein L18 (RPL18)	RPL18_F RPL18_R	GTATGACGGAGGCAGCTAGG AACATTCCGAGCAAATTCGGTA	93	56	137	(Fisher et al., 2018)
DNA qPCR probe (RPL18)	Clec_ProbeVIC	[HEX]-ATGAGGACG-[ZEN]- GTGTTCTTGCCT-[TAMRA]		61.5	-	-
wCle						
16S rRNA	INT2_F INT2_R	AGTCATCATGGCCTTTATGGA TCATGTAICTCGAGTTGCAGAGT	93	60	136	(Sakamoto and Rasgon, 2006)
DNA qPCR probe (16S)	wCle_ProbeFAM	[6-FAM]-TGGTGCTA-[ZEN]- CAATGGGCT-[TAMRA]		61.5	-	-
DNA FISH probe (16S)	TsWol944R	[TAMRA]- AACCGACCCTATCCCTTCG		54	-	(Thongprem et al., 2020)
BEV-like						
16S rRNA	16S_BEV- like_110F 16S_BEV- like_209R	ATACCGCATGTGCGCAAGA GTGAGCCATTACCCACCTACT		57	420	(Hosokawa et al., 2010)
Torix Rickettsia						
gltA	RiGltA405_F RiGltA1193_R	GATCATCCTATGGCA TCTTCCATTGCCCC		54	786	(Pilgrim et al., 2017)

Table S2. Statistics for global effects of factors and their interactions in nymphs using the lmer model. Relative quantity of wCle: $\log_{10}(\text{RQ}) \sim \text{Age_N} + \text{Feeding_State} + \text{Age_N}:\text{Feeding_State} + (1|\text{Cohort})$.

Formula: $\log(\text{RQ}) \sim \text{Age_N} + \text{Feeding_State} + \text{Age_N}:\text{Feeding_State} + (1 \text{Cohort})$						
Linear mixed model fit by REML (lme4) and t-tests use Satterthwaite's method (lmerTest) (cells in blue)						
Data: Nymphs (instars 1-5); Reference: Age_N: 1st instar; Feeding_State: UF						
Scaled residuals:						
Min	1Q	Median	3Q	Max		
-2.58035	-0.66296	-0.02132	0.61371	2.93410		
Random effects:						
Groups	Name	Variance	Std.Dev.			
Cohort	(Intercept)	0.2825	0.5315			
	Residual	0.3986	0.6314			
Number of obs: 153	Groups : Cohort 6					
Fixed effects:						
	Estimate	Std.Error	df	t-value	Pr(> t)	
(Intercept)	-0.27948	0.26811	10.34654	-1.042	0.32096	
Age_N	0.67926	0.05744	142.44194	11.825	< 2e-16	***
Feeding_State1DPF	0.29658	0.22499	142.13409	1.318	0.18956	
Feeding_State5DPF	0.73394	0.22842	142.04595	3.213	0.00162	**
Age_N:Feeding_State1DPF	-0.09707	0.08343	142.14111	-1.163	0.24659	
Age_N:Feeding_State5DPF	-0.20468	0.08443	142.05019	-2.424	0.01660	*
Correlation of fixed effects:						
	(Intr)	Age_N	F_S1DP	F_S5DP	A_N:F_S1	
Age_N	-0.494					
Fdng_St1DPF	-0.406	0.581				
Fdng_St5DPF	-0.399	0.569	0.476			
A_N:F_S1DPF	0.336	-0.682	-0.835	-0.391		
A_N:F_S5DPF	0.331	-0.670	-0.392	-0.837	0.459	

Table S3. Statistics for global effects of factors and their interactions in adults using the linear model and post-hoc analysis: A) lm (log(Mean_area_bact) ~ Stage); B) tukey_hsd (log(Mean_area_bact) ~ Stage); C) lm (Mean_ratio_bact ~ Stage); D) tukey_hsd (Mean_ratio_bact ~ Stage).

A) lm(formula = log(Mean_area_bact) ~ Stage, data = d2)									
Data: Bacteriome nymphs (instars 1-5); Reference: Stage: 1 st instar									
Residuals:									
Min	1Q		Median			3Q	Max		
-0.64789	-0.12178		0.00203			0.20323	0.54474		
Coefficients:									
	Estimate		Std.Error			t-value	Pr(> t)		
(Intercept)	7.98205		0.09238			86.406	<2e-16		***
Stage2	0.88716		0.15085			5.881	1.23e-06		***
Stage3	1.46136		0.13064			11.186	6.13e-13		***
Stage4	1.96276		0.14396			13.634	2.43e-15		***
Stage5	1.92936		0.15085			12.790	1.51e-14		***
Residual standard error: 0.2921 on 34 degrees of freedom									
Multiple R-squared: 0.8874, Adjusted R-squared: 0.8742									
F-statistic: 67.01 on 4 and 34 DF, p-value: 1.204e-15									
B) Post-hoc analyses, tukey_hsd (log(Mean_area_bact) ~ Stage)									
Stages	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif	
Stage	1	2	0	0.887	0.453	1.32	1.17e-5	****	
Stage	1	3	0	1.46	1.09	1.84	6.04e-12	****	
Stage	1	4	0	1.96	1.55	2.38	0	****	
Stage	1	5	0	1.93	1.49	2.36	1.2e-13	****	
Stage	2	3	0	0.574	0.140	1.01	4.78e-3	**	
Stage	2	4	0	1.08	0.608	1.54	1.32e-6	****	
Stage	2	5	0	1.04	0.557	1.53	4.82e-6	****	
Stage	3	4	0	0.501	0.0869	0.916	1.13e-2	*	
Stage	3	5	0	0.468	0.0336	0.902	2.95e-2	*	
Stage	4	5	0	-0.0334	-0.501	0.435	1	ns	
C) lm(formula = (Mean_ratio_area) ~ Stage, data = d2)									
Data: Bacteriomes nymphs (instars 1-5); Reference: Stage: 1 st instar									
Residuals:									
Min	1Q		Median			3Q	Max		
-2.3590	-0.5449		0.1958			0.5395	2.3576		
Coefficients:									
	Estimate		Std.Error			t-value	Pr(> t)		
(Intercept)	4.5434		0.3479			13.059	8.36e-15		***
Stage2	-0.3257		0.5682			-0.573	0.5702		
Stage3	-0.1620		0.4920			-0.329	0.7439		
Stage4	-0.4711		0.5422			-0.869	0.3910		
Stage5	-1.1626		0.5682			-2.046	0.0485		*
Residual standard error: 1.1 on 34 degrees of freedom									
Multiple R-squared: 0.1206, Adjusted R-squared: 0.01717									

F-statistic: 1.166 on 4 and 34 DF, p-value: 0.343								
D) Post-hoc analyses, tukey_hsd (Mean_area_bact ~ Stage)								
Stages	group1	group2	null.value	estimate	conf.low	conf.high	p.adj	p.adj.signif
Stage	1	2	0	-0.326	-1.96	1.31	0.978	ns
Stage	1	3	0	-0.162	-1.58	1.25	0.997	ns
Stage	1	4	0	-0.471	-2.03	1.09	0.906	ns
Stage	1	5	0	-1.16	-2.80	0.473	0.267	ns
Stage	2	3	0	0.164	-1.47	1.80	0.998	ns
Stage	2	4	0	-0.145	-1.91	1.62	0.999	ns
Stage	2	5	0	-0.837	-2.67	0.992	0.682	ns
Stage	3	4	0	-0.309	-1.87	1.25	0.979	ns
Stage	3	5	0	-1.00	-2.64	0.635	0.412	ns
Stage	4	5	0	-0.691	-2.45	1.07	0.79	ns

Table S4. Statistics for global effects of factors and their interactions in the transition between 5th instar and adults, using the lmer model: $\text{lmer}(\log(\text{RQ}) \sim \text{Sex} + \text{Age} + \text{Sex}:\text{Age} + \text{Sex}:\text{Age} + (1|\text{Cohort}))$.

Formula: $\log(\text{RQ}) \sim \text{Sex} + \text{Age} + \text{Sex}:\text{Age} + (1 \text{Cohort})$						
Linear mixed model fit by REML (lme4) and t-tests use Satterthwaite's method (lmerTest) (cells in blue)						
Data: Adults (instars 5 and adults 7DPF); Reference: Sex: Female; Age_A: 5th instar						
Scaled residuals:						
Min	1Q	Median	3Q	Max		
-1.8990	-0.4008	-0.1572	0.4739	1.5112		
Random effects:						
Groups	Name	Variance	Std.Dev.			
Cohort	(Intercept)	0.2476	0.4976			
	Residual	0.1294	0.3597			
Number of obs: 26	Groups : Cohort 6					
Fixed effects:						
	Estimate	Std.Error	df	t-value	Pr(> t)	
(Intercept)	1.9675	0.2606	9.9652	7.550	1.99e-05	***
SexMale	-0.3338	0.2159	17.1174	-1.547	0.14027	
Age	0.6329	0.2159	17.1174	2.932	0.00926	**
SexMale:Age	-0.3220	0.2891	17.0421	-1.114	0.28078	
Correlation of fixed effects:						
	(Intr)	Age_N	SexMal			
SexMale	-0.483					
Age	-0.483	0.603				
SexMal:Ag	0.361	-0.747	-0.747			

Table S5. Statistics for global effects of factors and their interactions in adults using the lmer model: $\text{lmer}(\log(\text{RQ}) \sim \text{Sex} + \text{Age_A} + \text{Feeding}:\text{Age_A} + \text{Sex}:\text{Age_A} + \text{Feeding}:\text{Sex}:\text{Age_A} + (1|\text{Cohort}))$.

Formula: $\log(\text{RQ}) \sim \text{Sex} + \text{Age_A} + \text{Feeding}:\text{Age_A} + \text{Sex}:\text{Age_A} + \text{Feeding}:\text{Sex}:\text{Age_A} + (1 \text{Cohort})$						
Linear mixed model fit by REML (lme4) and t-tests use Satterthwaite's method (lmerTest) (cells in blue)						
Data: Adults (Day 1-28); Reference: Sex: Female; Age_A: 1st day; Feeding: Yes						
Scaled residuals:						
Min	1Q	Median	3Q	Max		
-2.7011	-0.4605	0.1798	0.6994	2.4409		
Random effects:						
Groups	Name	Variance	Std.Dev.			
Cohort	(Intercept)	0.1467	0.3830			
	Residual	0.2808	0.5299			
Number of obs: 132	Groups : Cohort 6					
Fixed effects:						
	Estimate	Std.Error	df	t-value	Pr(> t)	
(Intercept)	2.62166	0.19166	9.29534	13.679	1.81e-07	***
SexMale	-0.61698	0.15975	120.97851	-3.862	0.000182	***
Age_A	-0.10710	0.05355	121.07329	-2.000	0.047736	*
Age_A:FeedingNo	-0.08873	0.05446	120.95556	-1.629	0.105863	
SexMale:Age_A	0.26707	0.07647	120.96393	3.492	0.000669	***
SexMale:Age_A:FeedingNo	-0.27557	0.07704	120.96744	-3.577	0.000501	***
Correlation of fixed effects:						
	(Intr)	Age_N	F_S1DP	F_S5DP	A_N:F_S1	
SexMale	-0.400					
Age_A	-0.403	0.483				
Age_A:FdngN	-0.002	0.001	-0.496			
SexMal:Ag_A	0.284	-0.711	-0.696	0.347		
SxMl:A_A:FN	0.002	-0.002	0.350	-0.707	-0.490	

Conclusion de l'étude et perspectives

Dans cette étude, nous avons décrit la dynamique de $wCle$ (Figure 26). Nous avons observé que la plus grande augmentation de la quantité de l'endosymbiote se produisait au cours du développement nymphal et était positivement influencée par la prise de repas sanguin. Nous avons aussi observé que $wCle$ restait localisée dans les bactériomes lors du développement et donc que l'augmentation de la charge n'était pas liée à un élargissement du tropisme de l'infection. Enfin nous avons observé que la quantité de $wCle$ diminuait chez les adultes à jeun et chez les femelles nourries mais augmentait chez les mâles nourris. Nous proposons une explication à ce phénomène par une disponibilité des ressources allouées à la symbiose, où dans le cas des adultes à jeun, la privation alimentaire entraîne la perte ou l'absence de répllication de $wCle$. La femelle nourrie quant à elle perdrait $wCle$ sollicitée dans la voie trophique de l'ovogénèse ou dans la transmission verticale.

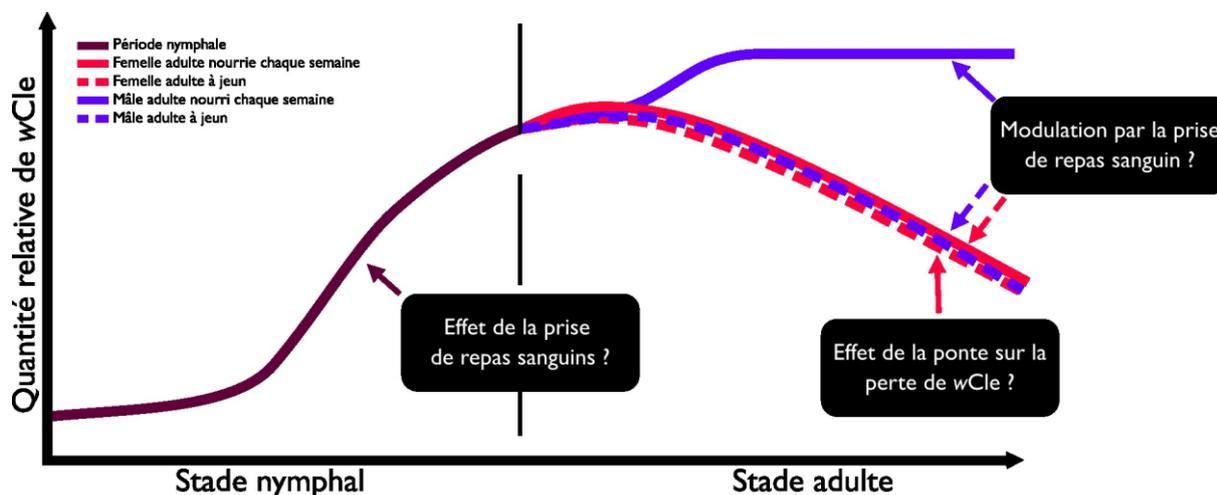


Figure 26. Schéma récapitulatif de l'étude. Courbe représentative de la dynamique de la quantité relative de $wCle$ au cours de la biologie de la punaise de lit. L'augmentation de la quantité relative pendant la période nymphale (trait violet continu), l'augmentation de la quantité relative chez le mâle adulte nourri chaque semaine (trait bleu continu), les diminutions de la quantité relative chez le mâle à jeun (trait bleu discontinu), la femelle à jeun (trait rouge discontinu) et la femelle nourrie chaque semaine (trait rouge continu) sont représentées avec les hypothèses associées à ces dynamiques.

Finalement, ce travail montre une dynamique de $wCle$ qui est positivement impactée par l'hématophagie au cours des stades nymphaux et chez les mâles adultes, et montre que l'alimentation, le développement, le passage au stade adulte et le sexe sont des étapes critiques de l'interaction, qui devraient être prises en compte dans les recherches futures pour décrypter le dialogue moléculaire entre les partenaires. En perspective un dual RNA-seq *C. lectularius/wCle* pourra être réalisé chez des mâles adultes ou des nymphes à jeun ou repues, afin d'étudier l'effet de la prise de repas et du stade de développement sur la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme, l'échange de nutriment ou l'autophagie (Figure 27).

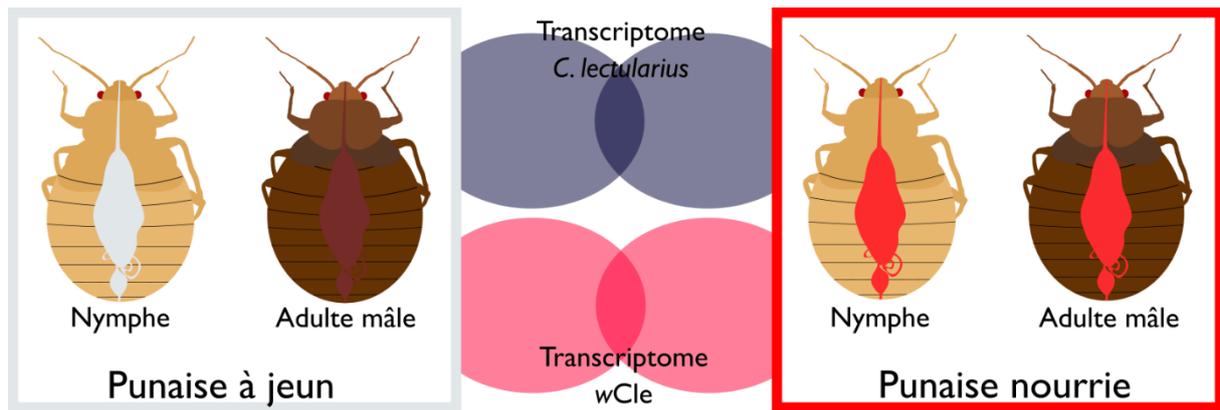


Figure 27. Schéma présentant le concept expérimental d'analyse transcriptomique des gènes impliqués dans l'interaction lors de l'ingestion de sang. Le transcriptome de *wCle* et de *C. lectularius* sera séquencé chez des nymphes ou des mâles adultes à jeun ou après prise de repas. Certains gènes exprimés différemment entre la condition de jeûne et de celle après la prise de repas seront des candidats pour la perturbation de la symbiose.



Dynamique de la localisation de *wC*le chez *C. lectularius*

Sommaire

Contexte de l'étude	88
<i>Wolbachia</i> as an ovarian-associated symbiont, from the early stage to the adult bed bug ⁸⁹	
1. Abstract	90
2. Introduction	90
3. Materials and methods	91
4. Results	93
5. Discussion	98
Conclusion de l'étude et perspectives	101
Étude complémentaire.....	101
1. Introduction	101
2. Matériels et méthodes.....	102
3. Résultats	103
4. Discussion	105



Cette étude comprend un article prochainement soumis dans un journal.
L'article est rédigé dans la langue de sa soumission, l'anglais.

Contexte de l'étude

Chez *C. lectularius*, *wCle* est un symbiote nutritionnel associé aux bactériomes et aux ovaires. Alors que l'étude précédente avait décrit la localisation de *wCle* dans les bactériomes et l'évolution de sa charge dans les punaises, l'infection des ovaires par cet endosymbiote et la dynamique de sa localisation dans cet organe demeurent encore inconnues. Des recherches antérieures ont montré un tropisme de *wCle* dans le pôle postérieur des œufs et dans les ovaires des femelles adultes (Buchner, 1965; Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). Ceci interroge sur la dynamique d'infection des ovaires mais aussi, étant donné que *wCle* est un symbiote nutritionnel, sa localisation et son rôle potentiel dans la nutrition dans ces organes et/ou la transmission verticale. Comprendre l'interaction entre *wCle* et la punaise de lit au niveau des organes reproducteurs permettra de développer de nouvelles stratégies de lutte contre ce ravageur en perturbant soit sa fonction trophique lors de l'ovogénèse, soit sa transmission verticale (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020).

Dans l'étude précédente, nous nous étions concentrés sur la dynamique de *wCle* pendant le développement nymphal et la phase imaginale de chaque sexe en considérant *wCle* comme un endosymbiote nutritionnel associé aux bactériomes. Ce choix nous a permis d'étudier l'effet de la nutrition, du développement et du sexe sur la dynamique de *wCle*. Dans cette étude nous souhaitons compléter les connaissances sur la dynamique de l'interaction en étudiant le moment de l'infection des ovaires et les tissus infectés pendant le développement de ces organes. Pour préciser la localisation des bactéries, nous avons utilisé des techniques d'observation, notamment la fluorescence par hybridation *in situ* (FISH) en microscopie confocale pour observer la *wCle* dans les ovaires, ainsi que la microscopie à transmission électronique (TEM) pour observer *wCle* dans les cellules. Nous avons montré l'infection établie des ovaires primordiaux dès le premier stade nymphal suggérant un établissement de *wCle* dans les ovaires et les bactériomes pendant le développement embryonnaire. Nous avons aussi observé la répartition pluritissulaire de *wCle* dans ces organes au cours du développement.

***Wolbachia* as an ovarian-associated symbiont, from the early stage to the adult bed bug**

Marius Poulain^{1,2,3*}, Séverine Balmand⁴, Elodie Rosinski¹, Abdelaziz Heddi², Romain Lasseur³, Fabrice Vavre¹, Anna Zaidman-Rémy^{2,5*}, Natacha Kremer^{1*}

¹ Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR 5558, 69622 Villeurbanne, France

² Univ Lyon, INSA-Lyon, INRAE, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France

³ Izinnovation SAS, 69006 Lyon, France

⁴ Univ Lyon, INRAE, INSA-Lyon, BF2I, UMR 203, 69621 Villeurbanne, France

⁵ Institut Universitaire de France, 75231 Paris, France

*** Correspondence:**

Marius Poulain

marius.poulain@univ-lyon1.fr

Anna Zaidman-Rémy

anna.zaidman@insa-lyon.fr

Natacha Kremer

natacha.kremer@univ-lyon1.fr

Keywords: *Wolbachia*, *Cimex lectularius*, transovarial transmission, germinal endosymbiosis, oogenesis

Author contributions: N. Kremer, A. Zaidman-Rémy and F. Vavre conceived the study with the help of A. Heddi and R. Lasseur; E. Rosinski and M. Poulain bred the bed bugs; S. Balmand gave training, supporting expertise on the microscopic analyses and performed the TEM experiments and analyses with the participation of M. Poulain; M. Poulain performed the experiments and analyses with the contribution of A. Zaidman-Rémy and N. Kremer. M. Poulain wrote the article with A. Zaidman-Rémy and N. Kremer. All authors read the article.

Funding: This work was funded by the CIFRE contract n°2019/1626, the Pack Ambition Recherche Rhone-Alpes SymBed (20 009583 01), the ANR PRC FBI (ANR-21-CE35-0011), the Scientific Breakthrough Project Micro-be-have (Microbial impact on insect behavior) of Université de Lyon, within the program ‘Investissements d’Avenir’ (ANR-11-IDEX-0007; ANR-16-IDEX-0005) and the Institut Universitaire de France (A. Zaidman-Rémy, junior member).

Acknowledgement: We thank Oliver Otti for kindly providing us bed bugs. We thank the Symbiotron platform from the FR3728 BioEEnViS (and especially Angelo Jacquet) and the Equipex+ InfectioTron (ANR-21-ESRE-0023) for facilities and equipment for rearing and experimentation on bedbugs. TEM imaging was performed at Centre Technologique des Microstructures EZUS LYON - Université Claude Bernard Lyon1 (CTμ), and we more specifically thank Lucie Geay for realizing the ultra-thin sectioning of the tissues for TEM. I thank the members of my thesis comity, Olivier Duron, Delphine Destoumieux-Garzon and François Leulier for fruitful discussions

1. Abstract

Intracellular bacteria *Wolbachia* are well known manipulators of insect reproduction and are often observed in germline cells. The bed bugs *Cimex lectularius* are strict hematophagous insects, harboring the intracellular bacterium *Wolbachia* (*wCle*) in symbiotic organs called bacteriomes. In this association, *wCle* is a nutritional endosymbiont that supplements the bed bug's unbalanced blood diet with B vitamins. The presence of *wCle* has also been reported in developed ovaries, where bacteria infect oocytes ensuring vertical transmission. In the absence of *wCle*, low fecundity and long nymphal period are observed. Understanding the interaction between *wCle* and the bed bug is a priority to develop new pest control methods targeting the disruption of this symbiotic interaction. Our first objective was thus to determine the dynamic of infection in the ovaries and its impact on their development. Our second objective was to characterize the infection pattern of *wCle* in each ovarian tissue, to address the *wCle* dynamics in maturation and determine which tissues can be involved in the vertical transmission of *wCle*. Our results highlight that *wCle* are detectable in female primordial ovaries as soon as the 1st instar nymph. In the adult ovaries, different patterns of infection are observed in the trophic cells, the germinal cells, follicular epithelium, oocytes, pedicels and mesodermic oviduct. These results indicate the critical steps of the ovarian infection dynamic and open hypothesis related to the vertical transmission of *wCle* in bed bugs.

2. Introduction

The bed bug *Cimex lectularius* became a global pest over last decades because of globalization, urbanization, and insecticide resistance (Hwang *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2017; Štefka *et al.*, 2022). This spread has led to serious health and socio-economic challenges (Sheppard *et al.*, 2022). Bed bugs feed exclusively on blood, which is an unbalanced diet lacking B vitamins necessary for insect development and reproduction. Similarly to other strict hematophagous insects, bed bugs are associated with endosymbionts that provide B vitamins (*i.e.* biotin and riboflavin) (Nikoh *et al.*, 2014; Moriyama *et al.*, 2015). In bed bugs, this symbiont is *Wolbachia* (*wCle*), an alphaproteobacterial endosymbiont belonging to the *Rickettsiales* order (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014). The lack of *wCle* induces significant negative effects on the bedbug reproductive abilities (*i.e.*, diminution of the number of laid and hatching eggs) and overall development (*i.e.*, longer nymphal period and smaller adult size) (Hosokawa *et al.*, 2010; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022).

This vertically transmitted endosymbiont is located in the ovaries, composed of seven ovarioles. Like in most of the cimicids, oocyte maturation is telotrophic, meaning that the oocyte in the germarium and the egg in the vitellarium are fed directly by the nutritive cord from the tropharium. Historically referred to as the "end chamber" (Davis, 1956), the tropharium is the apical structure of the ovariole, composed of trophocytes with cytoplasmic prolongations that merge into a syncytial nutritive cord. Below the tropharium, the germarium contains germ-line stem cells (GSCs) and cystoblastes (Davis, 1956). The egg matured in

vitellarium is fertilized when male sperm crosses the pedicel *via* cellular pathways (Mellanby, 1939; Davis, 1964). Previous works showed that egg production in the fertilized female requires a blood meal and also that ovarian development is favored by the presence of spermatozoa in the female (Mellanby, 1939; Davis, 1964). Upon maturation, the pedicel relaxes, allowing the egg to cross the mesodermic and lateral oviduct before laying (Davis, 1964). Adult ovaries were described showing *w*Cle in tropharium, germarium and vitellarium (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). The bacteria is also located in the bacteriome, an oblong shaped symbiotic organs localized on the left and right side of the insect, between the 4th and 5th abdominal tergites (Hertig and Wolbach, 1924; Davis, 1956; Buchner, 1965) and the ovaries.

The localization of *w*Cle is well described in the bacteriome (Article 1), but it is less characterized in the ovaries (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). Although we know that eggs are early infected in ovaries with an early tropism that was supposed to form the future bacteriome (Buchner, 1965; Hosokawa *et al.*, 2010), we do not know which cell type is at the origin of the vertical transmission to the egg. Some studies propose the nutritive cord is a nutrient and *w*Cle supplier to the egg (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020). Moreover, we do not know if the origin of the infection (*n.b.* “infection” is used to define the observation of a new presence of the *w*Cle-endosymbiont in a tissue) of the ovaries is germinal or occurs during the nymphal development, and what is the impact of symbiosis on the development of the ovaries. Thus, we first aimed to determine whether the origin of the infection of the ovaries is embryogenic or occurs during the nymphal development. Second, we aimed to characterize the dynamics of symbiont localization in ovaries, and its potential impact on ovarian development and on the efficiency of vertical transmission. These results will help for the long-term development of novel pest control methods targeting the essential endosymbiont (*i.e.* symbiocides) (Arora and Douglas, 2017).

3. Materials and methods

a. Insects, feeding, rearing

The “F4” strain of *C. lectularius* was sampled in London (UK) in 2008 (Thongprem *et al.*, 2020). Isofemale line F4-V48 was created immediately after sampling and was reared on human blood in Oliver Otti’s lab until 2021 (Dresden, Germany). This line was confirmed by PCR to be negative for torix *Rickettsia* and positive for BEV-like. We fed bed bugs on the Hemotek® system with human blood (blood group: O/A with 170 IU Heparin/Sodium; membrane: parafilm®) provided by the Etablissement Français du Sang (EFS), and heated at $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Colonies were maintained in round plastic jars containing corrugated cardboard harborage shelters (41 mm x 30 mm), at 24 °C, 60 % relative humidity, and with a photoperiod of 12L:12D. Couples were fed weekly on 1 mL of human blood for 10 minutes (Fig. 28).

b. Cohort generation, and nymph sampling for primordial ovary development

Couples from F4 stock were fed weekly on 1 mL of human blood for 30 minutes. The

cohorts were generated as follows: fed couples were isolated in 24-well plates to mate and oviposit for 5 days, then males were removed. After two weeks, females were removed, and nymphs were gathered in round plastic jars containing corrugated cardboard harborage shelters. For each cohort and each nymphal stage, unfed nymphs (UF) (n =10) were sampled from the first nymphs hatched and the remaining nymphs were fed. Molting to the next instar occurred one week after the last meal samplings were performed (UF) as described previously for the following stages (2nd, 3rd, 4th, and 5th instar). Bed bugs were dissected directly in 1X PBS.

c. Generation of aposymbiotic bed bugs

Figure 1 shows the experimental design. To generate aposymbiotic populations: 20 couples of 5th instars were isolated in round plastic jars (x2) and fed on 1 mL blood supplemented with rifampicin-methanol solution [stock solution at 1mg/mL ; 10µL/mL blood] and Kao & Michayluk (KM) vitamins solution [K3129 (Millipore Sigma), 100X stock solution ; 10 µL/mL of blood]. This aposymbiotic stock (SA) was maintained for 15 months with this protocol (G₀-G₁₂, Fig. 28).

After 15 months, to form aposymbiotic-antibiotic-free parental populations (PAV), 20 couples of 5th instars were removed from the rifampicin treatment, placed in round plastic jars (x2) and fed on 1mL blood supplemented with KM vitamins solution [10 µL/mL blood] (G₁, Fig.28). These parental stocks were maintained 24 weeks.

After 24 weeks, to test the effect of wCle on ovarian development, we form aposymbiotic-vitamins-supplemented populations (F4-AV), 20 couples of adults were isolated from PAV in round plastic jars (x2) and fed on 1 mL blood supplemented with KM vitamins solution [10 µL/mM blood] (G₂, Fig. 28).

For each step, the presence of wCle was checked by qPCR (n = 6, see protocol (Article 1))

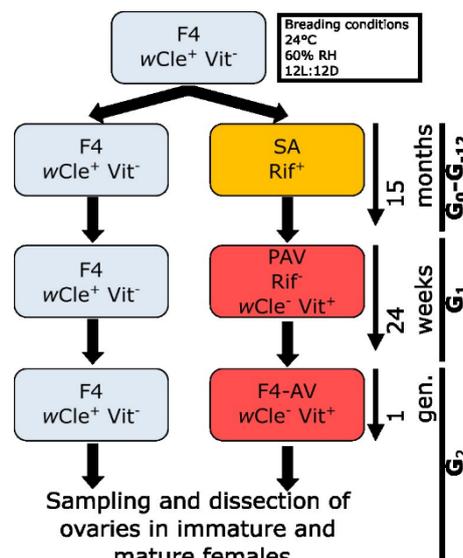


Figure 28. Experimental design of F4-AB breeding.

d. Adult sampling for ovary development

25 fed couples from either F4 or F4-AB of 5th instar were isolated in round plastic jars to molt (X2). After molt, young virgin females (unmature females) were sampled (n = 10) and ovaries were dissected. After 28 days when adults were fed weekly, old mated females (mature females) were sampled (n = 10). Bed bugs were dissected directly in 1X PBS.

e. *Wolbachia* localization using Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

We documented the localization of *w*Cle for each nymphal stage after molting (10 nymphs per instar), using the FISH technique adapted from Thongprem *et al.* (Thongprem *et al.*, 2020). Tissues were dissected in 1X PBS and preserved immediately in PFA 4% in PBS for maximum 2 months at 4°C. All tissue samples were rinsed, permeabilized in acetic acid 70% at 60°C for 1 minute and deproteinized in pepsine 0,1 mg/ml in hydrochloric acid 0,01N for 20 minutes at 37°C. Then prehybridization was carried out for 30 minutes at 54°C in a prehybridization buffer (79% of hybridization buffer, 20% of Denhardt (Ficoll 10%, Polyvinylpyrrolidone 10%, Bovine Serum Albumin 10%), and 1% SDS), prior to hybridization at 54°C in a hybridization buffer (NaCl 0.9 M, Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.2) with 10µM TAMRA-labeled probe targeting *w*Cle (5'-[TAMRA]-AAC CGA CCC TAT CCC TTC G-3' - Integrated DNA Technologies, Inc.). After 3 hours of incubation, samples were then washed with hybridization buffer with SDS 0,1%, rinsed in PBS and distilled water, and immersed overnight in an aqueous mounting medium with an anti-fading agent (Fluoro Gel with DABCO™) with DAPI 3µg/ml. For large views of ovaries, samples were first observed with a Leica DMI8 widefield microscope with the THUNDER imager system, and images were acquired with the K3M monochrome camera. For each sample, multistack images were acquired (two-channels with LED 405 nm and TXRed filter cube / Z stacks) and processed as described: images were first deconvolved using Thunder integrated software with the Small Volume Computational Clearing method. For ovarian tissues observations, samples were observed with a ZEISS LSM 800 confocal microscope and images were acquired with the HSP 120 V monochrome camera.

4. Results

a. *Wolbachia* infects primordial ovaries as early as the first instar

To determine when the infection of the ovaries starts, we investigated by FISH the localization of *w*Cle in the germinal tissue in nymphs of each instar (n = 8-10 per instar) (Fig. 29 and interpretative scheme in Fig. 31, left panel).

In general, throughout development, the *w*Cle infection profile was clearly distinct between the bacteriome cells, which harbor polyploid large nuclei and whose cytoplasm is fully filled by *w*Cle, and the germinal cells, which can be small undifferentiated uninfected cells or bacteriome-like cells that we will name “primordial ovarian bacteriocytes” (See 1st and 2nd instar of Fig. 29A). We observed a thin cellular connection between bacteriomes and germinal

tissues in both sexes from 1st to 4th instar (Fig. 29B and 29C). We confirmed the collapse of that connection at 5th instars females onwards (Buchner, 1965; Chang and Musgrave, 1973).

We observed *w*Cle in each primordial ovary from the 1st instar to 5th instar onwards (Fig. 29A). At 1st and 2nd instars, *w*Cle were localized in primordial ovarian bacteriocytes with larger nucleus and strong FISH signal. These primordial ovarian bacteriocytes were present in each of the 7 ovarioles composing the primordial ovary. From first instar, endosymbionts were both occupying the whole cytoplasm of an increasing amount of primordial ovarian bacteriocytes and concentrating in a syncytial inner space of each ovarioles (Fig. 29A). We observed the development of the distinguishable part of the future ovaries at the 4th instar, forming a distinct ascus with ubiquitous localization of *w*Cle. Finally, at 5th instar, *w*Cle was well concentrated in the upper middle of the primordial ovaries that will form the tropharium, while weak signal remained in future germarium, vitellarium, pedicel and mesodermic oviduct. Thus, infection of future tropharium, germarium, vitellarium and pedicel occurred during nymphal development in primordial ovaries.

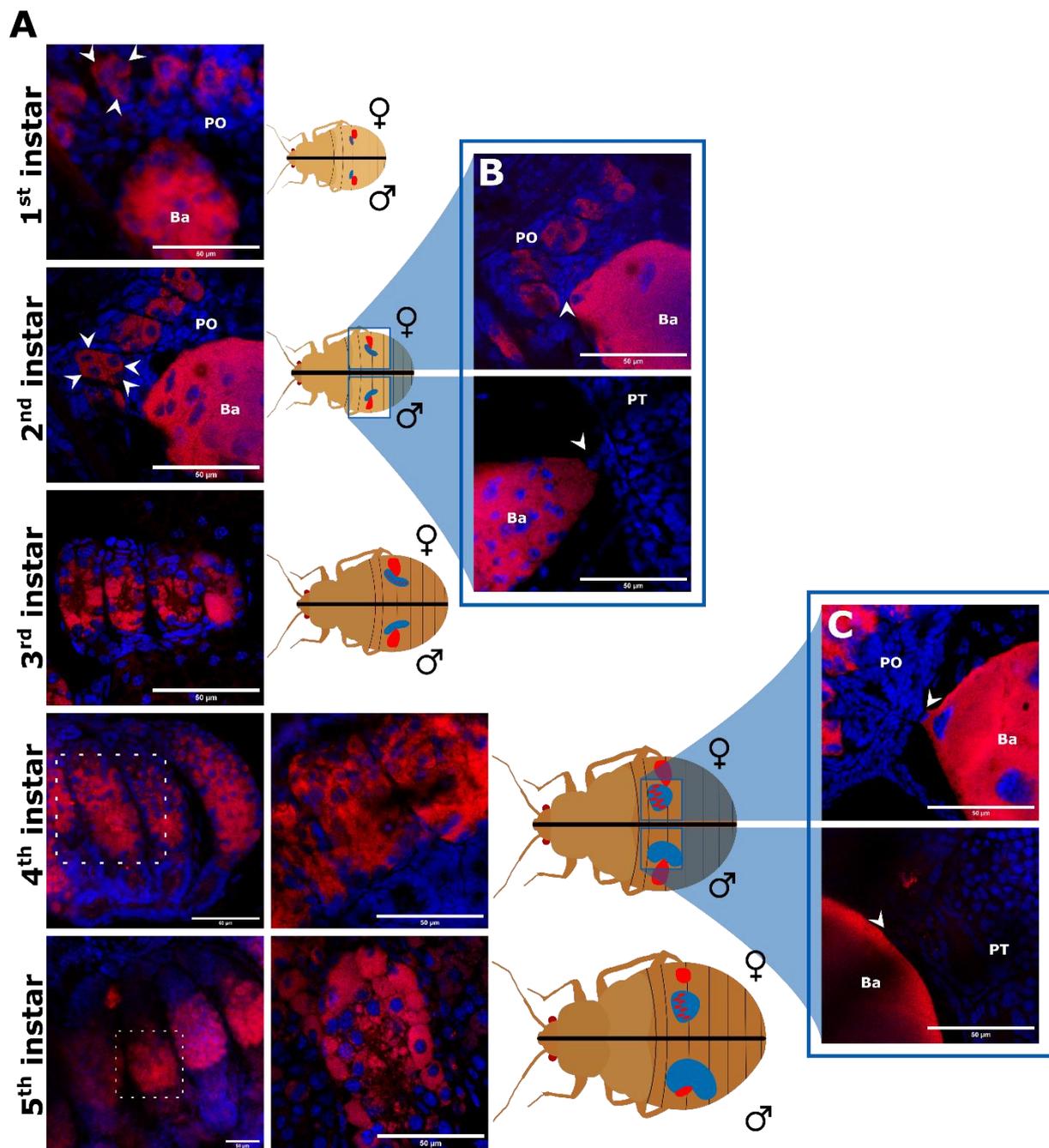


Figure 29. FISH visualization of *wCle* in the gonads over bed bug development. **A.** FISH visualization of *wCle* in nymphal female primordial ovaries, for 1st and 2nd instar bacteriomes (Ba). Some primordial ovaries (PO) and primordial ovarian bacteriocytes (arrows) are highlighted. Schemes represent infected tissues (bacteriomes and primordial ovarian bacteriocytes) in red and uninfected tissues (primordial gonads) in blue for both sexes (upper half: male; lower half female). **B-C** FISH visualization of the cellular connection between the bacteriome (B) and the primordial gonad (PO and PT) of 2nd instar (B) and 4th instar (C) male (top) and female (bottom). Arrows show the thin connection between bacteriome and primordial gonads. In red: *wCle*; in blue: eukaryotic nuclei (DAPI). All views are oriented from following the antero-posterior axis.

b. Wolbachia localization changes during ovarian maturation

To characterize the infection profiles and impact of *wCle* on ovary maturation in adults, we investigated by FISH the localization of *wCle* in ovaries of 1-day young virgin females (*i.e.*, immature female) and 28-days old mated females (*i.e.*, mature female). FISH signal was observed in the tropharium, the germarium, the vitellarium and the pedicel of both immature females and mature females (Fig. 30 and interpretative scheme in Fig.31, right panel).

First, an enlargement of the ovarioles (Table S1) occurred during the maturation of the ovaries, likely attributed to oogenesis (Fig. 30B). Within the tropharium of both groups, the infection was distributed heterogeneously: in the periphery of the tissue, some trophocytes with large nuclei were free of *wCle* while others presented high staining suggesting a high concentration of *wCle*. The nutritive cord formed by the syncytial merging of trophocytes harbored several *wCle* spots.

In the germarium of immature females, *wCle* was primarily localized in aligned cystoblasts (Fig. 30B and C). These cystoblasts formed a ring-shaped delimitation with the tropharium, whereas in mature females, the distribution of *wCle* was more diffuse throughout GSCs and extended towards the upper part of the vitellarium yolk.

The vitellarium exhibited notable differences between immature females and mature females (Fig. 30D). While no endosymbiont was observed in the yolk of the vitellarium in immature females, *wCle* was observed in the germinal part extending toward the pedicel part in mature females. In mature females, a weak signal of *wCle* was detected in the follicular epithelium of the vitellarium, where *wCle* distribution was non-uniform and predominantly localized in the vitellus-connected segment.

Lastly, a substantial presence of *wCle* was evidenced in the pedicel, syncytial body and mesodermic oviduct of immature females, while in mature females, only few spots of infection were identified within the pedicel sheeted tissue and the mesodermic oviduct (Fig. 30E).

c. No effect of Wolbachia on the ovarian tissues

This study, like others (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020), shows that *wCle* is present in several ovarian tissues, like the tropharium, that could be linked to the nutritional supplementation, including B vitamins, during oogenesis. Because ovarian tissues could degenerate when endosymbionts are not infecting ovaries, we questioned the impact of the absence of *wCle* (but not B-vitamins) on the ovaries structure. To do so, we compared by microscopy the ovaries of symbiotic and aposymbiotic immature and mature females. Importantly, aposymbiotic females were continuously fed with vitaminized blood meals to allow the nymphal development. Under these conditions, apart from the presence or absence of symbionts, we did not observe any difference in the structure of the ovaries between symbiotic and aposymbiotic ovaries for both immature and mature females (Fig. 30).

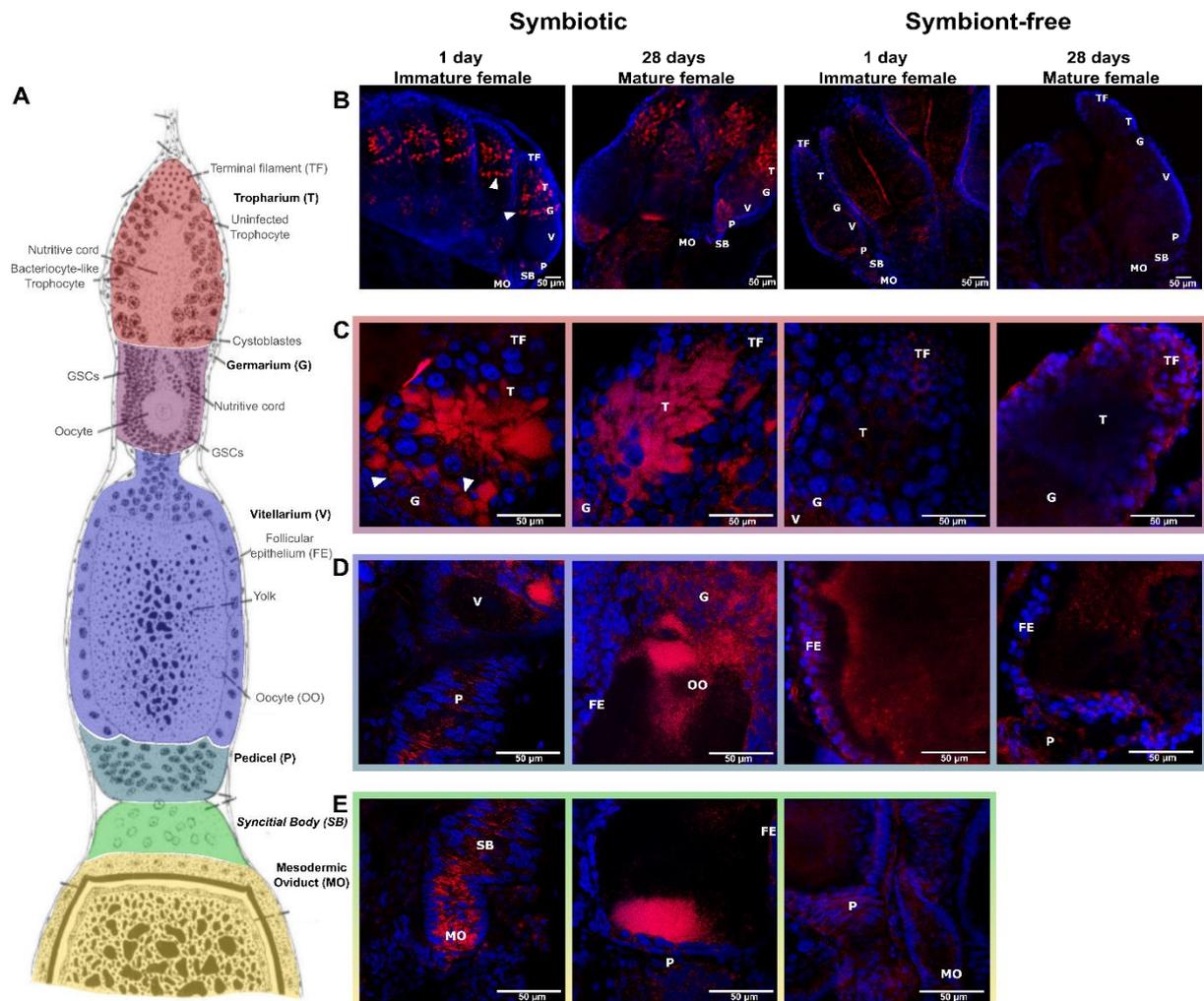


Figure 30. Ovarian infection and maturation by *wCle* in adult female. **A.** Scheme of an ovariole (adapted from Davis *et al.* 1956 (Davis, 1956)). The color code indicates the following regions of the ovariole: tropharium (T, red), germarium (G, purple), vitellarium (V, blue), pedicel (P, cyan), syncytial body (SB, green), and mesodermic oviduct (MO, yellow). The same abbreviations are used in all the figure. **B.** Epifluorescence microscopy of the complete ovary with its seven ovarioles. White arrows indicate cystoblasts that form a ring-shaped delimitation between the tropharium and the germarium. **C.** Confocal microscopy of the tropharium and upper germarium. White arrows indicate “cystoblast-belt”. **D.** Confocal microscopy of lower germarium and the upper vitellarium. **E.** Confocal microscopy of the lower vitellarium, pedicel, syncytial body and mesodermic oviduct. For figure **B** to **E**; from the left to the right: ovaries of symbiotic 1 day old immature female; symbiotic 28 day old mature female, aposymbiotic 1 day old immature female, aposymbiotic 28 day old mature female. In red: *wCle*; in blue: bacteriocyte nuclei (DAPI). All views are oriented following the antero-posterior axis. Scale bars: 50 μm .

5. Discussion

In this study, we described the dynamics of the localization of the obligate nutritional endosymbiont *wCle* in bed bug ovaries. We observed: (a) the presence of *wCle* in primordial ovaries from 1st instar onwards; (b) different patterns of infection in ovarian tissues throughout host development; (c) no direct effect of *wCle* on the ovary structure when supplemented with B-vitamins.

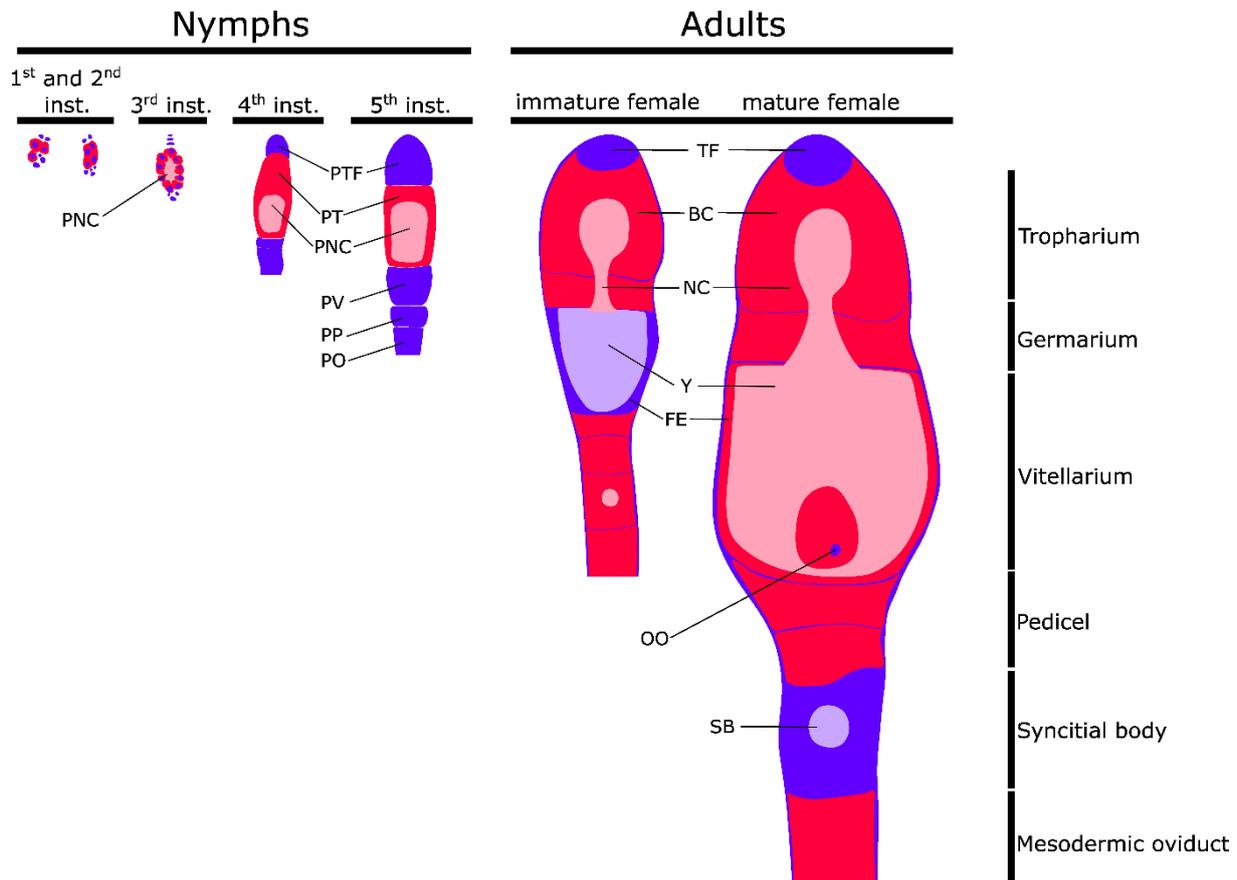


Figure 31. Interpretative scheme of the infection profile of one ovariole through development. Red color represents *wCle* infected tissues and blue color represents non-infected tissues. Syncytial areas are colored in light red if infected or light blue if not. They are firstly observed at 3rd instar, and form the primordial nutritive cord (PNC). Ovarioles tissues differentiate at 4th and 5th instar with, on the apical part the uninfected primordial terminal filament (PTF), followed by the primordial tropharium (PT) and germarium, the primordial vitellarium (PV), the primordial pedicel (PP) and the primordial oviduct (PO). Ovariole tissues differentiate at adult stage, here exemplified with the representation of ovarioles from a 1-day immature female and a 28-days mature female. Terminal filament (TF) shield the tropharium composed of bacteriocyte-like infected cells (BC) merging into nutritive cord (NC). In the vitellarium, oocytes (OO) are infected in yolk (Y). In the mature females, the follicular epithelium (FE) shows low *wCle* infection and the syncytial body (SB), which contains spermatozooids in mature females, is not infected.

If we focus on the initial colonization process, we showed that *w*Cle infection occurred in bacteriocytes but also in nymphal primordial ovaries as early as the 1st instar, and that bacteriomes were linked by a thin connection to the primordial gonads since 1st instar of both sexes. Consequently, the colonization by *w*Cle of an embryonic tissue that differentiates into bacteriomes and ovaries cannot be excluded. In this line, the early infection of both ovaries and bacteriomes is consistent with the infection of the posterior area of the oocyte, which has been described in other works (Buchner, 1965; Hosokawa *et al.*, 2010). The early infection pattern of symbionts is not restricted to bed bugs and is also observed in planthoppers (Buchner, 1965), heteropterans (Küchler, Dettner and Kehl, 2010; Matsuura *et al.*, 2012; Swiatoniowska *et al.*, 2013), cottony cushion scales (Niznik and Szklarzewicz, 2007). In some other insects, endosymbionts from bacteriocytes invade ovaries during their development or maturation (Büning, 1995; Szklarzewicz and Michalik, 2017) like in scale insects (Kupper *et al.*, 2016), mallophagans (Fukatsu *et al.*, 2007), cockroaches (Sacchi *et al.*, 1988), termites (Bandi and Sacchi, 2000) and weevil (Maire *et al.*, 2020). An early transfer of *w*Cle between primordial bacteriomes and ovaries (but not testis) could also occur through the link connecting both structures. This link was not observed anymore at 5th instar females, while it remained in males.

In *C. lectularius*, two other facultative endosymbionts have been described in adult ovaries: a torix *Rickettsia* (Thongprem *et al.*, 2020) with a low prevalence (Potts *et al.*, 2020) and a γ -proteobacteria (Hosokawa *et al.*, 2010) of the *Symbiopectobacterium* family, known as BEV-like for “Bacterial symbiont of *Euscelidius variegatus*” (Hypša and Aksoy, 1997; Degnan *et al.*, 2011; Nadal-Jimenez *et al.*, 2022). The early infection of the ovaries by *w*Cle does not mean a similar pattern for the facultative endosymbionts of bed bugs. Indeed, in some insects possessing two or more types of symbionts, such as the cottony cushion scale *Icerya purchase* (Niznik and Szklarzewicz, 2007) or the planthopper *Cixius nervosus* (Szklarzewicz *et al.*, 2007), primary endosymbionts invade the nymphal ovaries, whereas the secondary endosymbionts infest the older oocytes in the ovaries of the adult female. Thus, further observation of the dynamic of the infection of the ovaries by BEV-like and torix *Rickettsia* would be interesting to complete the understanding of the system.

We also observed an increasing number of primordial ovarian bacteriocytes in nymphal primordial ovaries. Since the 3rd instar, these primordial ovarian bacteriocytes surround a primordial syncytium that will form the vitellarium. This pattern is observed in the hemimetabolous slender pigeon louse, *Columbicol columbae* (Hosokawa *et al.*, 2007) or in some insects from the *Psylloidea* family (Kot *et al.*, 2016). Development was then accompanied by a rearrangement of *w*Cle localization that continued after the imaginal molt and ovarian maturation. Indeed, *w*Cle localization varied in germarium, vitellarium and follicular epitheliums before and after the last ovarian maturation. For instance, fully infected cystoblasts were aligned in the upper layer of the germarium in immature females, while infected cystocytes were localized in the whole tissue in mature females. In the vitellarium yolk and the follicular epithelium, no infection was observed in immature females, while *w*Cle was observed in these

tissues after maturation. Changes in the tissue tropism after adult emergence has also been reported in other endosymbiotic insects. For example, in the weevil, young females harbor bacteriocytes in their tropharium, while in one-week old females, upon sexual maturation, the amount of primordial ovarian bacteriocytes increases and endosymbionts can be observed in the germarium (Ferrarini *et al.*, 2022). The presence of *wCle* in several tissues of the ovaries is consistent with the observation that ovarioles of *C. lectularius* are infected by the endosymbiont before the differentiation of tissues. It would be interesting to understand the mechanisms that restrict the presence of *wCel* in specific cells or tissues of the developing ovaries. Primordial ovaries microdissection combined with RNA sequencing could address this regulation.

Together, the early infection of ovaries and the observation of infection in tissues that were not described so far raise new questions concerning the mechanisms involved in the vertical transmission of *wCle*. Contrary to many insect species in which symbionts released from the bacteriocytes invade full-grown oocytes posterior pole (Buchner, 1965; Szklarzewicz and Michalik, 2017), *wCle* already establishes in bed bug tissues since embryogenesis, in particular in dividing germ cell (cystocytes). Several tissues are thus candidate to play a role in the vertical transmission of *wCle*. The infection of through the tropharium and nutritive cord was already presented as a candidate (Hosokawa *et al.*, 2010) like in other insects (Niznik and Szklarzewicz, 2007; Szklarzewicz *et al.*, 2013). Yet, the aligned cystoblasts observed in immature females could also divide in infected oocytes, like it has been observed in several insects from the *Artheneidae* (*Chilacis typhae*), *Blissidae* (*Ischnodemus sabuleti*), and *Lygaeidae* (*Arocatus longiceps*, *Kleidocerys resedae*, *Nysius ericae*, and *Nithecus jacobaeae*) (Kuechler *et al.*, 2012; Matsuura *et al.*, 2012; Swiatoniowska *et al.*, 2013). In that case, the endosymbiont would infect the previtellogenic oocyte. Because *wCle* is also present in the follicular epithelium, cells from this epithelium could also play a role in the transmission of symbionts to the developing oocyte. In the carpenter ant *Camponotus floridanus*, where nurse cells are not infected by the nutritional endosymbiont *Blochmannia floridanus*, the infection occurs during the growth of the oocyte in the vitellarium. *B. floridanus* is then transmitted into the oocyte from follicular epithelium via an exocytosis-endocytosis mechanism (Kupper *et al.*, 2016). With the wide repartition of *wCle* in the ovarian tissues, we cannot exclude that vertical transmission could be a mix of all or some of the previously described models.

Finally, we did not show any difference between symbiotic ovaries and aposymbiotic ovaries from females complemented with B-vitamins. The role of *wCle* in ovaries development and maturation thus seems negligible in presence of vitaminic supplementation, contrary to what is observed in bacteriome development. These results suggest that either the presence of endosymbionts is not required for the normal development of ovaries or that vitamins supplementation rescues this development. Testing the effect of B-vitamins starvation on the development of ovaries would be interesting while difficult to do, as aposymbiotic bed bugs deprived of B vitamins do not develop properly (Hickin, Kakumanu and Schal, 2022).

Because *wCle* is necessary for bed bugs to develop on blood diet (Hosokawa *et al.*, 2007, 2010), one relevant approach to address the issues of bed bugs infestation is to eliminate *wCle* from the ovaries or to prevent its transmission to the eggs (Arora and Douglas, 2017). The results presented here will help to identify critical points. First, the infection of the primordial ovaries occurs before the hatching of the 1st instar, so avoiding vertical transmission by disrupting the ovarian infection would require different methods to those used when infection occurs during the nymphal development of the insect. Second, as *wCle* is spread in several ovarian tissues that could be involved in vertical transmission, a clear identification of the tissues involved in *wCle* transmission could target the search for candidates in specific tissues at specific developmental stages.

Conclusion de l'étude et perspectives

Nos résultats mettent en évidence que *wCle* est présente dans les ovaires primordiaux dès le 1^{er} stade nymphal. Dans les ovaires de l'adulte, différents patrons d'infection sont observés au niveau des cellules de tropharium, du germarium, de l'épithélium folliculaire, du vitellarium, du pédicelle et de l'oviducte mésodermique. L'infection précoce des ovaires n'a jamais été décrite auparavant, ni la localisation précise de *wCle* dans les tissus reproducteurs. Ces résultats indiquent les potentielles étapes critiques de la transmission verticale de *wCle* chez les punaises de lit. Une observation plus précise de ces tissus par TEM permettra d'émettre des hypothèses quant à la fonction de *wCle* dans chaque tissu et d'identifier les tissus impliqués dans la transmission verticale de *wCle* ou d'autres fonctions dont la perturbation pourrait servir la lutte contre *C. lectularius*.

Étude complémentaire

I. Introduction

De nombreuses études dont la nôtre ont localisé *wCle* dans les bactériomes. Cette localisation n'a été observée que du point de vue tissulaire par hybridation *in situ* chez les adultes et les nymphes à jeun (Hosokawa *et al.*, 2010). Au niveau des ovaires, les trophocytes n'ont également été observés que chez la femelle adulte (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020) L'objectif de cette étude complémentaire est donc de vérifier par microscopie TEM la variation au cours du développement nymphal de la localisation cellulaire de *wCle* dans les bactériomes et dans les ovaires.

2. Matériels et méthodes

a. Génération de cohortes et prélèvement de nymphes pour le développement de l'ovaire

Les couples de la lignée F4-V48 ont été nourris chaque semaine avec 1 mL de sang humain pendant 30 minutes. Les cohortes ont été générées comme suit : les couples nourris ont été isolés dans des plaques à 24 puits pour s'accoupler et pondre pendant 5 jours, puis les mâles ont été retirés. Au bout de deux semaines, les femelles ont été retirées et les nymphes ont été rassemblées dans des bocaux ronds en plastique contenant des abris en carton ondulé. Pour les stades nymphaux 4 et 5, des nymphes femelles non nourries ont été échantillonnées parmi les premières nymphes écloses (n = 3 par stade) et les nymphes restantes ont été nourries. Les nymphes qui ne se nourrissaient pas ont été supprimées. Après émergence des adultes, des femelles non nourries ont été échantillonnées 1 jour après leur mue imaginale (n = 3) et les adultes restants ont été nourris chaque semaine pendant 4 semaines. À 4 semaines des femelles ont été échantillonnées (n = 3)

b. Dissection et cryofixation des bactériomes et des ovaires

Toutes les manipulations suivantes ont été réalisées au Centre Technologique des Microstructures (CTμ, Université Claude Bernard Lyon 1, France). Chaque bactériome des femelles du 4^e et du 5^e stade a été disséqué dans du PBS avec l'ovaire à proximité et la cuticule, afin de conserver la cohérence des tissus. Chez les femelles âgées de 1 ou 28 jours après la mue imaginale, seuls les ovaires ont été disséqués avec pour chaque échantillon, l'ovaire gauche complet et un ovariole issu de l'ovaire droit. Les échantillons ont été placés dans des planchettes en laiton préalablement recouvertes de lécithine à 10 % et de 2 % de tétr oxyde d'osmium. Les planchettes ont été directement chargées dans le congélateur haute pression HPM 010 et surgelées rapidement. Après congélation, les échantillons ont été placés dans un appareil de substitution Leica EM AFS II Freeze et incubés à -90 ° C pendant 30 heures dans un tampon de substitution (1% d'osmium, 0,25% d'uranyle, 0,5% de glutaraldéhyde, 1,5% de H₂O dans de l'acétone), puis progressivement chauffés à -30 ° C (+5 ° C/heure) et maintenus à température pendant 24 heures. Les échantillons ont été lavés avec de l'acétone froid à -30 ° C, puis chauffés progressivement jusqu'à 20 ° C (+10 ° C/heure). Les échantillons ont été placés dans 25 % d'épon dans l'acétone pendant 3 heures, 50 % d'épon dans l'acétone pendant 17 heures, puis à 75 % d'épon dans l'acétone.

c. Localisation de *Wolbachia* par TEM

Les coupes ont été réalisées sur un ultramicrotome Ultracut E avec d'un couteau diamanté (Diatome) et montées sur des grilles de cuivre. Des coupes ultra-fines (100 nm) ont été observées à 80 keV à l'aide d'un microscope électronique JEOL 1200. Des coupes semi-fines (200 nm) ont été observées au microscope à épifluorescence Leica THUNDER Imager 3D Assay. Des micrographies électroniques de coupes standards ont été prises avec le logiciel EMMenu 4.0.9.31 (Tietz) et analysées à l'aide d'ImageJ 1.53c.

3. Résultats

Nous avons préparé pour la TEM des bactériomes de nymphes au stades 4 et 5. Sur ces six échantillons (stade 4 : $n=3$ et stade 5 : $n=3$), une seule paire de bactériomes au stade 4 a pu être observée. Dans ces bactériomes, les *w*Cle occupent tout le cytoplasme des bactériocytes. Des successions de vacuoles contiguës sont observées en périphérie des bactériocytes (Figure 32A). Des *w*Cle sont observées dans certaines de ces vacuoles (Figure 32B).

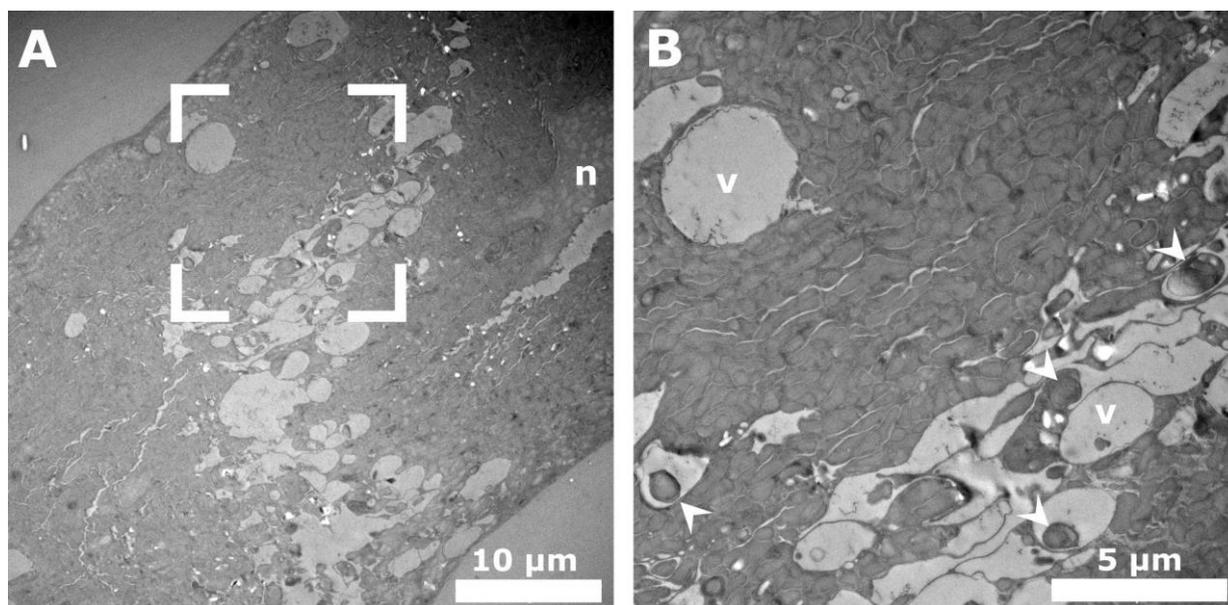


Figure 32. Observation par TEM d'un bactériome de nymphe de stade 4. **A.** Visualisation de *w*Cle qui entoure le noyau (n) dans les bactériocytes et des vacuoles en périphérie des bactériocytes. **B.** Grossissement d'une zone d'intérêt. *w*Cle occupe le cytoplasme, les flèches blanches pointent vers certains *w*Cle présents dans des vacuoles (v).

Nous avons préparé pour la TEM des ovaires de femelles adultes âgées de 1 jours ou 28 jours après leur mue imaginale. Parmi ces six échantillons (1 jours après mue : $n=3$ et 28 jours après mue : $n=3$), un seul ovaire a pu être observé, celui-ci chez une femelle âgée de 28 jours. Nous observons la localisation de *w*Cle dans le tropharium (Figure 33A, B, C), l'épithélium folliculaire (Figure 33D et E), le vitellarium (Figure 33F), et le pédicelle (Figure 33G et H). Dans le tropharium, la présence de *w*Cle est forte. Certains endosomes sont observés (Figure 33B). Les bactéries sont densément regroupées dans des vacuoles, où certaines présentent des patrons de dommage cellulaire (Figure 33C). Dans les autres tissus que le tropharium, *w*Cle infecte avec une densité plus faible le cytoplasme des cellules et forme une triple membrane (Figure 33D, E, G et H). Dans les cellules épithéliales folliculaires, *w*Cle est concentrée dans un bourgeon apical en contact avec le vitellarium (Figure 33E).

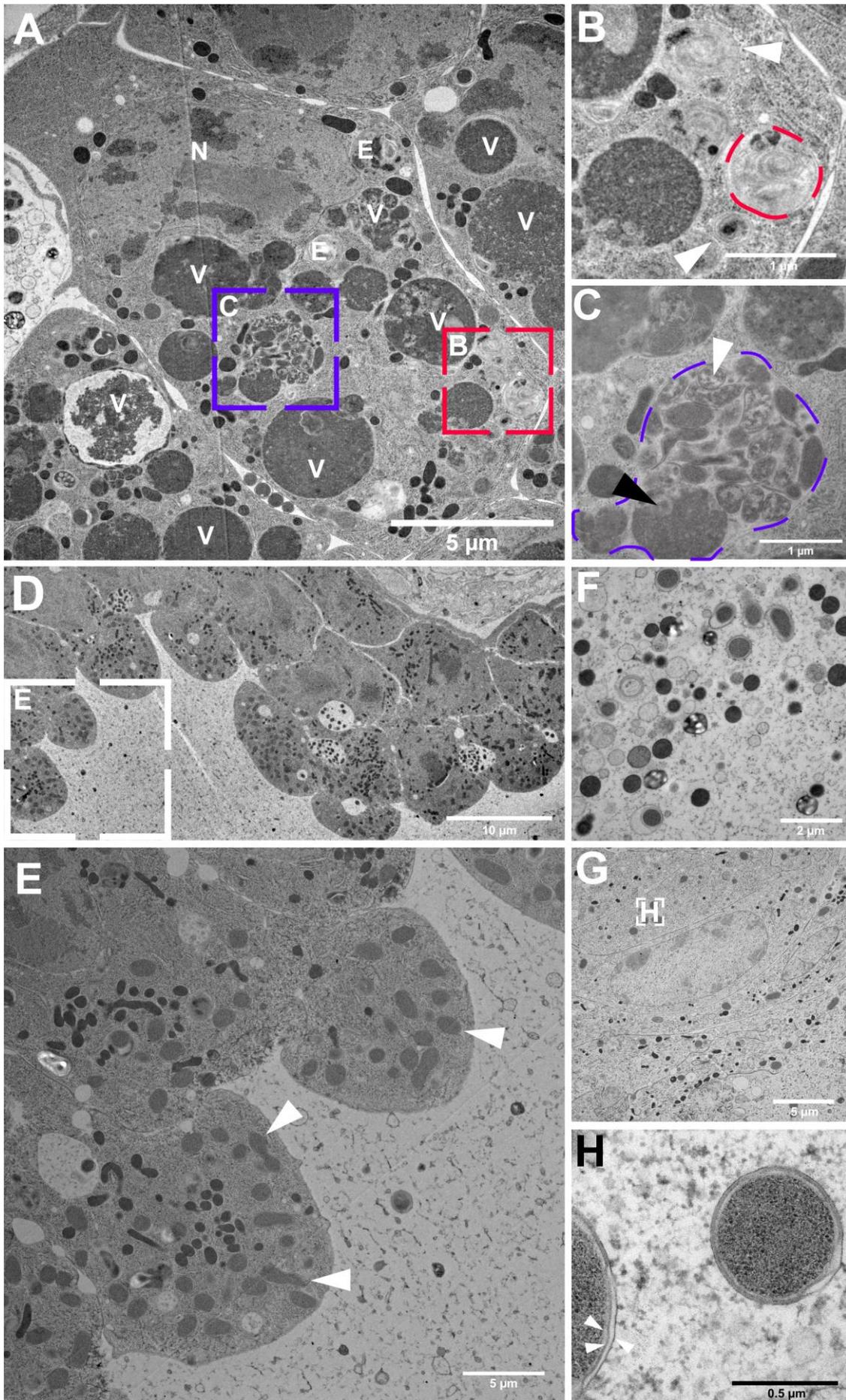


Figure 33 Observation par TEM d'un ovaire d'adulte à 28 jours. **A.** Visualisation de *w*Cle dans un trophocyte avec son noyau (N), ses nombreuses vacuoles (V) et ses endosomes (E). **B.** Grossissement sur un endosome délimité par des pointillés rouges, d'autres endosomes sont indiqués par des flèches blanches. **C.** Grossissement sur une vacuole délimitée par des pointillés violets, la flèche blanche indique un exemple de *w*Cle en dégradation la flèche noire indique un lysat. **D.** Visualisation de *w*Cle dans l'épithélium folliculaire **E.** Grossissement sur un bourgeon apical d'une cellule de l'épithélium folliculaire. Des exemples de *w*Cle sont désignés par des flèches blanches. **F.** Visualisation de *w*Cle dans le vitellarium. **G.** Visualisation de *w*Cle dans le pédicelle. **H.** Grossissement sur des *w*Cle infectant le pédicelle, les flèches indiquent les 3 membranes qui enveloppe l'endosymbiote.

4. Discussion

Cette étude constitue une première approche. Elle a permis la mise en place des protocoles pour l'observation par TEM des bactériomes et ovaires de *C. lectularius*. Cependant, de nombreux échantillons n'ont pas présenté une assez bonne tenue des tissus, provenant certainement d'un défaut dans le protocole de fixation. La réduction du nombre d'échantillons interprétables nous empêche de conclure sur cette étude mais pose des questions intéressantes quant à l'interaction entre *w*Cle et la punaise de lit dans les bactériomes et les ovaires.

Premièrement, dans l'ovaire d'une femelle âgée de 28 jours, l'observation de *w*Cle dans le tropharium, le vitellarium, les cellules de l'épithélium folliculaire et le pédicelle va dans le sens des observations réalisées par FISH, montrant la présence de *w*Cle dans ces tissus. Il serait cependant intéressant d'observer si une différence de patron d'infection des cystoblastes et des ovocytes primordiaux existe dans le germarium des femelles âgées de 1 jours et de 28 jours.

Deuxièmement, dans le bactériome de la nymphe de stade 4 et dans le tropharium de la femelle âgée de 28 jours, nous observons des structures vacuolaires, avec dans le tropharium des structures d'endosomes. Ces structures semblent témoigner d'une activité lytique et ont déjà été décrites dans les bactériomes de *C. lectularius* comme des « symblyosomes » potentiellement impliqués dans l'élimination de *w*Cle par autophagie (Chang and Musgrave, 1973; Chang, 1974). Cette élimination pourrait être un mécanisme de contrôle de la densité en symbiote. Alternativement, considérant la fonction nutritionnelle de *w*Cle (Hosokawa *et al.*, 2010), nous pouvons faire l'hypothèse que dans ces tissus, la lyse de *w*Cle pourrait libérer dans l'hémolymph ou le cordon nutritif les vitamines B synthétisées par *w*Cle. L'autophagie de *w*Cle dans les bactériocytes pourrait assurer le développement normal de l'hôte, alors que l'autophagie dans les trophocytes pourrait permettre le développement de l'œuf. Des exemples d'autophagie de *Wolbachia* ou de symbiotes nutritionnels existent dans la littérature. Chez la drosophile, la wolbophagie (c'est-à-dire l'autophagie de *Wolbachia* (Hargitai *et al.*, 2022)) est nécessaire pour son élimination rapide en cas de lésion des bactéries *via* l'inhibition de la synthèse des protéines bactériennes (Voronin *et al.*, 2012). Chez le charançon des céréales, *S.*

pirantonius fournit des acides aminés comme précurseurs de la synthèse de la cuticule de l'insecte dès la première semaine de l'âge adulte (Vigneron *et al.*, 2014; Dell'Aglio *et al.*, 2023). Lorsque la cuticule est formée, une clairance des symbiotes par des mécanismes apoptotiques et autophagiques du charançon permet le recyclage de des ressources énergétiques de *S. pirantonius* vers son hôte (Vigneron *et al.*, 2014). Chez le puceron *Brevicoryne brassicae*, à tous les stades de développement, des symbiotes dégénérés sont observés au sein des bactériocytes. La clairance est provoquée par l'action des symblyosomes et les symbiotes libérés dans l'hémolymphe sont digérés par les hémocytes phagocytaires (Hinde, 1970). Dans le corps adipeux des blattes, les bactéries s'agrègent en une seule masse dans une poche vitelline avec une lyse bactérienne associée au vitellophage (Milburn, 1966; De Piceis Polver *et al.*, 1986; Latorre *et al.*, 2022). Enfin, chez le puceron *A. pisum*, lorsque l'âge adulte est atteint, *B. aphidicola* est lysée dans le réticulum endoplasmique, qui englutit individuellement les endosymbiotes et forme des vacuoles lipidiques (Simonet *et al.*, 2018).

Finalement, les observations décrites devront être confirmées sur un plus grand nombre d'individus. D'autres observations pourront aussi être réalisées, comme le suivi de la dynamique de la localisation dans des bactériomes de mâles nourris ou à jeûn, afin d'y étudier l'effet physiologique du stress nutritif et l'élimination de *wC1e* dans ce contexte que l'on sait maintenant particulier. Enfin, une analyse transcriptomique qui testerait la régulation immunitaire ou métabolique, par exemple sur l'expression des gènes codant pour les facteurs d'autophagie (Malagoli *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2022) dans les ovaires de femelles ou dans les bactériomes avant et après la mue imaginale, sera nécessaire pour soutenir l'hypothèse d'une autophagie de *wC1e* lors de ces étapes critiques de l'interaction. Ces résultats pourront être combinés à une visualisation de ces facteurs d'autophagie par immunomarquage en microcopie.



-Partie III-
Perspectives

I | Impacte des études sur la compréhension du modèle

Sommaire

Problématiques d'élevages et perspectives d'amélioration	109
1. Effet de la structure des populations sur les protocoles expérimentaux.....	109
2. Une mortalité inexpliquée au laboratoire, entre résilience et sérendipité	110
Un symbiote nutritionnel à la dynamique multifactorielle	112
1. Une localisation précise et une quantité variable	112
2. <i>Wolbachia</i> chez <i>C. lectularius</i> entre nutrition et transmission.....	114
II. Impact des études sur la compréhension du modèle	119
L'utilisation de la symbiose dans la lutte contre <i>C. lectularius</i>	119
1. Cibler la transmission verticale ?	119
2. Le jeûne : un allié de la lutte par l'utilisation de symbiocide ?.....	120
Le rôle des symbiotes secondaires	121
1. BEV-like : un symbiote sous-estimé ?.....	121
2. <i>Wolbachia</i> et BEV-like permettent-ils la résistance aux insecticides ?	121

Problématiques d'élevages et perspectives d'amélioration

I. Effet de la structure des populations sur les protocoles expérimentaux

La souche F4 utilisée dans cette thèse a été caractérisée dans une seule étude (Thongprem *et al.*, 2020). Cette étude, discutant notamment de l'impact du symbiote secondaire torix *Rickettsia* sur la ponte, le développement et le ratio mâle/femelle, présente quelques mesures de traits d'histoire de vie. Le temps de développement du premier stade au stade adulte est

d'environ 28 jours (27°C, 70% HR). Certaines études travaillant chacune sur des souches différentes montraient des temps de phase nymphale variant entre 24 jours (25°C, 75% HR) (Johnson, 1941), dix semaines (25°C) (Hosokawa *et al.*, 2010) et huit semaines (27°C, 45% HR) (Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). La variation des souches, des conditions d'élevage et des effectifs étudiés peuvent expliquer les différences observées de temps de développement entre notre souche F4 bisymbiotique et les autres souches déjà étudiées (Johnson, 1941; Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020; Hickin, Kakumanu and Schal, 2022). En particulier, nous supposons que notre protocole expérimental consistant à isoler les punaises en effectif réduit et par stade a pu avoir un impact important sur les différences de trait d'histoire de vie mesurées avec ceux des autres études. Dans le sens de cette hypothèse, certains travaux montrent une accélération du développement nymphal de 100% lorsque les nymphes sont élevées avec des adultes et en groupe indépendamment de la composition de celui-ci (Saenz *et al.*, 2014). Des améliorations à nos protocoles expérimentaux peuvent donc être envisagées comme en une augmentation de l'effectif de nos punaises et la présence systématique d'adulte dans les pots. Ces modifications ont été appliquées dans les élevages stocks.

2. Une mortalité inexpliquée au laboratoire, entre résilience et sérendipité

L'amélioration des élevages ne passe pas seulement par la structure des populations. Cette thèse a commencé avec la mise en place des élevages. Dès les premiers mois, plusieurs évènements avec des pics de mortalité pouvant atteindre 70% d'une population (indépendamment de la densité) ont été observés. Tous les stades et tous les sexes peuvent être touchés. Les punaises atteintes prennent une teinte sombre et ont un abdomen élargi (Figure 34). Nous avons appelé ce phénotype « gorgé noir » car survenant occasionnellement dans la semaine suivant la prise d'un repas sanguin. Ce phénotype a été observé dans d'autres élevages de punaises mais aussi d'hématophages stricts (e.g. mouche tsétsé, tique) mais n'est pas documenté. Aujourd'hui encore nos élevages peuvent subir des baisses sensibles de leur population par ce phénomène que nous ne maîtrisons pas.

La poursuite des travaux sur la punaise de lit requiert un contrôle sur cette mortalité et donc une identification de la cause du phénomène. Parce que cet évènement survient dans des élevages dont les conditions sont *a priori* stables (i.e., enceintes climatiques avec température et hygrométrie contrôlées), nous supposons que le déclenchement de cette mortalité est lié un facteur latent présent dans les populations. Celui-ci pourrait être d'origine exogène comme un entomopathogène (e.g. un virus, un champignon, une bactérie, une toxine) ou endogène comme un dysfonctionnement physiologique (e.g. prise de repas trop conséquente, perturbation du microbiote). Sur ce dernier exemple, il a été montré que chez *Glossinida sp.* la perte du symbiote nutritionnel *Wigglesworthia* entraîne une perte de la capacité à digérer le sang, un abdomen gonflé et une augmentation de la mortalité (Pais *et al.*, 2008). Le sang est une source de nourriture avec un fort pouvoir oxydant (Sterkel *et al.*, 2017). Une perturbation du microbiote

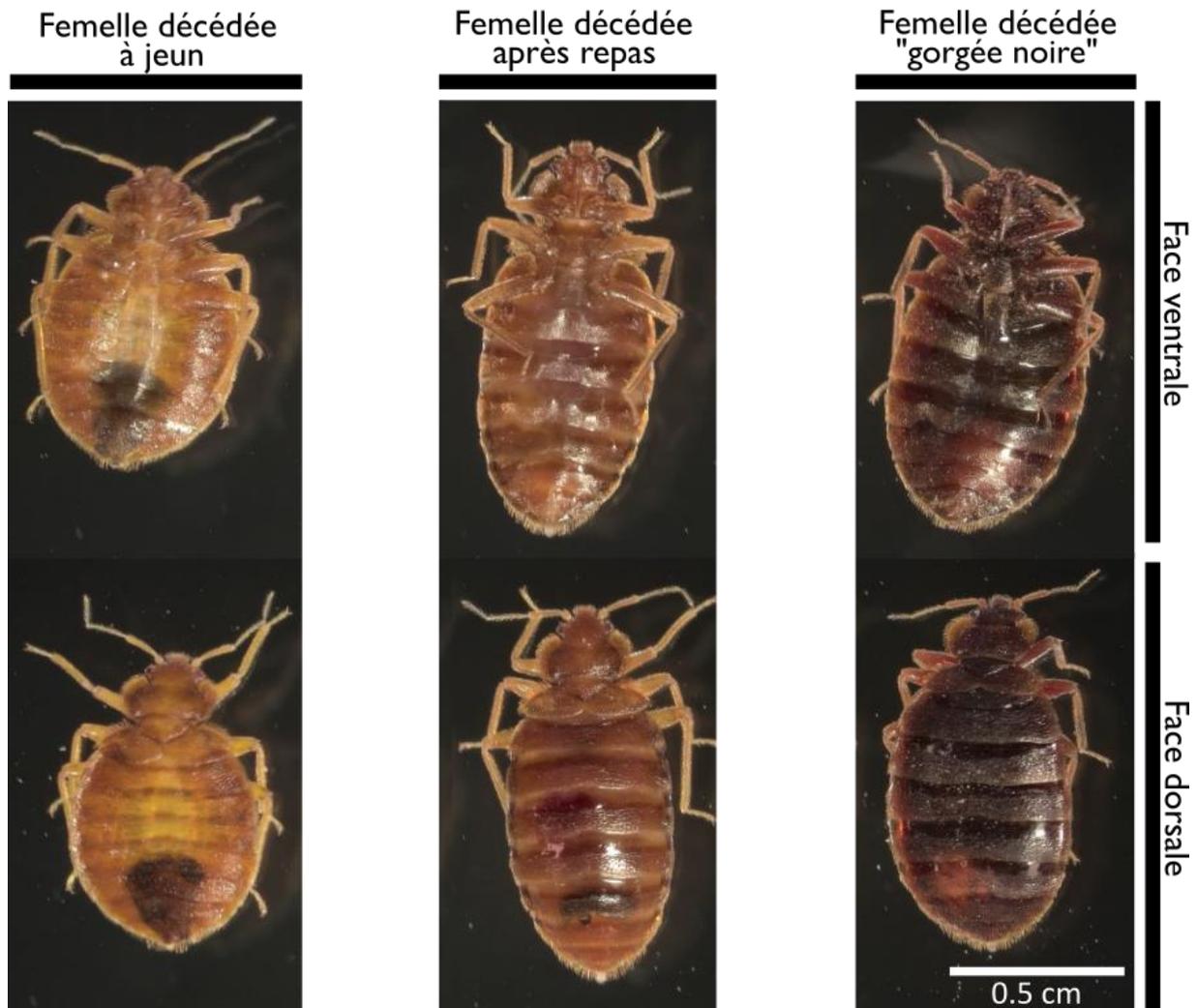


Figure 34. Images de punaises présentant le phénotype « gorgé noir ». Les femelles décédées présentant un phénotype normal qui s'accompagne d'un taux de mortalité d'environ 5% sont présentées sur les deux premiers panels en partant de la gauche. Les femelles décédées présentant un phénotype « gorgé noir » sont présentées sur le panel de droite.

impliqué dans la détoxification ou la digestion pourrait être une piste pour expliquer ce phénomène. Il est possible que chez la punaise de lit, un facteur inconnu perturbe épisodiquement le microbiote de l'hôte, empêchant une digestion correcte du repas sanguin. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer avec une complication dans la mesure où le phénotype étudié reste imprévisible, les seules observations pouvant être réalisées sont *post mortem*. De plus, nous avons constaté la survenue de l'évènement chez des populations symbiotiques mais aussi chez des populations aposymbiotiques, ce qui exclut l'implication de *wCle* (en dehors de la supplémentation en vitamine) dans ce phénotype.

L'entreprise d'élevage de punaises Cimexstore®, qui a été confrontée à ce même problème, propose que le phénomène serait lié à une augmentation locale de l'hygrométrie dans les pots, due aux excréments des punaises à la suite de la prise d'un repas. L'augmentation locale de l'hygrométrie pourrait provoquer un stress chez la punaise voir induire une sensibilité à une

infection latente responsable du phénotype « gorgé noir ». Nous proposons comme piste d'amélioration d'élever les punaises dans des pots mieux aérés. Si aucune occurrence du phénotype n'est observée nous pourrions alors commencer à étudier les mécanismes physiologiques qui l'induisent. Par exemple, afin d'identifier une différence dans l'expression de certains gènes impliqués dans la détoxification, le stress hygrométrique ou l'immunité, des analyses transcriptomiques entre des pools punaises repues venant de populations dans lesquelles le phénotype est observé et des pools de punaises repues venant de population dans lesquelles le phénotype n'est pas observé pourront être réalisées. Les gènes candidats pourront ensuite être testés pour leur capacité à induire le phénotype. Enfin, la maîtrise de l'induction du phénotype permettra peut-être de développer un nouvel outil de biocontrôle contre la punaise de lit et ouvrira des pistes chez d'autres hématophages.

Un symbiote nutritionnel à la dynamique multifactorielle

La dynamique du système symbiotique que compose la punaise de lit et son symbiote primaire a été peu décrite aussi bien pour la localisation que pour la quantification de *wCle*. Les travaux de Fisher *et al.* réalisés en 2018 (Fisher *et al.*, 2018) permettaient d'approcher la dynamique quantitative du symbiote mais manquaient de précision sur l'influence de la période de développement nymphal et du sexe. La localisation de *wCle* avait quant à elle été décrite chez l'adulte et l'œuf (Hosokawa *et al.*, 2010; Thongprem *et al.*, 2020) mais aucune réflexion sur la dynamique d'infection des tissus n'avait été apportée depuis. L'objectif principal de cette thèse était donc de caractériser plus finement cette dynamique sur la biologie globale de l'insecte.

I. Une localisation précise et une quantité variable affectées par plusieurs facteurs

a. Localisation dans les bactériomes et les ovaires : qu'en est-il de leurs dynamiques individuelles ?

Dans cette thèse, nous avons documenté l'augmentation de la quantité relative de *wCle* chez les nymphes et sa localisation dans les ovaires dès le premier stade nymphal. Ces résultats interrogent sur la proportion relative des quantités de *wCle* mesurées dans les bactériomes et dans les ovaires primordiaux de la punaise. Cette proportion avait déjà été décrite chez les adultes avec 30 fois moins de *wCle* dans les ovaires que dans les bactériomes mais avec le même nombre de *wCle* dans les bactériomes de chaque sexe (Hosokawa *et al.*, 2010). Cependant, nous ignorons la dynamique de *wCle* dans les organes symbiotiques lors du développement nymphal et l'impact du jeûne sur la quantité de *wCle* dans ces organes. Mesurer la dynamique de la quantité dans les bactériomes seuls et les ovaires seuls permettra de déterminer la part de l'infection dans chacun de ces organes.

L'augmentation de la quantité de *wCle* pendant le développement ne s'explique pas par la propagation de l'infection à travers de nouveaux tissus mais par un développement de l'infection dans ceux où *wCle* est déjà établie. Ces observations des bactériomes et des ovaires

infectés dès le premier stade nymphal questionnent sur l'impact de la symbiose et de la supplémentation vitaminique sur le développement de ces organes. À cela s'ajoute la différence de fécondité observée chez les femelles ayant effectuées leur mue imaginale avec ou sans supplémentation en vitamines, qui suggère que la production d'œufs viables dépend du moment de la supplémentation vitaminique par *wCle*. À la lumière des résultats de cette thèse, il serait intéressant de renouveler l'expérience mesurant l'effet du moment de l'interruption de la supplémentation vitaminique sur les traits d'histoire de vie des punaises aposymbiotiques en prenant soin d'augmenter les effectifs et d'appliquer les améliorations d'élevages discutées précédemment. Aussi, il serait intéressant de compléter cette expérience en étudiant les effets de l'interruption de la supplémentation vitaminique sur le développement des organes symbiotiques par des techniques de microscopie.

*b. Quel est le moteur de la dynamique de *wCle* ?*

Nous avons montré que la dynamique de la quantité et de la localisation de *wCle* était impactée différemment selon le stade de développement, la prise de repas, le sexe et l'âge de l'adulte. L'effet du développement est le plus fort sur la quantité relative de *wCle*. Cependant il est difficilement distinguable de l'effet de la prise de repas dans la mesure où cette prise de repas induit le développement. Quantifier la dynamique de *wCle* chez des nymphes du même âge, maintenues à jeun pendant une semaine ou ayant pris un repas sanguin au début de cette même semaine permettra de quantifier l'effet de cette prise de repas indépendamment du développement.

L'effet de la prise de repas est aussi un facteur important chez les adultes. Cependant, là où il entraîne une augmentation de la quantité en *wCle* chez le mâle, une diminution est observée chez la femelle. Nous proposons ici une hypothèse suite à l'observation d'une fine connexion entre le bactériome et la gonade primordiale dès le 1^{er} stade nymphal des deux sexes. Cette connexion, qui n'est plus observée chez les femelles du 5^{ème} stade alors qu'elle persiste chez les mâles, confirme des études antérieures (Davis, 1956; Buchner, 1965; Chang and Musgrave, 1973). Une hypothèse est que la connexion des gonades favoriserait le développement du bactériome chez la nymphe et le mâle adulte, alors que la perte de cette liaison entraînerait la diminution du nombre de *wCle* dans les bactériomes de la femelle adulte (Figure 35). Cette hypothèse est étayée par quelques exemples chez les insectes (Szklarzewicz and Michalik, 2017; Janke *et al.*, 2022). On pourrait également imaginer que le maintien de cette connexion permette le transfert de *wCle* ou de nutriment du bactériome aux testicules même si aucune présence de *wCle* n'a été observée dans les testicules jusqu'à présent (Hosokawa *et al.*, 2010; Bellinvia, Johnston, Mbedi, *et al.*, 2020; Bellinvia, Johnston, Reinhardt, *et al.*, 2020). Une méthode simple pour vérifier l'impact de la connexion sur le développement ou le maintien des organes symbiotiques seraient d'effectuer une section entre le bactériome et les gonades à un stade du développement et observer l'effet sur la quantité de *wCle* et/ou la morphologie des organes.

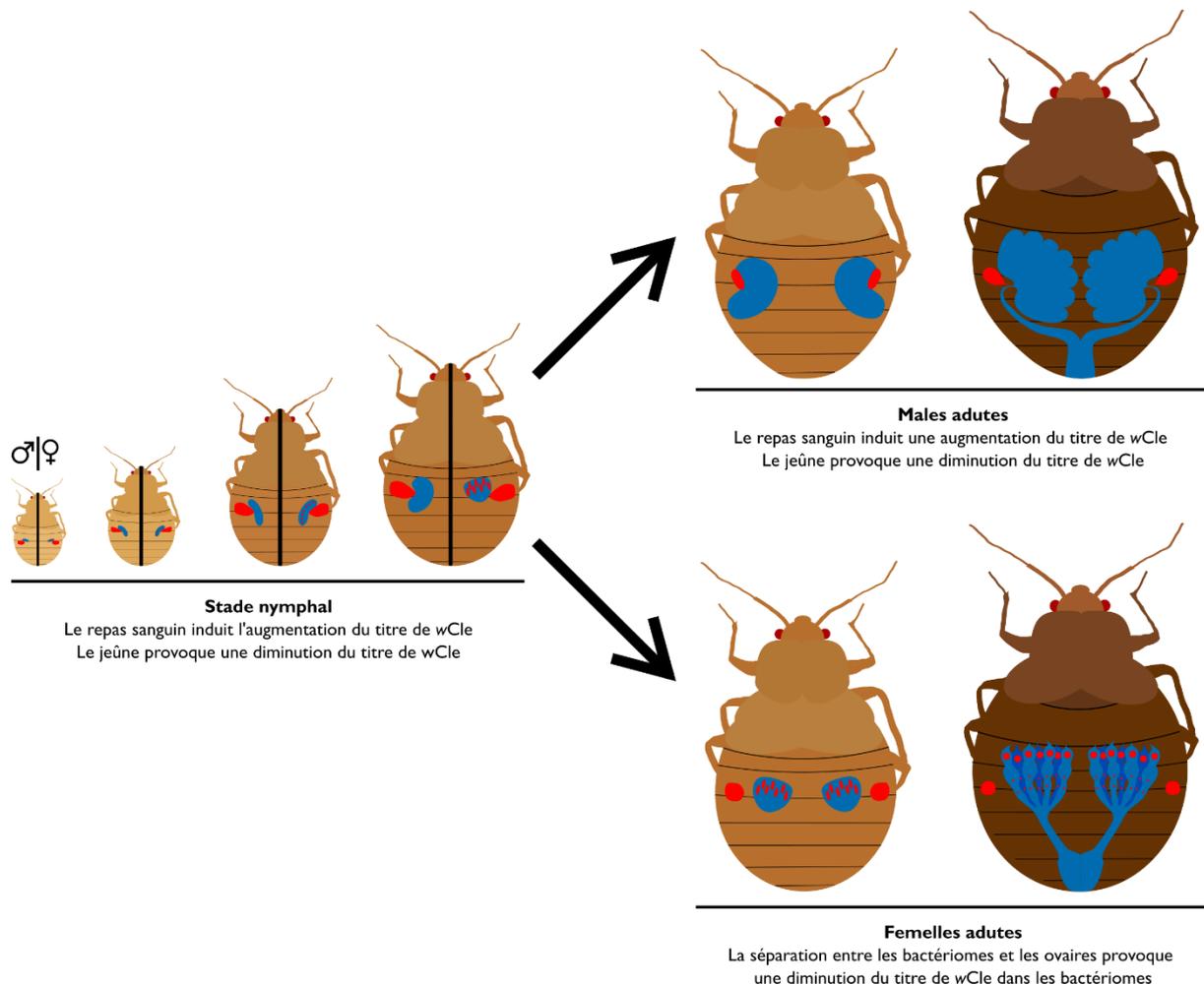


Figure 35. Schéma des mécanismes pouvant induire la dynamique de *wCle* chez *C. lectularius*.

Les différences de dynamiques peuvent aussi s'expliquer par des différences liées à la biologie des femelles qui sont soumises à un stress reproductif fort dans le cas d'une prise de repas régulière. Ensemble, ces points posent la question des mécanismes induisant la diminution des quantités de *wCle* en condition de jeûne.

2. *Wolbachia* chez *C. lectularius* entre nutrition et transmission

a. *C. lectularius* mangerait-il *wCle* ?

Plusieurs études montrent que la variation de la localisation et de la quantité d'un endosymbiote nutritionnel corrèle avec le besoin nutritionnel de l'hôte (Vigneron *et al.*, 2014; Simonet *et al.*, 2018; Dell'Aglio *et al.*, 2023). Chez la punaise de lit, la dynamique de *wCle* pourrait également être corrélée aux besoins nutritionnels mais nous ignorons comment s'exprime ces besoins nutritionnels, les mécanismes impliqués dans la nutrition au niveau des bactériomes ou des ovaires n'ayant pas encore été étudié chez *C. lectularius*. Deux hypothèses peuvent être formulées : soit *wCle* fournit des vitamines B à l'hôte par diffusion dans l'hémolymphe, soit l'hôte recycle les vitamines B présentes dans *wCle* (Figure 36). Le recyclage d'endosymbiote est un phénomène observé parmi les symbioses nutritionnelles (Voronin *et al.*,

2012; Simonet *et al.*, 2018; Whittle *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022; Calevro *et al.*, 2023). Par exemple, chez les charançons des céréales, l'augmentation de la quantité de *S. pierantonius* approvisionne les insectes en acides aminés essentiels à la synthèse des cuticules au début de l'âge adulte (Dell'Aglio *et al.*, 2023), après quoi les endosymbiotes associés à l'intestin sont éliminés par des mécanismes apoptotiques et autophagiques (Vigneron *et al.*, 2014). De même, les pucerons et les blattes montrent des mécanismes de clairance des symbiotes (Milburn, 1966; Hinde, 1971; De Piceis Polver *et al.*, 1986; Latorre *et al.*, 2022). Aussi, des travaux chez les nématodes ont mis en évidence que l'autophagie limite le titre de *Wolbachia* et la distribution tissulaire, tandis que son maintien repose sur les voies glycolytiques de l'hôte (Voronin *et al.*, 2012; Deehan *et al.*, 2021).

Nos observations des bactériomes par TEM devaient apporter un premier élément de réponse : des wCle ont été observées dans des vacuoles, mais ces observations sont restreintes à l'étude d'un seul individu. De manière intéressante, ces « symblyosomes » avaient déjà été observés dans les bactériomes de punaises de lit (Chang and Musgrave, 1973). Ces structures ont aussi été observées dans le tropharium d'un ovaire de femelle adulte avec en plus un état avancé de dégradation de wCle dans ces vacuoles. Ces observations appuient-elles un phénomène d'autophagie permettant à l'hôte de recycler les vitamines B synthétisées par wCle ? Aussi, concernant la supplémentation de wCle affectant la production et la fertilité des œufs, la localisation de wCle dans les tropharium interroge sur l'importance de ce tissu dans la transmission verticale (Hosokawa *et al.*, 2010), mais aussi dans la supplémentation vitaminique nécessaire à la production d'une descendance fertile. Après confirmation de figures d'autophagie, l'observation par microscopie avec des marquages spécifiques de vitamines B et d'autophagie, et/ou l'analyse du transcriptome en dual-RNAseq permettra une meilleure compréhension des mécanismes en place. Une comparaison entre des bactériomes de punaises après prise de repas sanguin ou à jeun, et entre des tropharium de femelles vierges et après accouplement permettra de dire si la synthèse de la vitamine B a bien lieu dans ces organes et si la récupération des vitamines synthétisées est orchestrée par un système d'autophagie ou un système de transport.

Si l'hypothèse de la « wlobophagie » (i.e. lyse de *Wolbachia* (Hargitai *et al.*, 2022)) venait à être confirmée, il serait intéressant d'observer la variation de son intensité au cours du cycle de vie de la punaise. Les périodes de forte activité d'autophagie traduiraient un fort besoin en vitamines B (e.g. période de mue imaginale, période de jeûne, période de ponte) et inversement.

b. Infection de l'ovocyte, plusieurs mécanismes candidats

Outre une éventuelle fonction nutritionnelle qui doit être confirmée, la localisation de wCle dans les tissus primordiaux de l'ovaire pourrait expliquer sa transmission. Dès la première observation de la localisation de wCle dans les trophocytes et le cordon nutritif en 2010, il a été proposé que la migration des symbiotes se produisait à travers le cordon nutritif depuis le tropharium vers les ovocytes (Figure 36A) (Hosokawa *et al.*, 2010). À la suite des résultats

obtenus dans cette thèse, nous proposons d'autres mécanismes qui doivent être testés. L'infection précoces des ovaires et la présence de *wCle* dans les cystoblastes ouvre la possibilité à une transmission verticale déterminée au stade nymphal (Figure 36B). Celle-ci serait ainsi déjà établie dans les cellules souches de la lignée germinale en division, comme c'est le cas chez la drosophile (Serbus and Sullivan, 2007; Radousky *et al.*, 2023), ce qui assure l'infection de tous les ovocytes en développement tout au long de la vie reproductive de l'insecte. Enfin les cellules folliculaire pourraient permettre la transmission lors de la croissance de l'ovocyte dans le vitellarium *via* un mécanisme d'exocytose-endocytose (Figure 36C), comme chez la fourmis du charpentier *B. floridanus* (Kupper *et al.*, 2016).

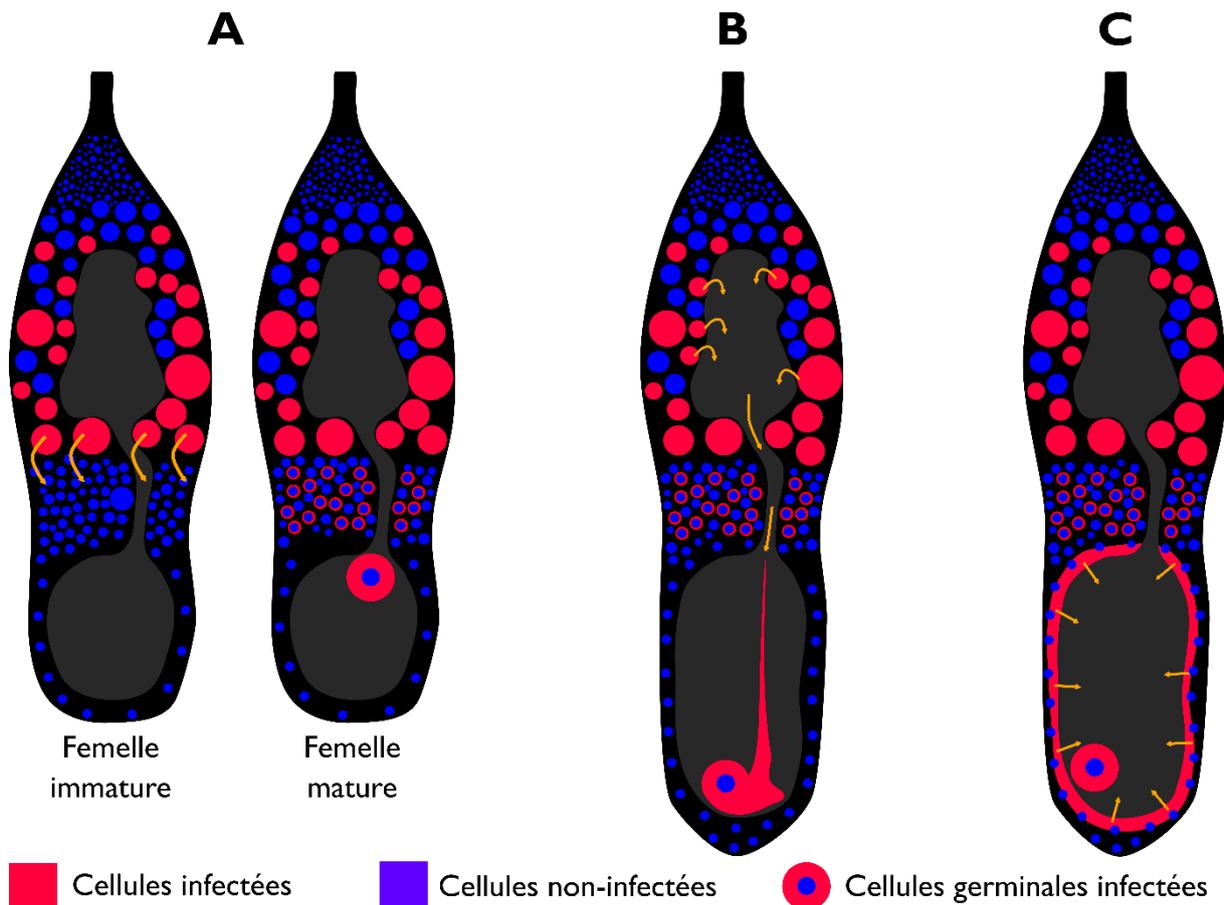


Figure 36. Schéma des voies de transmission possibles de *wCle* dans les ovaires de *C. lectularius*. **A.** Hypothèse de l'infection précoce : l'infection établie dans le tropharium et dans l'anneau germinal avant la maturation de l'ovaire se propage aux cellules germinales (flèches orange). **B.** Hypothèse de Hosokawa *et al.* 2010 : *wCle* établie dans le tropharium est transportée (flèches orange) via le cordon nutritif jusqu'à l'ovocyte où se produit l'infection. **C.** Hypothèse de l'infection tardive : *wCle* établie dans les cellules de l'épithélium folliculaire infecte (flèches orange) l'œuf en développement.

Un suivi de la dynamique du symbiote dans ces organes et dans les œufs pondus pourrait nous éclairer quant à la diminution de la quantité relative de symbiotes observée chez les femelles adultes, et déterminer si celle-ci est liée à la ponte ou à la consommation de bactéries

pour la supplémentation nutritionnelle aux œufs en formation. L'étape suivante sera de déterminer si la diminution de la quantité est due à une élimination de *wCle* ou une transmission du symbiote des tissus ovariens vers les œufs

La constatation d'une infection établie au premier stade nymphal pose également la question de la dynamique de l'infection des tissus ovariens chez l'embryon. Des analyses phylogénomiques indiquent que les variations dans les protéines de surface de *Wolbachia* peuvent médier sa localisation dans des tissus distincts (Veneti *et al.*, 2004; Radousky *et al.*, 2023). Aussi, certains travaux chez la drosophile suggèrent que l'autophagie médiée par l'hôte au cours de l'embryogenèse précoce détermine le titre de *Wolbachia* et le tropisme tissulaire chez les drosophiles adultes (Strunov *et al.*, 2022). Dans les ovocytes, les signaux de *wCle* sont concentrés au pôle postérieur (Hosokawa *et al.*, 2010). Cette localisation est répandue chez les insectes, avec des variations survenant lors du développement (Buchner, 1965; Veneti *et al.*, 2004; Alarcón *et al.*, 2022) (Figure 37). Dans le cas de *C. lectularius*, *wCle* dans le pôle postérieur est colocalisé avec la lignée germinale, ce qui pourrait faciliter la transmission verticale des symbiotes hérités maternellement et expliquer la présence de l'infection dans les ovaires dès le premier stade nymphal (Porter and Sullivan, 2023).

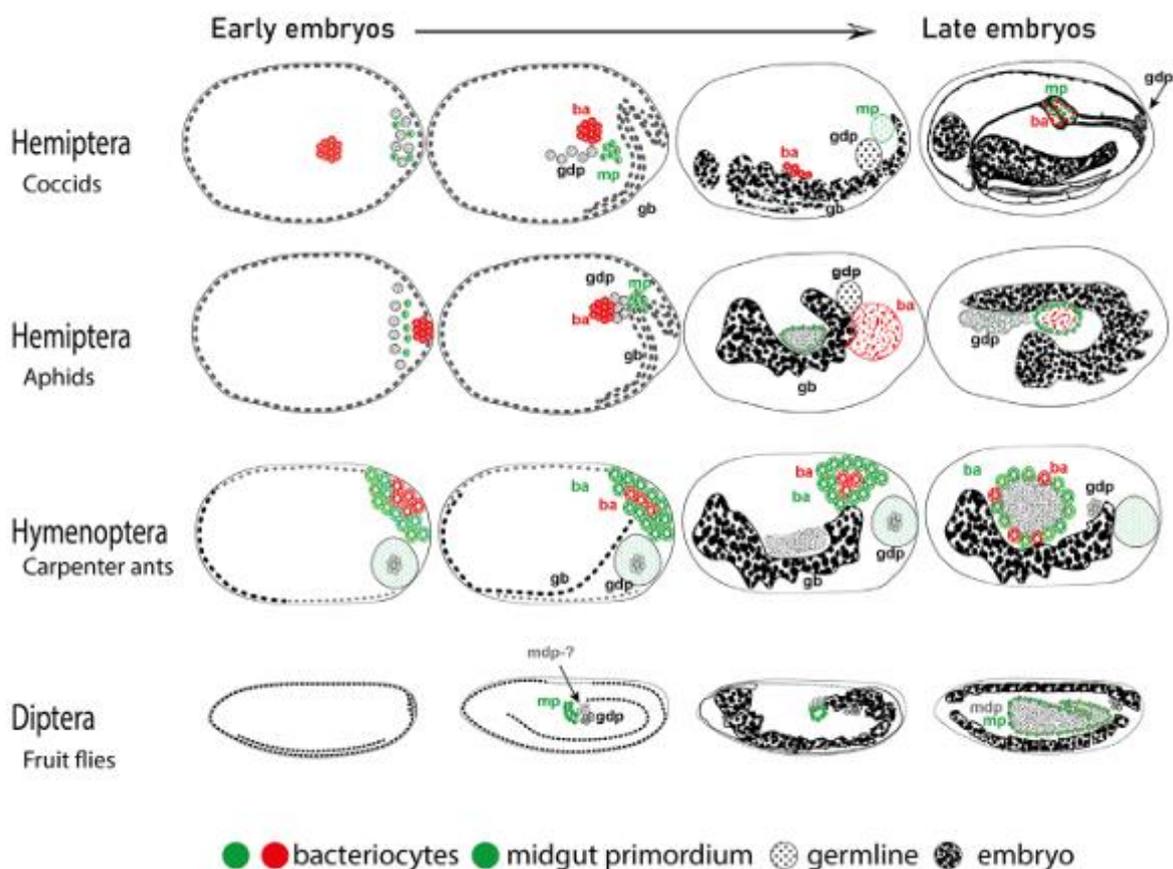


Figure 37. Cellules embryonnaires destinées à la formation du bactériocyte. Les différents stades embryonnaires sont représentés du plus jeune au plus vieux de la gauche vers la droite. Le développement embryonnaire de *C. lectularius* est similaire à celui du puceron (*Aphids*) présenté ici (Buchner, 1965). Les bactériocytes (ba) sont localisés dans la région postérieure de

l'œuf en proche interaction avec les cellules de la lignée germinale (gb et gdp), et ne sont pas proches des cellules de la lignée intestinale (mdp et mp). Figure issue de Alarcon *et al.* 2022 (Alarcón *et al.*, 2022).

En conclusion, nous avons montré que la quantité de *wCle* était dynamique et était positivement impactée par la prise de repas en interaction avec le développement de la nymphe ainsi que chez le mâle adulte (Article 1). Nous avons aussi montré la présence de *wCle* dans les bactériomes et les ovaires au premier stade nymphal (Article 2) et que l'augmentation de la quantité de *wCle* ne s'accompagnait pas d'un changement de la localisation au niveau tissulaire dans les bactériomes (Article 1) mais potentiellement d'une variation de la localisation dans les ovaires (Article 2). Enfin, des premiers résultats de suivi de traits d'histoire de vie ont suggéré que les réserves vitaminiques ont besoin d'être présentes au moment de la mue imaginale pour la production d'œufs fertiles (Étude 1). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche pour affiner la compréhension de la dynamique, mais aussi les mécanismes qui la régulent. Les prochaines études cibleront le dialogue moléculaire entre les deux partenaires et permettront l'identification de gènes candidats à la rupture de l'association ou du transfert de vitamines B, et à plus long terme au développement de symbiocides ciblés contre *C. lectularius*.



Perspectives pour le développement d'un symbiocide

Sommaire

L'utilisation de la symbiose dans la lutte contre <i>C. lectularius</i>	119
1. Cibler la transmission verticale ?	119
2. Le jeûne : un allié de la lutte par l'utilisation de symbiocide ?.....	120
Le rôle des symbiotes secondaires	121
1. BEV-like : un symbiote sous-estimé ?.....	121
2. <i>Wolbachia</i> et BEV-like permettent-ils la résistance aux insecticides ?	121
La symbiose comme outils de biocontrôle à l'aire de l'anthropocène.....	122

L'utilisation de la symbiose dans la lutte contre *C. lectularius*

L'objectif à long terme de cette thèse était à terme de permettre le développement d'outils de biocontrôle ciblés contre la punaise de lit. Les résultats obtenus permettent d'apporter des premiers éléments de réponse sur cette lutte.

I. Cibler la transmission verticale ?

L'infection dans les ovaires est largement répartie dans les tissus ovariens. Il est aujourd'hui difficile de dire quel tissu est impliqué dans la transmission verticale de *wCle*. Cependant, limiter cette transmission verticale en bloquant/sur-exprimant les mécanismes ou en modulant la charge bactérienne dans les ovaires pourrait être une méthode efficace dans le biocontrôle de la punaise de lit. Par exemple, chez le moustique, de faibles titres en *Wolbachia* dans l'ovocyte de l'hôte entraînent des taux de transmission maternelle réduits, tandis qu'une sur-replication entraîne une dégénérescence et une mort des tissus (Newton, Savytsky and Sheehan, 2015; Hague *et al.*, 2022). L'identification des facteurs qui régulent l'abondance de *wCle* et donc de l'efficacité de la transmission a une pertinence immédiate pour les stratégies de biocontrôle de

C. lectularius basées sur la rupture de la symbiose. Cependant, limiter la transmission verticale de *wCle* pourrait ne pas être un outil de contrôle suffisant. En effet, les réserves de vitamines chez la femelle adulte sont suffisantes pour permettre la ponte d'œufs viables pendant au moins quelques semaines. Une solution pourrait être dans ce cas d'éliminer *wCle* dès le premier stade nymphal, quand la quantité relative de *wCle* est la plus faible, ou bien avant la mue imaginale pour limiter la fertilité des femelles.

Nous avons montré que l'infection de la punaise de lit dans les bactériomes et les ovaires par *wCle* survenait dès le développement embryonnaire. Puisque la résistance des œufs aux agents biocides est forte (Campbell, Pereira and Koehler, 2016), la perturbation de la symbiose doit être réalisée à l'échelle de l'individu émergé avec des mécanismes de régulation potentiellement différents entre les ovaires et les bactériomes ou cibler directement le tissu embryonnaire à l'origine des deux structures. Afin de comprendre cette régulation, les dynamiques individuelles des organes doivent être étudiées afin de déterminer les conditions où la charge en *wCle* viendrait à diminuer. Des analyses de transcriptomiques comparatives pourront ensuite être réalisées, comme entre des bactériomes de mâles adultes ayant pris un repas sanguin et de mâles adultes à jeun. Les gènes candidats pourront être impliqués dans la modulation de la charge de *wCle*, comme chez la guêpe parasitoïde *Nasonia* où l'expression de *wds* régule la charge en *Wolbachia* et entraîne une réduction de la quantité du symbiote dans l'ovocyte, peut-être par perturbation du transport bactérien des cellules nourricières à l'ovocyte (Funkhouser-Jones *et al.*, 2018) ce qui diminue la charge et entraîne des taux de transmission réduits. Les gènes candidats pourront aussi être impliqués dans l'expression des protéines permettant la transmission de *wCle* par l'organisation du cytosquelette. Chez *D. melanogaster* la profiline et la villine participent à l'organisation correcte du cytosquelette d'actine et de tubuline nécessaire au maintien de *Wolbachia* dans l'ovocyte (Ferree *et al.*, 2005; Porter and Sullivan, 2023). L'inhibition de l'expression de ces protéines provoque une réduction de titre de *Wolbachia* et de sa capacité à coloniser le germanium conduisant une transmission maternelle défailante (Newton, Savytsky and Sheehan, 2015).

2. Le jeûne : un allié de la lutte par l'utilisation de symbiocide ?

L'effet du développement et de la prise de repas sur la quantité de *wCle* pose la question des mécanismes sous-jacents à cette dynamique. Sont-ils présents de manière constitutive ou sont-ils activés par un évènement de la biologie ? Puisque la mue survient seulement si la nymphe a réalisé un repas, le développement est corrélé à la prise de repas sanguin. On pourrait imaginer que seule la prise de repas permette l'augmentation de la quantité de *wCle* chez la punaise de lit. Ainsi, un symbiocide visant à perturber l'association entre *wCle* et *C. lectularius* gagnerait en efficacité dans le cas où les punaises de lit ne pourraient pas se nourrir.

Le rôle des symbiotes secondaires

1. BEV-like : un symbiote sous-estimé ?

wCle a été identifiée chez toutes les souches de punaise de lit, associé aux bactériomes et aux ovaires (Hertig and Wolbach, 1924; Davis, 1956; Buchner, 1965), avec un phénotype clair de symbiote nutritionnel obligatoire (Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Moriyama *et al.*, 2015). Chez certaines souches, les ovaires et les bactériomes peuvent être infectés par des endosymbiotes facultatifs : une torix *Rickettsia* (Potts *et al.*, 2020; Thongprem *et al.*, 2020; Pilgrim *et al.*, 2021) et une γ -protéobactérie (Hypša and Aksoy, 1997; Hosokawa *et al.*, 2010) de la famille des *Symbiopectobacterium*, connue sous le nom de BEV-like pour “symbiote Bactérien d’*Euscelidius variegatus*” (Degnan *et al.*, 2011; Nadal-Jimenez *et al.*, 2022). BEV-like présente un tropisme étendu chez la punaise de lit infectant les bactériomes, les ovaires, mais aussi les tubes de Malpighi et le spermalège (Figure 14). Parce qu’il a clairement été établi que ce symbiote n’est pas obligatoire (Hosokawa *et al.*, 2010) celui-ci n’a pas été largement étudié. Nous pensons cependant qu’il pourrait avoir un impact sur la biologie de la punaise de lit. Sa localisation importante dans les tubes de Malpighi questionne quant à sa fonction dans la détoxification ou la supplémentation nutritionnelle en folate, des fonctions importantes chez un hématophage strict comme la punaise de lit. Comme pour wCle, nous proposons une étude des traits de vie de souches infectées ou non par BEV-like ainsi qu’un suivi de la dynamique de la localisation et de la quantité.

Cependant, à cause de la localisation de BEV-like dans les spermalèges et les ovaires, sa transmission pourrait être verticale (Hosokawa *et al.*, 2010) et potentiellement horizontale. Une expérience d’accouplement entre des mâles de notre souche de laboratoire et des femelles de souches dépourvues de BEV-like pourraient être réalisée (e.g. JESC). La détection de BEV-like par PCR dans la descendance permettra de déterminer le potentiel de transfert de la bactérie.

Finalement, l’importance de torix *Rickettsia* dans le système mériterait d’être étudié. Cependant, cette étude semble moins urgente du fait de son tropisme cellulaire limité, de sa prévalence estimée à 13% (Potts *et al.*, 2020).

2. *Wolbachia* et BEV-like permettent-ils la résistance aux insecticides ?

Les symbiotes bactériens peuvent influencer la sensibilité aux insecticides (Kikuchi *et al.*, 2012; Ishigami *et al.*, 2021). Une étude récente montre que chez *C. hemipterus*, le traitement antibiotique à la rifampicine a entraîné une sensibilité accrue au fénitrothion et à l’imidaclopride (Soh and Veera Singham, 2022). Après le traitement à la rifampicine, wCle très abondantes et les gamma-protéobactéries ont été significativement supprimées et remplacées par des actinobactéries, des bacilles et des bêtaprotéobactéries, suggérant la possibilité que wCle et/ou BEV-like médient la sensibilité aux insecticides chez *C. hemipterus*. La réinoculation du contenu microbien permet de retrouver la tolérance des punaises de lit traitées à la rifampicine

à l'imidaclopride et au fénitrothion. Ainsi, il se pourrait qu'un mécanisme médié par les symbiotes influence la sensibilité aux insecticides des punaise de lits.

La symbiose comme outils de biocontrôle à l'aire de l'anthropocène

En conclusion de cette thèse, je souhaiterais replacer notre recherche dans le contexte actuel. La pandémie mondiale de la COVID-19 a révélé à la fois les influences de l'activité humaine sur les écosystèmes et l'étendue de leurs conséquences potentielles pour la société (Buck and Weinstein, 2020; Dinerstein *et al.*, 2020; Ibn-Mohammed *et al.*, 2021). Les impacts humains sur la biosphère étant d'une telle ampleur, certains experts suggèrent que nous ayons basculé dans une nouvelle ère géologique appelée « Anthropocène » (Steffen *et al.*, 2016; Hom and Penn, 2021). Ces changements, qui incluent le climat, la pollution, la destruction des habitats, la perte de biodiversité, la perturbation des processus microbiens et une augmentation des espèces invasives, peuvent avoir des effets généralisés sur les dynamiques évolutives et écologiques (Guedes and Cutler, 2014; Alberti, 2015; Cavicchioli *et al.*, 2019)

Des auteurs plaident en faveur d'un questionnement général sur les recherches menées, afin de faire progresser de manière plus efficace la recherche sur les symbioses vis-à-vis de l'Anthropocène (Ellis *et al.*, 2021). Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur une approche fonctionnelle de la symbiose. La punaise de lit est un exemple parmi d'autres d'insectes pour lesquels la symbiose a été envisagée pour le développement d'outils de biocontrôle. Au sein de différentes familles d'insectes, les interactions symbiotiques ont permis l'acquisition d'une variété de fonctions, englobant la défense et la nutrition. Ainsi, les symbioses sont des points cibles idéaux pour la lutte. Les associations symbiotiques, plus encore que les espèces clés, pourraient être considérées comme des moyen de reconfigurer ou de maintenir les biomes et les environnements abiotiques (Hom and Penn, 2021).

Cependant, nous ignorons l'impact que pourrait avoir l'utilisation d'un symbiocide sur l'épidémiologie de la punaise de lit. Même si cela ne semble pas être le cas pour certains virus (Fisher *et al.*, 2019), la perte d'un symbiote pourrait influencer l'efficacité du blocage des agents pathogènes par *w*Cle. Il serait mal venu que la punaise de lit devienne, par l'utilisation de symbiocides, un vecteur de maladies. Aussi, les symbioses présentent un potentiel d'innovation de leur structure et de leur fonction. Il n'est pas exclu que la lutte ciblant l'interaction punaise/*w*Cle puisse favoriser la sélection d'une nouvelle symbiose nutritionnelle remplaçant la première (Duron and Gottlieb, 2020). L'impact de ces pressions de sélection anthropiques sur la formation de nouvelles symbioses est une question ouverte qui suscite une attention grandissante (Mayer *et al.*, 2014; Steidinger *et al.*, 2019). Pour finir, le développement des études sur les interactions symbiotiques en est encore à ses débuts, mais les découvertes récentes laissent entrevoir une révolution dans notre manière de percevoir le monde biotique et de l'intégrer à nos activités humaines (Mcfall-ngai, 2008).

Références bibliographiques

Aak, A. *et al.* (2014) ‘Questing activity in bed bug populations: Male and female responses to host signals’, *Physiological Entomology*, 39(3), pp. 199–207. doi: 10.1111/phen.12062.

Adams, A. S. *et al.* (2013) ‘Mountain pine beetles colonizing historical and naïve host trees are associated with a bacterial community highly enriched in genes contributing to terpene metabolism’, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), pp. 3468–3475. doi: 10.1128/AEM.00068-13.

Ahmad, N. A. *et al.* (2021) ‘Wolbachia strain wAlbB maintains high density and dengue inhibition following introduction into a field population of *Aedes aegypti*: Wolbachia wAlbB in wild *Aedes aegypti*’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1818). doi: 10.1098/rstb.2019.0809.

Akhoundi, M. *et al.* (2016) ‘Molecular characterization of Wolbachia infection in bed bugs (*Cimex lectularius*) collected from several localities in France’, *Parasite*, 23, p. 31. doi: 10.1051/parasite/2016031.

Akman Gündüz, E. and Douglas, A. E. (2012) ‘Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1658), pp. 987–991. doi: 10.1098/rspb.2008.1476.

Alarcón, M. E. *et al.* (2022) ‘Evolution and ontogeny of bacteriocytes in insects’, *Frontiers in Physiology*, 13(November), pp. 1–15. doi: 10.3389/fphys.2022.1034066.

Alberdi, A. *et al.* (2022) ‘Disentangling host–microbiota complexity through hologenomics’, *Nature Reviews Genetics*. Springer US, 23(5), pp. 281–297. doi: 10.1038/s41576-021-00421-0.

Alberti, M. (2015) ‘Eco-evolutionary dynamics in an urbanizing planet’, *Trends in Ecology and Evolution*. Elsevier Ltd, 30(2), pp. 114–126. doi: 10.1016/j.tree.2014.11.007.

Anderson, A. L. and Leffler, K. (2008) ‘Bedbug infestations in the news: a picture of an emerging public health problem in the United States.’, *Journal of environmental health*. United States, 70(9), pp. 24-27,52-53.

Ankrah, N. Y. D., Chouaia, B. and Douglas, E. (2018) ‘The Cost of Metabolic Interactions in Symbioses between’, *mBio*, 9(5), pp. 1–15.

Anses (2023) *Punaises de lit : impacts, prévention et lutte*.

Anstead, G. M. (2016) ‘The centenary of the discovery of trench fever, an emerging infectious disease of World War 1’, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 16(8), pp. e164–e172. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30003-2.

Archibald, J. M. (2015) ‘Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution’, *Current Biology*. Elsevier Ltd, 25(19), pp. R911–R921. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.055.

- Arora, A. K. and Douglas, A. E. (2017) ‘Hype or opportunity? Using microbial symbionts in novel strategies for insect pest control’, *Journal of Insect Physiology*. Elsevier, 103(September), pp. 10–17. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.09.011.
- Attardo, G. M., Scolari, F. and Malacrida, A. (2020) *Bacterial Symbionts of Tsetse Flies: Relationships and Functional Interactions Between Tsetse Flies and Their Symbionts, Results and Problems in Cell Differentiation*. doi: 10.1007/978-3-030-51849-3_19.
- Bai, X. *et al.* (2011) ‘Transcriptomics of the bed bug (*Cimex lectularius*)’, *PLoS ONE*, 6(1), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0016336.
- Baldo, L. *et al.* (2006) ‘Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*’, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), pp. 7098–7110. doi: 10.1128/AEM.00731-06.
- Baldo, L. and Werren, J. H. (2007) ‘Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: Spurious lineages and discordance with MLST’, *Current Microbiology*, 55(1), pp. 81–87. doi: 10.1007/s00284-007-0055-8.
- Balvín, O., Chajma, P. and Naylor, R. (2019) ‘Age structure of bed bug (Heteroptera: Cimicidae) aggregations affects the nymphal feeding success’, *Parasites and Vectors*. BioMed Central, 12(1), pp. 1–5. doi: 10.1186/s13071-019-3659-5.
- Bandi, C. and Sacchi, L. (2000) *Intracellular symbiosis in Termites, Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. doi: 10.3109/9781420058734-16.
- Bandi, C., Slatko, B. and O’Neill, S. L. (1999) ‘*Wolbachia* genomes and the many faces of symbiosis’, *Parasitology Today*, 15(11), pp. 428–429. doi: 10.1016/S0169-4758(99)01543-4.
- De Bary, A. (1879) ‘Die Erscheinung der Symbiose’.
- Basili, A. M. and Merwin, A. C. (2019) ‘Parasitism declines with distance from the site of introduction for the kudzu bug, *Megacopta cribraria* (F.), and depends on host density at different spatial scales’, *Biological Invasions*. Springer International Publishing, 21(8), pp. 2629–2637. doi: 10.1007/s10530-019-02007-8.
- Bates, D. *et al.* (2015) ‘Fitting linear mixed-effects models using lme4’, *Journal of Statistical Software*, 67(1). doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- Baumann, P., Moran, N. A. and Baumann, L. (2006) *Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Insects*. doi: 10.1007/0-387-30741-9.
- Beard, C. B., Cordon-Rosales, C. and Durvasula, R. V. (2002) ‘Performance Analysis of F Lapping F Oils and Their Potential’, *Annual Review of Entomology*, 47, pp. 123–141.
- Beinart, R. A. (2019) ‘The Significance of Microbial Symbionts in Ecosystem Processes’, *mSystems*, 4(3), pp. 1–5. doi: 10.1128/msystems.00127-19.
- Bellinva, S., Johnston, P. R., Reinhardt, K., *et al.* (2020) ‘Bacterial communities of the reproductive organs of virgin and mated common bedbugs, *Cimex lectularius*’, *Ecological Entomology*, 45(1), pp. 142–154. doi: 10.1111/een.12784.
- Bellinva, S., Johnston, P. R., Mbedi, S., *et al.* (2020) ‘Mating changes the genital microbiome in both sexes of the common bedbug *Cimex lectularius* across populations’, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing, 287(1926). doi: 10.1098/rspb.2020.0302.

- Ben-Yosef, M. *et al.* (2020) ‘Coxiella-Like Endosymbiont of *Rhipicephalus sanguineus* Is Required for Physiological Processes During Ontogeny’, *Frontiers in Microbiology*, 11(April), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2020.00493.
- Bender, S. F. *et al.* (2014) ‘Symbiotic relationships between soil fungi and plants reduce N₂O emissions from soil’, *ISME Journal*, 8(6), pp. 1336–1345. doi: 10.1038/ismej.2013.224.
- Bennett, G. M. and Moran, N. A. (2015) ‘Heritable symbiosis: The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), pp. 10169–10176. doi: 10.1073/pnas.1421388112.
- Benoit, J. B. *et al.* (2016) ‘Unique features of a global human ectoparasite identified through sequencing of the bed bug genome’, *Nature Communications*, 7, pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms10165.
- Bérenger, J.-M. and Pluot-Sigwalt, D. (2017) ‘Présence en France de la Punaise de lit tropicale, *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) (Hemiptera, Heteroptera, Cimicidae)’, *Bulletin de la Société entomologique de France*, 122(4), pp. 423–427. doi: 10.32475/bsef_2007.
- Bian, G. *et al.* (2013) ‘Wolbachia invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to Plasmodium infection.’, *Science (New York, N.Y.)*. United States, 340(6133), pp. 748–751. doi: 10.1126/science.1236192.
- Blackall, L. L., Wilson, B. and Van Oppen, M. J. H. (2015) ‘Coral-the world’s most diverse symbiotic ecosystem’, *Molecular Ecology*, 24(21), pp. 5330–5347. doi: 10.1111/mec.13400.
- Blow, F. *et al.* (2020) ‘B-vitamin nutrition in the pea aphid-Buchnera symbiosis’, *Journal of Insect Physiology*. Elsevier Ltd, 126, p. 104092. doi: 10.1016/j.jinsphys.2020.104092.
- Booth, W. *et al.* (2012) ‘Molecular markers reveal infestation dynamics of the bed bug (Hemiptera: Cimicidae) within apartment buildings’, *Journal of Medical Entomology*, 49(3), pp. 535–546. doi: 10.1603/ME11256.
- Bordenstein, S. R. and Theis, K. R. (2015) ‘Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes’, *PLoS Biology*, 13(8), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pbio.1002226.
- Bourtzis, K. *et al.* (2016) ‘More than one rabbit out of the hat: Radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations’, *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 157, pp. 115–130. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.009.
- Brault, A. C. *et al.* (2009) ‘Stone lakes virus (Family Togaviridae, Genus Alphavirus), a variant of fort morgan virus isolated From swallow bugs (Hemiptera: Cimicidae) west of the continental divide’, *Journal of Medical Entomology*, 46(5), pp. 1203–1209. doi: 10.1603/033.046.0531.
- Breuer, J. A. J. and Werren, J. H. (1995) ‘Hybrid Breakdown between Two Haplodiploid Species: The Role of Nuclear and Cytoplasmic Genes’, *Evolution*, 49(4), p. 705. doi: 10.2307/2410324.
- Bright, M. and Bulgheresi, S. (2010) ‘A complex journey: Transmission of microbial symbionts’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 218–230. doi: 10.1038/nrmicro2262.
- Brownlie, J. C. and Johnson, K. N. (2009) ‘Symbiont-mediated protection in insect hosts’,

Trends in Microbiology, 17(8), pp. 348–354. doi: 10.1016/j.tim.2009.05.005.

Brucker, R. M. and Bordenstein, S. R. (2013) ‘The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*’, *Science*, 341(6146), pp. 667–669. doi: 10.1126/science.1240659.

Brucker, R. M. and Bordenstein, S. R. (2014) ‘Response to comment on “the hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*”’, *Science*, 345(6200). doi: 10.1126/science.1256708.

Brumin, M., Kontsedalov, S. and Ghanim, M. (2011) ‘*Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype’, *Insect Science*, 18(1), pp. 57–66. doi: 10.1111/j.1744-7917.2010.01396.x.

Bruner-Montero, G. and Jiggins, F. M. (2023) ‘*Wolbachia* protects *Drosophila melanogaster* against two naturally occurring and virulent viral pathogens’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 13(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-023-35726-z.

Buchner, P. (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscien.

Buck, J. C. and Weinstein, S. B. (2020) ‘The ecological consequences of a pandemic: The ecological effects of COVID-19’, *Biology Letters*, 16(11). doi: 10.1098/rsbl.2020.0641.

Büning, J. (1995) *The Insect Ovary: Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution, Invertebrate Reproduction & Development*. doi: 10.1080/07924259.1995.9672486.

Burton, G. J. (1963) ‘Bedbugs in relation to transmission of human diseases. Review of the literature.’, *Public health reports*, 78(6), pp. 513–524. doi: 10.2307/4591852.

Calevro, F. *et al.* (2023) ‘Editorial: Symbiotic organs in insects: development, metabolism, and physiological regulation’, *Frontiers in Physiology*, 14(July), pp. 5–7. doi: 10.3389/fphys.2023.1248654.

Campbell, B. E., Pereira, R. M. and Koehler, P. G. (2016) ‘Complications with Controlling Insect Eggs’, *Insecticides Resistance*, 61848. doi: 10.5772/61848.

Casiraghi, M. *et al.* (2001) ‘A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts’, *Parasitology*, 122(1), pp. 93–103. doi: 10.1017/S0031182000007149.

Cavicchioli, R. *et al.* (2019) ‘Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change’, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 17(9), pp. 569–586. doi: 10.1038/s41579-019-0222-5.

Chang, K. P. (1974) ‘Effects of elevated temperature on the mycetome and symbiotes of the bed bug *Cimex lectularius* (Heteroptera)’, *Journal of Invertebrate Pathology*, 23(3), pp. 333–340. doi: 10.1016/0022-2011(74)90098-6.

Chang, K. P. and Musgrave, A. J. (1973) ‘Morphology, histochemistry, and ultrastructure of mycetome and its rickettsial symbiotes in *Cimex lectularius* L.’, *Canadian Journal of Microbiology*, 19(9), pp. 1075–1081. doi: 10.1139/m73-171.

Chebbah, D. *et al.* (2021) ‘Bed bugs (Hemiptera: Cimicidae) population diversity and first record of *cimex hemipterus* in paris’, *Insects*, 12(7), pp. 1–9. doi: 10.3390/insects12070578.

Chebbah, D. *et al.* (2023) ‘Molecular characterization and genetic diversity of *Wolbachia* endosymbionts in bed bugs (Hemiptera ; Cimicidae) collected in Paris’, *PLoS ONE*, pp. 1–11.

doi: 10.1371/journal.pone.0292229.

Chirgwin, S. R. *et al.* (2003) 'Removal of Wolbachia from *Brugia pahangi* Is Closely Linked to Worm Death and Fecundity but Does Not Result in Altered Lymphatic Lesion Formation in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*)', *Infection and Immunity*, 71(12), pp. 6986–6994. doi: 10.1128/IAI.71.12.6986-6994.2003.

Cornwallis, C. K. *et al.* (2023) 'Symbioses shape feeding niches and diversification across insects', *Nature Ecology and Evolution*. Springer US, 7, pp. 1022–1044. doi: 10.1038/s41559-023-02058-0.

Couret, J. *et al.* (2019) 'Even obligate symbioses show signs of ecological contingency: Impacts of symbiosis for an invasive stinkbug are mediated by host plant context', *Ecology and Evolution*, 9(16), pp. 9087–9099. doi: 10.1002/ece3.5454.

Dale, C. and M. N. A. (2006) 'Molecular interactions between Bacterial Symbionts and their Hosts', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.014.

Dang, K. *et al.* (2017) 'Insecticide resistance and resistance mechanisms in bed bugs, *Cimex* spp. (Hemiptera: Cimicidae)', *Parasites & vectors*, 10(318), pp. 1–31. doi: 10.1186/s13071-017-2232-3.

Darby, A. C. *et al.* (2012) 'Analysis of gene expression from the Wolbachia genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis', *Genome Research*, pp. 2467–2477. doi: 10.1101/gr.138420.112.

Davies, T. G. E., Field, L. M. and Williamson, M. S. (2012) 'The re-emergence of the bed bug as a nuisance pest: Implications of resistance to the pyrethroid insecticides', *Medical and Veterinary Entomology*, 26(3), pp. 241–254. doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.01006.x.

Davis, N. T. (1956) 'The Morphology and Functional Anatomy of the Male and Female Reproductive Systems of *Cimex lectularius* L. (Heteroptera, Cimicidae)', *Annals of the Entomological Society of America*, 49(5), pp. 466–493. doi: 10.1093/aesa/49.5.466.

Davis, N. T. (1964) 'Studies of the reproductive physiology of Cimicidae (Hemiptera)-I. Fecundation and egg maturation', *Journal of Insect Physiology*, 10(6), pp. 947–963. doi: 10.1016/0022-1910(64)90083-6.

Davison, H. R. *et al.* (2022) 'Genomic diversity across the Rickettsia and "Candidatus Megaira" genera and proposal of genus status for the Torix group', *Nature Communications*. Springer US, 13(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41467-022-30385-6.

Deehan, M. *et al.* (2021) 'Intracellular density of wolbachia is mediated by host autophagy and the bacterial cytoplasmic incompatibility gene cifb in a cell type-dependent manner in *Drosophila melanogaster*', *mBio*, 12(1), pp. 1–19. doi: 10.1128/mBio.02205-20.

Degnan, P. H. *et al.* (2011) 'Origin and examination of a leafhopper facultative endosymbiont', *Current Microbiology*, 62(5), pp. 1565–1572. doi: 10.1007/s00284-011-9893-5.

Dell'Aglio, E. *et al.* (2023) 'Weevil Carbohydrate Intake Triggers Endosymbiont Proliferation: A Trade-Off between Host Benefit and Endosymbiont Burden', *mBio*. American Society for Microbiology. doi: 10.1128/mbio.03333-22.

Díaz, S. *et al.* (2016) 'Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: Asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal', *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13071-016-1926-2.

- Dimijian, G. G. (2000) 'Evolving together: the biology of symbiosis', *BUMC Proceedings*, 13(1), pp. 217–226.
- Dinerstein, E. *et al.* (2020) 'A "global safety net" to reverse biodiversity loss and stabilize earth's climate', *Science Advances*, 6(36), pp. 1–14. doi: 10.1126/sciadv.abb2824.
- Dobson, S. L., Rattanadechakul, W. and Marsland, E. J. (2004) 'Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*', *Heredity*, 93(2), pp. 135–142. doi: 10.1038/sj.hdy.6800458.
- Doggett, S. L. *et al.* (2011) 'Bed bugs: The Australian response', *Insects*, 2(2), pp. 96–111. doi: 10.3390/insects2020096.
- Doggett, S. L. *et al.* (2012) 'Bed bugs: Clinical relevance and control options', *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), pp. 164–192. doi: 10.1128/CMR.05015-11.
- Doggett, S. L. and Lee, C. Y. (2023) 'Historical and Contemporary Control Options Against Bed Bugs, *Cimex* spp.', *Annual Review of Entomology*, 68, pp. 169–190. doi: 10.1146/annurev-ento-120220-015010.
- Douglas, A. E. (1989) 'Mycetocyte symbiosis in insects', *Biological Reviews*, 64(4), pp. 409–434. doi: 10.1111/j.1469-185X.1989.tb00682.x.
- Douglas, A. E. (2009) 'The microbial dimension in insect nutritional ecology', *Functional Ecology*, 23(1), pp. 38–47. doi: 10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x.
- Douglas, A. E. (2015) 'Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms', *Annual Review of Entomology*, 60(1), pp. 17–34. doi: 10.1146/annurev-ento-010814-020822.
- Douglas, A. E. (2017) 'The B vitamin nutrition of insects: the contributions of diet, microbiome and horizontally acquired genes', *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc., 23, pp. 65–69. doi: 10.1016/j.cois.2017.07.012.
- Douglas, A. E. and Werren, J. H. (2016) 'Holes in the hologenome: Why host-microbe symbioses are not holobionts', *mBio*, 7(2), pp. 1–7. doi: 10.1128/mBio.02099-15.
- Dubilier, N., Bergin, C. and Lott, C. (2008) 'Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis', *Nature Review Microbiology*, 6(10), pp. 725–740. doi: 10.1038/nrmicro1992.
- Dunbar, H. E. *et al.* (2007) 'Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts', *PLoS Biology*, 5(5), pp. 1006–1015. doi: 10.1371/journal.pbio.0050096.
- Duron, O. and Gottlieb, Y. (2020) 'Convergence of Nutritional Symbioses in Obligate Blood Feeders.', *Trends in parasitology*. England, 36(10), pp. 816–825. doi: 10.1016/j.pt.2020.07.007.
- Duron, O. and Hurst, G. D. D. (2013) 'Arthropods and inherited bacteria: From counting the symbionts to understanding how symbionts count', *BMC Biology*, 11, pp. 2–5. doi: 10.1186/1741-7007-11-45.
- Durvasula, R. V. *et al.* (1997) 'Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), pp. 3274–3278. doi: 10.1073/pnas.94.7.3274.
- Dutra, H. L. C. *et al.* (2016) 'Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in

- Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes', *Cell Host and Microbe*. The Author(s), 19(6), pp. 771–774. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021.
- Ellis, E. C. *et al.* (2021) 'People have shaped most of terrestrial nature for at least 12,000 years', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(17), pp. 1–8. doi: 10.1073/pnas.2023483118.
- Engelstädter, J. and Hurst, G. D. D. (2009) 'The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, pp. 127–149. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120206.
- Feldhaar, H. (2011) 'Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts', *Ecological Entomology*, 36(5), pp. 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x.
- Feldhaar, H. and Gross, R. (2009) 'Genome degeneration affects both extracellular and intracellular bacterial endosymbionts', *Journal of Biology*, 8(3). doi: 10.1186/jbiol129.
- Ferrari, J. and Vavre, F. (2011) 'Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1569), pp. 1389–1400. doi: 10.1098/rstb.2010.0226.
- Ferrarini, M. *et al.* (2022) 'Transcriptional survey of ovarian bacteriomes in the cereal weevil, *Sitophilus oryza*, shows down-regulation of immune effectors at the onset of sexual maturity', *Frontiers*.
- Ferree, P. M. *et al.* (2005) 'Wolbachia Utilizes Host Microtubules and Dynein for Anterior Localization in the *Drosophila* Oocyte', *PLOS Pathogens*, 1(2), pp. 111–124. doi: 10.1371/journal.ppat.0010014.
- Fischer, K. *et al.* (2011) 'Tissue and stage-specific distribution of Wolbachia in *Brugia malayi*', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5). doi: 10.1371/journal.pntd.0001174.
- Fisher, M. L. *et al.* (2018) 'Growth kinetics of endosymbiont Wolbachia in the common bed bug, *Cimex lectularius*', *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-018-29682-2.
- Fisher, M. L. *et al.* (2019) 'Lack of influence by endosymbiont Wolbachia on virus titer in the common bed bug, *Cimex lectularius*', *Parasites & vectors*. BioMed Central, 12(1), p. 436. doi: 10.1186/s13071-019-3694-2.
- Fisher, R. M. *et al.* (2017) 'The evolution of host-symbiont dependence', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8(May), pp. 1–8. doi: 10.1038/ncomms15973.
- Floate, K. D., Kyei-poku, G. K. and Coghlin, P. C. (2006) 'Overview and relevance of Wolbachia bacteria in biocontrol research', *Biocontrol Science and Technology*, 16(8), pp. 767–788. doi: 10.1080/09583150600699606.
- Foster, J. *et al.* (2005) 'The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode', *PLoS Biology*, 3(4), pp. 0599–0614. doi: 10.1371/journal.pbio.0030121.
- Foster, K. R. *et al.* (2017) 'The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash', *Nature*. Nature Publishing Group, 548(7665), pp. 43–51. doi: 10.1038/nature23292.
- Frank, A. B. (1877) 'Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten.', *Beitr Biol Pflanz*, 2, pp. 123–200.

- Fukatsu, T. *et al.* (2007) ‘Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies’, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), pp. 6660–6668. doi: 10.1128/AEM.01131-07.
- Funkhouser-Jones, L. J. *et al.* (2018) ‘The Maternal Effect Gene *Wds* Controls Wolbachia Titer in *Nasonia*’, *Current Biology*. Elsevier Ltd., 28(11), pp. 1692–1702.e6. doi: 10.1016/j.cub.2018.04.010.
- Gavotte, L. *et al.* (2008) ‘Costs and benefits of Wolbachia infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level’, *Bone*, 23(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.jip.2010.08.005.Costs.
- Geib, S. M. *et al.* (2008) ‘Lignin degradation in wood-feeding insects’, *PNAS*, 105(35), pp. 12932–12937. doi: 10.1017/CBO9781107707573.008.
- Gerardo, N. M. (2015) ‘Harnessing Evolution to Elucidate the Consequences of Symbiosis’, *PLoS Biology*, 13(2), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pbio.1002066.
- Gilbert, S. F. (2020) ‘Developmental symbiosis facilitates the multiple origins of herbivory’, *Evolution and Development*. John Wiley & Sons, Ltd, 22(1–2), pp. 154–164. doi: 10.1111/ede.12291.
- Gilbert, S. F., Sapp, J. and Tauber, A. I. (2012) ‘A symbiotic view of life: We have never been individuals’, *Quarterly Review of Biology*, 87(4), pp. 325–341. doi: 10.1086/668166.
- Goddard, J. and De Shazo, R. (2012) ‘Psychological effects of bed bug attacks (*Cimex lectularius* L.)’, *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc., 125(1), pp. 101–103. doi: 10.1016/j.amjmed.2011.08.010.
- Gonçalves, W. G. *et al.* (2020) ‘Ultrastructure of the Bacteriocytes in the Midgut of the Carpenter ant *Camponotus rufipes*: Endosymbiont Control by Autophagy.’, *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*. England, 26(6), pp. 1236–1244. doi: 10.1017/S1431927620024484.
- González-Morales, M. A. *et al.* (2022) ‘Systemic veterinary drugs for control of the common bed bug, *Cimex lectularius*, in poultry farms’, *Parasites & vectors*. BioMed Central, 15(1), p. 431. doi: 10.1186/s13071-022-05555-6.
- Gray, J. S. (1998) ‘The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis’, *Experimental and Applied Acarology*, 22(5), pp. 249–258. doi: 10.1023/A:1006070416135.
- Grote, A. *et al.* (2017) ‘Defining *Brugia malayi* and Wolbachia symbiosis by stage-specific dual RNA-seq’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.pntd.0005357.
- Gruntenko, N. E. *et al.* (2017) ‘Various Wolbachia genotypes differently influence host *Drosophila* dopamine metabolism and survival under heat stress conditions’, *BMC Evolutionary Biology*, 17(Suppl 2). doi: 10.1186/s12862-017-1104-y.
- Guedes, R. N. C. and Cutler, G. C. (2014) ‘Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management’, *Pest Management Science*, 70(5), pp. 690–697. doi: 10.1002/ps.3669.
- Haberkorn, C. *et al.* (2023) ‘A major 6 Mb superlocus is involved in pyrethroid resistance in the common bed bug *Cimex lectularius*’, *Evolutionary Applications*, 16(5), pp. 1012–1028. doi: 10.1111/eva.13550.

- Hague, M. T. J. *et al.* (2022) ‘Temperature effects on cellular host-microbe interactions explain continent-wide endosymbiont prevalence’, *Current Biology*. Elsevier Inc., 32(4), pp. 878–888.e8. doi: 10.1016/j.cub.2021.11.065.
- El Hamzaoui, B. *et al.* (2019) ‘Testing the competence of cimex lectularius bed bugs for the transmission of borrelia recurrentis, the agent of relapsing fever’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), pp. 1407–1412. doi: 10.4269/ajtmh.18-0804.
- Hansen, A. K. and Moran, N. A. (2014) ‘The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects’, *Molecular Ecology*, 23(6), pp. 1473–1496. doi: 10.1111/mec.12421.
- Hargitai, D. *et al.* (2022) ‘Autophagy controls Wolbachia infection upon bacterial damage and in aging Drosophila’, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10(October), pp. 1–11. doi: 10.3389/fcell.2022.976882.
- Harraca, V., Ryne, C. and Ignell, R. (2010) ‘Nymphs of the common bed bug (Cimex lectularius) produce anti-aphrodisiac defence against conspecific males’, *BMC Biology*, 8(121), pp. 1–7. doi: 10.1186/1741-7007-8-121.
- Hasnaoui, B. *et al.* (2023) ‘Survey of bed bug infestations in homeless shelters in southern France’, *Scientific reports*. Nature Publishing Group UK, 13(1), p. 12557. doi: 10.1038/s41598-023-38458-2.
- Haynes, K. F., Goodman, M. H. and Potter, M. F. (2010) ‘Bed bug deterrence’, *BMC Biology*, 8(Figure 1), pp. 8–10. doi: 10.1186/1741-7007-8-117.
- Heddi, A. and Zaidman-Rémy, A. (2018) ‘Endosymbiosis as a source of immune innovation’, *C. R. Biologies*, 341, pp. 290–296. doi: 10.1016/j.crvi.2018.03.005.
- Hedges, L. M. *et al.* (2008) ‘Wolbachia and virus protection in insects’, *Science*, 322(5902), p. 702. doi: 10.1126/science.1162418.
- Hentley, W. T. *et al.* (2017) ‘Bed bug aggregation on dirty laundry: A mechanism for passive dispersal’, *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–5. doi: 10.1038/s41598-017-11850-5.
- Hertig, M. and Wolbach, S. B. (1924) ‘Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects.’, *The Journal of medical research*, 44(3), pp. 329–374.7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19972605> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2041761>.
- Hertwig, O. (1883) ‘Die Symbiose oder das Genossenschaftsleben im tierreich’, *Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte*, (56).
- Hickin, M. L., Kakumanu, M. L. and Schal, C. (2022) ‘Effects of Wolbachia elimination and B-vitamin supplementation on bed bug development and reproduction’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 12(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-022-14505-2.
- Hilgenboecker, K. *et al.* (2008) ‘How many species are infected with Wolbachia? - A statistical analysis of current data’, *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), pp. 215–220. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x.
- Himler, A. G. *et al.* (2011) ‘Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias’, *Science*, 332(6026), pp. 254–256. doi: 10.1126/science.1199410.
- Hinde, R. (1970) ‘The fine structure of the mycetome symbiotes of the aphids Brevicoryne

- brassicaceae, Myzus persicae, and Macrosiphum rosae', *Insect Physiol*, 17, pp. 2035–2050.
- Hinde, R. (1971) 'The control of the mycetome symbiotes of the Aphids *Brevicoryne brassicae*, *Myzus persicae*, and *Macrosiphum rosae*', *Journal of Insect Physiology*, 17, pp. 1791–1800.
- Hoerauf, A. *et al.* (2000) 'Targeting of Wolbachia endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: Comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin', *Tropical Medicine and International Health*, 5(4), pp. 275–279. doi: 10.1046/j.1365-3156.2000.00544.x.
- Hoffmann, A. A. *et al.* (2011) *Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission*, *Nature*. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nature10356.
- Hom, E. F. Y. and Penn, A. S. (2021) *Symbiosis and the Anthropocene*, *Symbiosis*. doi: 10.1007/s13199-021-00794-0.
- Hosokawa, T. *et al.* (2007) 'Obligate symbiont involved in pest status of host insect', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1621), pp. 1979–1984. doi: 10.1098/rspb.2007.0620.
- Hosokawa, T. *et al.* (2010) 'Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist', *PNAS*, 107(2), pp. 769–774. doi: 10.1073/pnas.0911476107.
- How, Y. F. and Lee, C. Y. (2010) 'Effects of temperature and humidity on the survival and water loss of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae)', *Journal of Medical Entomology*, 47(6), pp. 987–995. doi: 10.1603/ME10018.
- Hussain, S. *et al.* (2022) 'The Symbiotic Continuum Within Ticks: Opportunities for Disease Control', *Frontiers in Microbiology*, 13(March), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2022.854803.
- Hwang, S. W. *et al.* (2005) 'Bed bug infestations in an urban environment', *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), pp. 533–538. doi: 10.3201/eid1104.041126.
- Hypša, V. and Aksoy, S. (1997) 'Phylogenetic characterization of two transovarially transmitted endosymbionts of the bedbug *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae)', *Insect Molecular Biology*, 6(3), pp. 301–304. doi: 10.1046/j.1365-2583.1997.00178.x.
- Ibn-Mohammed, T. *et al.* (2021) 'A critical review of the impacts of COVID-19 on the global economy and ecosystems and opportunities for circular economy strategies', *Resources, Conservation and Recycling*. Elsevier, 164(May 2020), p. 105169. doi: 10.1016/j.resconrec.2020.105169.
- Ikeda-Ohtsubo, W. *et al.* (2018) 'How Can We Define "Optimal Microbiota?": A Comparative Review of Structure and Functions of Microbiota of Animals, Fish, and Plants in Agriculture', *Frontiers in Nutrition*, 5(October), pp. 1–18. doi: 10.3389/fnut.2018.00090.
- Ishigami, K. *et al.* (2021) 'Insecticide resistance governed by gut symbiosis in a rice pest, *Cletus punctiger*, under laboratory conditions', *Biology Letters*, 17(3). doi: 10.1098/rsbl.2020.0780.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T. and O'Neill, S. L. (2011) 'Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease', *EMBO Reports*, 12(6), pp. 508–518. doi: 10.1038/embor.2011.84.
- Jackson, R. *et al.* (2022) 'Convergent evolution of a labile nutritional symbiosis in ants', *ISME Journal*. Springer US, 16(9), pp. 2114–2122. doi: 10.1038/s41396-022-01256-1.
- Janisch, E. (1932) 'Über das Verhalten von Populationen bei Verschiedenen zuchtbedingungen', *Beobachtungen bei der Aufzucht von Bettwazen*, pp. 460–514.

- Janke, R. S. *et al.* (2022) ‘Morphological adaptation for ectosymbiont maintenance and transmission during metamorphosis in *Lagria* beetles’, *Frontiers in Physiology*, 13(August), pp. 1–15. doi: 10.3389/fphys.2022.979200.
- Janson, E. M. *et al.* (2008) ‘Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification’, *Evolution*, 62(5), pp. 997–1012. doi: 10.1111/j.1558-5646.2008.00348.x.
- Johnson, C. G. (1941) ‘The ecology of the bed-bug, *Cimex lectularius* L., in Britain: Report on research, 1935–1940’, *Journal of Hygiene*, 41(4), pp. 345–461. doi: 10.1017/S0022172400012560.
- Jones, R. M. (1930) ‘Some Effects of Temperature and Humidity as Factors in the Biology of the Bedbug (*Cimex Lectularius* Linn.)’, *Annals of the Entomological Society of America*. Oxford University Press (OUP), 23(1), pp. 105–119. doi: 10.1093/aesa/23.1.105.
- Ju, J. F. *et al.* (2020) ‘Wolbachia supplement biotin and riboflavin to enhance reproduction in planthoppers’, *ISME Journal*. Springer US, 14(3), pp. 676–687. doi: 10.1038/s41396-019-0559-9.
- Kaltenpoth, M. (2009) ‘Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects?’, *Trends in Microbiology*, 17(12), pp. 529–535. doi: 10.1016/j.tim.2009.09.006.
- Kamtchum-Tatuene, J. *et al.* (2017) ‘The potential role of Wolbachia in controlling the transmission of emerging human arboviral infections’, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 30(1), pp. 108–116. doi: 10.1097/QCO.0000000000000342.
- Kanyile, S. N. *et al.* (2023) ‘Endosymbiosis allows *Sitophilus oryzae* to persist in dry conditions’, *Frontiers in Microbiology*, 14(July), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2023.1199370.
- Kaur, R. *et al.* (2021) ‘Living in the endosymbiotic world of Wolbachia: A centennial review’, *Cell Host and Microbe*. Elsevier Inc., 29(6), pp. 879–893. doi: 10.1016/j.chom.2021.03.006.
- Kiefer, J. S. T. *et al.* (2023) ‘Cuticle supplementation and nitrogen recycling by a dual bacterial symbiosis in a family of xylophagous beetles’, *ISME Journal*. Springer US, 17(7), pp. 1029–1039. doi: 10.1038/s41396-023-01415-y.
- Kikuchi, Y. *et al.* (2012) ‘Symbiont-mediated insecticide resistance’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), pp. 8618–8622. doi: 10.1073/pnas.1200231109.
- Koch, A. (1959) ‘Intracellular symbiosis in insects’, *Annual Review of Microbiology*, pp. 121–140.
- Kose, H. and Karr, T. L. (1995) ‘Organization of *Wolbachia pipientis* in the *Drosophila* fertilized egg and embryo revealed by an anti-*Wolbachia* monoclonal antibody’, *Mechanisms of Development*, 51(2–3), pp. 275–288. doi: 10.1016/0925-4773(95)00372-X.
- Kot, M. *et al.* (2016) ‘Development of ovary structures in the last larval and adult stages of psyllids (Insecta, Hemiptera, Sternorrhyncha: Psylloidea)’, *Arthropod Structure and Development*, 45(4), pp. 389–398. doi: 10.1016/j.asd.2016.04.004.
- Kraemer, M. U. G. *et al.* (2019) ‘Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*’, *Nature Microbiology*. Springer US, 4(5), pp. 854–863. doi: 10.1038/s41564-019-0376-y.
- Krafsur, E. S. (2009) ‘Tsetse flies: Genetics, evolution, and role as vectors’, *Infection, Genetics*

and Evolution, 9(1), pp. 124–141. doi: 10.1016/j.meegid.2008.09.010.

Kremer, N. *et al.* (2018) ‘Persistent Interactions with Bacterial Symbionts Direct Mature-Host Cell Morphology and Gene Expression in the Squid-Vibrio Symbiosis’, *mSystems*, 3(5), pp. 1–17. doi: 10.1128/msystems.00165-18.

Küchler, S. M., Dettner, K. and Kehl, S. (2010) ‘Molecular characterization and localization of the obligate endosymbiotic bacterium in the birch catkin bug *Kleidocerys resedae* (Heteroptera: Lygaeidae, Ischnorhynchinae)’, *FEMS Microbiology Ecology*, 73(2), pp. 408–418. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00890.x.

Kuechler, S. M. *et al.* (2012) ‘Diversity of symbiotic organs and bacterial endosymbionts of: Lygaeoid bugs of the families blissidae and lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeoidea)’, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), pp. 2648–2659. doi: 10.1128/AEM.07191-11.

Kupper, M. *et al.* (2016) ‘Distribution of the obligate endosymbiont *Blochmannia floridanus* and expression analysis of putative immune genes in ovaries of the carpenter ant *Camponotus floridanus*’, *Arthropod Structure and Development*. Elsevier Ltd, 45(5), pp. 475–487. doi: 10.1016/j.asd.2016.09.004.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. and Christensen, R. H. B. (2017) ‘lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models’, *Journal of Statistical Software*, 82(13), pp. 1–26. doi: 10.18637/JSS.V082.I13.

Lai, O. *et al.* (2016) ‘Bed bugs and possible transmission of human pathogens: a systematic review’, *Archives of Dermatological Research*. Springer Berlin Heidelberg, 308(8), pp. 531–538. doi: 10.1007/s00403-016-1661-8.

Langer, L., Froschauer, C. and Reinhardt, K. (2020) ‘Sex differences in bedbug nymphs, *Cimex lectularius*’, *Journal of Applied Entomology*, 144(9), pp. 838–843. doi: 10.1111/jen.12823.

Larsson, D. G. J. and Flach, C. F. (2022) ‘Antibiotic resistance in the environment’, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 20(5), pp. 257–269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x.

Latorre, A. *et al.* (2022) ‘Of Cockroaches and Symbionts: Recent Advances in the Characterization of the Relationship between *Blattella germanica* and Its Dual Symbiotic System’, *Life*, 12(2). doi: 10.3390/life12020290.

Laven, H. (1967) ‘Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility’, *Nature*, 216, pp. 383–384.

Lehane, M. J. (2005) *The Biology of Blood-Sucking in Insects*. 2nd edn. Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511610493.

Lesser, M. P. and Farrell, J. H. (2004) ‘Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress’, *Coral Reefs*, 23(3), pp. 367–377. doi: 10.1007/s00338-004-0392-z.

Leulmi, H. *et al.* (2015) ‘Competence of *Cimex lectularius* Bed Bugs for the Transmission of *Bartonella quintana*, the Agent of Trench Fever’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), pp. 4–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0003789.

Li, R. *et al.* (2022) ‘Transcription and Post-translational Regulation of Autophagy in Insects’, *Frontiers in Physiology*, 13(February), pp. 1–9. doi: 10.3389/fphys.2022.825202.

Li, Y. *et al.* (2020) ‘Background-dependent *Wolbachia*-mediated insecticide resistance in

- Laodelphax striatellus', *Environmental Microbiology*, 22(7), pp. 2653–2663. doi: 10.1111/1462-2920.14974.
- Lindsey, A. R. *et al.* (2023) 'Wolbachia is a nutritional symbiont in *Drosophila melanogaster*', *bioRxiv*, p. <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524972>. Available at: <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524972>.
- Liu, F., Chen, Z. and Liu, N. (2017) 'Molecular Basis of Olfactory Chemoreception in the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(November 2016), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep45531.
- Liu, X. D. and Guo, H. F. (2019) 'Importance of endosymbionts Wolbachia and Rickettsia in insect resistance development', *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc, 33, pp. 84–90. doi: 10.1016/j.cois.2019.05.003.
- Lo, N. *et al.* (2002) 'How many Wolbachia supergroups exist?', *Society for molecular biology and evolution*, 19(3), pp. 341–346. doi: 10.1080/13518040701205365.
- Login, F. H. *et al.* (2011) 'Antimicrobial Peptides Keep Insect Endosymbionts Under Control', *Science*, (334), pp. 362–365. doi: 10.1126/science.1209728.
- Lowe, C. F. and Romney, M. G. (2011) *Bedbugs as vectors for drug-resistant bacteria*, *International Pest Control*. doi: 10.3201/eid1706101978.
- Madhav, M. *et al.* (2020) 'Wolbachia: A tool for livestock ectoparasite control', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 288(November), p. 109297. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109297.
- Madhusoodanan, J. (2019) 'Do hosts and their microbes evolve as a unit?', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(29), pp. 14391–14394. doi: 10.1073/pnas.1908139116.
- Mahmood, S. *et al.* (2023) 'Extremely reduced supergroup F Wolbachia: transition to obligate insect symbionts', *Microbiome*, p. 16. doi: 10.1186/s40168-023-01462-9.
- Maire, J. *et al.* (2020) 'Spatial and morphological reorganization of endosymbiosis during metamorphosis accommodates adult metabolic requirements in a weevil', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(32), pp. 19347–19358. doi: 10.1073/pnas.2007151117.
- Malagoli, D. *et al.* (2010) 'Autophagy and its physiological relevance in arthropods: Current knowledge and perspectives', *Autophagy*, 6(5), pp. 575–588. doi: 10.4161/auto.6.5.11962.
- Margulis, L. (1967) 'On the origin of mitosing cells', *Journal of theoretical biology*, 14(3), pp. 255–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11541390>.
- Margulis, L. (1999) *Symbiotic Planet (A new look at evolution)*. Broché.
- Marshall, A. G. (1981) *The ecology of ectoparasitic insects*.
- Martinez, J. *et al.* (2015) 'Should Symbionts Be Nice or Selfish? Antiviral Effects of Wolbachia Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not', *PLoS Pathogens*, 11(7), pp. 1–20. doi: 10.1371/journal.ppat.1005021.
- Matsuura, Y. *et al.* (2012) 'Evolution of symbiotic organs and endosymbionts in lygaeid stinkbugs', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 6(2), pp. 397–409. doi: 10.1038/ismej.2011.103.

- May, R. M. (1988) 'How Many Species are There on Earth? Robert', *Science*, 241(4872), pp. 1441–1449.
- Mayer, V. E. *et al.* (2014) 'Current issues in the evolutionary ecology of ant-plant symbioses', *New Phytologist*, 202(3), pp. 749–764. doi: 10.1111/nph.12690.
- McCutcheon, J. P. and Moran, N. A. (2012) 'Extreme genome reduction in symbiotic bacteria', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 13–26. doi: 10.1038/nrmicro2670.
- McFall-ngai, M. (2008) 'Are biologists in "future shock"? Symbiosis integrates biology across domains Margaret', *Nature Perspectives*, 6, pp. 789–792.
- McFall-Ngai, M. J. (2014) 'The importance of microbes in animal development: Lessons from the squid-vibrio symbiosis', *Annual Review of Microbiology*, 68, pp. 177–194. doi: 10.1146/annurev-micro-091313-103654.
- McMeniman, C. J. *et al.* (2009) 'Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*', *Science*, 323(January), pp. 141–144.
- Medzhitov, R. (2007) 'Recognition of microorganisms and activation of the immune response', *Nature*, 449(7164), pp. 819–826. doi: 10.1038/nature06246.
- De Meillon, B. and Golberg, L. (1947) 'Preliminary studies on the nutritional requirements of the bedbug (*Cimex lectularius* L.) and the tick *Ornithodoros moubata* Murray.', *Journal of Experimental Biology*, 24(1944), pp. 41–63. Available at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19501000230>.
- Mellanby, K. (1939) 'Fertilization and egg production in the bed-bug, *Cimex lectularius* L.', *Parasitology*, 31(2), pp. 193–199. doi: 10.1017/S0031182000012750.
- Mergaert, P. (2018) 'Role of antimicrobial peptides in controlling symbiotic bacterial populations', *Natural Product Reports*. Royal Society of Chemistry, 35(4), pp. 336–356. doi: 10.1039/c7np00056a.
- Meriweather, M. *et al.* (2013) 'A 454 Survey Reveals the Community Composition and Core Microbiome of the Common Bed Bug (*Cimex lectularius*) across an Urban Landscape', *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061465.
- Meyer-Abich, A. (1943) 'Beiträge zur Theorie der Evolution der Organismen.', *Acta Biotheoretica*, (7), pp. 1–80.
- Milburn, N. S. (1966) 'Fine structure of the pleomorphic bacteroids in the mycetocytes and ovaries of several genera of cockroaches', *Journal of Insect Physiology*, 12(10). doi: 10.1016/0022-1910(66)90015-1.
- Monnin, D. *et al.* (2016) 'Influence of oxidative homeostasis on bacterial density and cost of infection in *Drosophila*-*Wolbachia* symbioses', *Journal of evolutionary biology*, 29(6), pp. 1211–1222. doi: 10.1111/jeb.12863.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P. and Nakabachi, A. (2008) 'Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts', *Annual Review of Genetics*, 42, pp. 165–190. doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130119.
- Moran, N. A., Telang, A. and Smith, M. (1998) 'Symbionts of Insects, A variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts', *BioScience*, 48(4), pp. 295–304. doi: 10.1007/0-387-30741-9_16.

- Moran, N. A., Tran, P. and Gerardo, N. M. (2005) ‘Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes’, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), pp. 8802–8810. doi: 10.1128/AEM.71.12.8802-8810.2005.
- Moriyama, M. *et al.* (2015) ‘Riboflavin Provisioning Underlies Wolbachia’s Fitness Contribution to Its Insect Host’, *mBio*, 6(6), pp. e01732-15. doi: 10.1128/mBio.01732-15.
- Moshaverinia, A. *et al.* (2022) ‘Geographical patterns and mechanisms of *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758, and *Cimex hemipterus* Fabricius, 1803 (Hemiptera: Cimicidae) resistance to insecticides: a systematic review and meta-analysis’, *Parasitology Research*, 121(7), pp. 1817–1827. doi: 10.1007/s00436-022-07530-7.
- Nadal-Jimenez, P. *et al.* (2022) ‘*Symbiopectobacterium purcellii*, gen. nov., sp. nov., isolated from the leafhopper *Empoasca decipiens*’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(6), pp. 1–13. doi: 10.1099/ijsem.0.005440.
- Newton, I. L. G. and Rice, D. W. (2020) ‘The Jekyll and Hyde symbiont: Could Wolbachia be a nutritional mutualist?’, *Journal of Bacteriology*, 202(4). doi: 10.1128/JB.00589-19.
- Newton, I. L. G., Savytsky, O. and Sheehan, K. B. (2015) ‘Wolbachia Utilize Host Actin for Efficient Maternal Transmission in *Drosophila melanogaster*’, *PLoS Pathogens*, 11(4), pp. 1–19. doi: 10.1371/journal.ppat.1004798.
- Ngwewondo, A., Scandale, I. and Specht, S. (2021) ‘Onchocerciasis drug development: from preclinical models to humans’, *Parasitology Research*. Springer Berlin Heidelberg, 120(12), pp. 3939–3964. doi: 10.1007/s00436-021-07307-4.
- Nikoh, N. *et al.* (2014) ‘Evolutionary origin of insect-Wolbachia nutritional mutualism’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), pp. 10257–10262. doi: 10.1073/pnas.1409284111.
- Niznik, S. and Szklarzewicz, T. (2007) ‘Structure and development of hermaphroditic gonad in *Icerya purchasi* (Insecta, Hemiptera, Coccinea: Monophlebidae)’, *Zool. Polon.*, 52, pp. 71–90.
- Nozaki, T. and Shigenobu, S. (2022) ‘Ploidy dynamics in aphid host cells harboring bacterial symbionts’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-022-12836-8.
- Oliver, K. M. *et al.* (2003) ‘Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), pp. 1803–1807. doi: 10.1073/pnas.0335320100.
- Oliver, K. M. *et al.* (2010) ‘Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits’, *Annual Review of Entomology*, 55, pp. 247–266. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085305.
- Oliver, K. M. and Higashi, C. H. (2019) ‘Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success’, *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc, 32, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cois.2018.08.009.
- Orr-Weaver, T. L. (2015) ‘When bigger is better: The role of polyploidy in organogenesis’, *Trends in Genetics*, 31(6), pp. 307–315. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.011.
- Pais, R. *et al.* (2008) ‘The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly’, *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 74(19), pp. 5965–5974. doi: 10.1128/AEM.00741-08.
- Pan, X. *et al.* (2012) ‘Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1). doi: 10.1073/pnas.1116932108.
- Panagiotakopulu, E. and Buckland, P. C. (1999) ‘*Cimex lectularius* L., the common bed bug from pharaonic Egypt’, *Antiquity*, 73(282), pp. 908–911. doi: 10.1017/S0003598X00065674.
- Parola, P. and Izri, A. (2020) ‘Clinical Practice: Clinical Practice’, *New England Journal of Medicine*, 382(23), pp. 2230–2237. doi: 10.1056/NEJMcp1905840.
- Peoples, M. B. *et al.* (2009) ‘The contributions of nitrogen-fixing crop legums to the productivity of the agricultural systems’, *SYMBIOSIS*, 48, pp. 1–17. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/227091900>.
- Pfaffl, M. W. (2001) ‘A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR’, *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. 16–21.
- De Piceis Polver, P. *et al.* (1986) ‘Fine Structure of the Fat Body and its Bacteroids in *Blattella germanica* (Blattodea)’, *Acta Zoologica*, 67(2), pp. 63–71. doi: 10.1111/j.1463-6395.1986.tb00850.x.
- Pietri, J. E., DeBruhl, H. and Sullivan, W. (2016) ‘The rich somatic life of Wolbachia’, *MicrobiologyOpen*, 5(6), pp. 923–936. doi: 10.1002/mbo3.390.
- Pietri, J. E. and Liang, D. (2018) ‘Virulence of entomopathogenic bacteria in the bed bug, *Cimex lectularius*’, *Journal of Invertebrate Pathology*, 151(October), pp. 1–6. doi: 10.1016/j.jip.2017.10.004.
- Pilgrim, J. *et al.* (2017) ‘Torix group Rickettsia are widespread in Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), reach high frequency and carry unique genomic features’, *Environmental Microbiology*, 19(10), pp. 4238–4255. doi: 10.1111/1462-2920.13887.
- Pilgrim, J. *et al.* (2021) ‘Torix Rickettsia are widespread in arthropods and reflect a neglected symbiosis’, *GigaScience*. Oxford University Press, 10(3), pp. 1–19. doi: 10.1093/gigascience/giab021.
- Pimentel, A. C. *et al.* (2021) ‘The Antiviral Effects of the Symbiont Bacteria Wolbachia in Insects’, *Frontiers in Immunology*, 11(January), pp. 1–10. doi: 10.3389/fimmu.2020.626329.
- Porter, J. and Sullivan, W. (2023) ‘The cellular lives of Wolbachia’, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US. doi: 10.1038/s41579-023-00918-x.
- Postler, T. S. and Ghosh, S. (2017) ‘Understanding the Holobiont: How microbial metabolites affect human health and shape the immune system’, *Physiology & behavior*, 26(1), pp. 110–130. doi: doi:10.1016/j.cmet.2017.05.008.
- Potts, R. *et al.* (2020) ‘Molecular detection of Rickettsia infection in field-collected bed bugs’, *New Microbes and New Infections*. Elsevier Ltd, 34, p. 100646. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100646.
- Potts, R. *et al.* (2021) ‘Molecular analysis of the blood meals and bacterial communities of bed bugs (*Cimex lectularius* L.) to assess interactions with alternative hosts’, *Parasitology Research*. Parasitology Research, 120(4), pp. 1209–1217. doi: 10.1007/s00436-021-07079-x.

- Poulin, R., Jorge, F. and Salloum, P. M. (2023) 'Inter-individual variation in parasite manipulation of host phenotype: A role for parasite microbiomes?', *Journal of Animal Ecology*, 92(4), pp. 807–812. doi: 10.1111/1365-2656.13764.
- Querejeta, J. I. (2017) *Soil Water Retention and Availability as Influenced by Mycorrhizal Symbiosis: Consequences for Individual Plants, Communities, and Ecosystems, Mycorrhizal Mediation of Soil: Fertility, Structure, and Carbon Storage*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-804312-7.00017-6.
- R. C. Axtellarends, J. J. (1990) 'Ecology and management of arthropod pests of poultry', *Annual review of entomology*. Vol. 35, pp. 101–126. doi: 10.1146/annurev.ento.35.1.101.
- Radousky, Y. A. *et al.* (2023) 'Distinct Wolbachia localization patterns in oocytes of diverse host species reveal multiple strategies of maternal transmission', *Genetics*, 224(1), pp. 1–51. doi: 10.1093/genetics/iyad038.
- Rao, H. V (1971) 'Free sugars in the reproductive system and hemolymph of the bed bug', *Proc. Ind. Acad. Sci.*, 75(6), pp. 294–303.
- Reinhardt, K., Naylor, R. A. and Siva-Jothy, M. T. (2005) 'Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect', *Ecological Entomology*, 30(5), pp. 607–611. doi: 10.1111/j.0307-6946.2005.00730.x.
- Reinhardt, K., Naylor, R. and Siva-Jothy, M. T. (2003) 'Reducing a cost of traumatic insemination: Female bedbugs evolve a unique organ', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1531), pp. 2371–2375. doi: 10.1098/rspb.2003.2515.
- Reinhardt, K. and Siva-Jothy, M. T. (2007) 'Biology of the Bed Bugs (Cimicidae)', *Annual Review of Entomology*, 52(1), pp. 351–374. doi: 10.1146/annurev.ento.52.040306.133913.
- Říhová, J. *et al.* (2017) 'Legionella becoming a mutualist: Adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse polyplax serrata', *Genome Biology and Evolution*, 9(11), pp. 2946–2957. doi: 10.1093/gbe/evx217.
- Rio, R. V. M. *et al.* (2006) 'Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: Tsetse fly and its microbial flora', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1588), pp. 805–814. doi: 10.1098/rspb.2005.3399.
- Rio, R. V. M., Attardo, G. M. and Weiss, B. L. (2017) 'Grandeur alliances: Symbiont metabolic integration and obligate arthropod hematophagy', *Physiology & behavior*, 176(12), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.pt.2016.05.002.Grandeur.
- Rivnay, E. (1932) 'Studies in Tropisms of the Bed Bug *Cimex lectularius* L.', *Parasitology*, 24(1), pp. 121–136. doi: 10.1017/S0031182000020461.
- Rocha, M. N. *et al.* (2019) 'Pluripotency of wolbachia against arboviruses: The case of yellow fever', *Gates Open Research*, 3(May), pp. 1–27. doi: 10.12688/gatesopenres.12900.1.
- Romero, A., Potter, M. F. and Haynes, K. F. (2010) 'Circadian rhythm of spontaneous locomotor activity in the bed bug, *Cimex lectularius* L.', *Journal of Insect Physiology*. Elsevier Ltd, 56(11), pp. 1516–1522. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.04.025.
- Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I. (2013) *Variation in Holobionts, The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota*. doi: 10.1007/978-3-319-13904-3_6.
- Rosenfeld, J. A. *et al.* (2016) 'Genome assembly and geospatial phylogenomics of the bed bug *Cimex lectularius*', *Nature Communications*, (7:10164), pp. 1–10. doi: 10.1038/ncomms10164.

- Ross, P. A. *et al.* (2017) ‘Wolbachia Infections in *Aedes aegypti* Differ Markedly in Their Response to Cyclical Heat Stress’, *PLOS Pathogens*, 13(1), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.ppat.1006006.
- Roth, S. *et al.* (2019) ‘Bedbugs Evolved before Their Bat Hosts and Did Not Co-speciate with Ancient Humans’, *Current Biology*, 29(11), pp. 1847–1853.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.04.048.
- Ruehland, C. *et al.* (2008) ‘Multiple bacterial symbionts in two species of co-occurring gutless oligochaete worms from Mediterranean sea grass sediments’, *Environmental Microbiology*, 10(12), pp. 3404–3416. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01728.x.
- Russell, J. A. *et al.* (2003) ‘Side-stepping secondary symbionts: Widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea’, *Molecular Ecology*, 12(4), pp. 1061–1075. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01780.x.
- Sacchi, L. *et al.* (1988) ‘Symbionts in the oocytes of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera : Blattellidae): Their mode of transmission’, *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 17(6), pp. 437–446. doi: 10.1016/0020-7322(88)90023-2.
- Sadilek, D. *et al.* (2013) ‘Extensive fragmentation of the X chromosome in the bed bug *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 (Heteroptera, Cimicidae): a survey across Europe’, *Comparative Cytogenetics*, 7(4), pp. 253–269. doi: 10.3897/CompCytogen.v7i4.6012.
- Saenz, V. L. *et al.* (2014) ‘Group living accelerates bed bug (Hemiptera: Cimicidae) Development’, *Journal of Medical Entomology*, 51(1), pp. 293–295. doi: 10.1603/ME13080.
- Sakamoto, Joyce M. and Ragson, J. L. (2006) ‘Endosymbiotic Bacteria of Bed Bugs: Evolution, Ecology and Genetics’, *American Entomologist*, 52(2), pp. 119–122.
- Sakamoto, J. M. and Rasgon, J. L. (2006) ‘Geographic distribution of Wolbachia infections in *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae)’, *Journal of Medical Entomology*, 43(4), pp. 696–700. doi: 10.1603/0022-2585(2006)43[696:GDOWII]2.0.CO;2.
- Salazar, R. *et al.* (2015) ‘Bed bugs (*Cimex lectularius*) as vectors of *Trypanosoma cruzi*’, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(2), pp. 331–335. doi: 10.4269/ajtmh.14-0483.
- Salem, H. *et al.* (2017) ‘Drastic Genome Reduction in an Herbivore’s Pectinolytic Symbiont’, *Cell*. Elsevier Inc., 171(7), pp. 1520–1531.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.029.
- Saveer, A. M. *et al.* (2021) *Mating and starvation modulate feeding and host-seeking responses in female bed bugs, Cimex lectularius*, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK. doi: 10.1038/s41598-021-81271-y.
- Savory, E. A. *et al.* (2018) ‘Erratum: Correction: Evolutionary transitions between beneficial and phytopathogenic *Rhodococcus* challenge disease management (eLife (2017) 6 PII: e36350)’, *eLife*, 7, pp. 1–28. doi: 10.7554/eLife.36350.
- Scarborough, C. L., Ferrari, J. and Godfray, H. C. (2005) ‘Aphid Protected from Pathogen’, *Science*, 310(December), p. 2005. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16357252.
- Schaechter, M. (2016) *Molecular Basis of Symbiosis*, *Microbe Magazine*. doi: 10.1128/microbe.2.44.2.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W. (2012) ‘NIH Image to ImageJ: 25 years

- of image analysis', *Nature Methods*. Nature Publishing Group, 9(7), pp. 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
- Schwendener, S. (1869) 'Die Algentypen der Flechten gonidien', *Programm für die Rektorsfeier der Universität Basel*, (4), pp. 1–42.
- Serbus, L. R. and Sullivan, W. (2007) 'A Cellular Basis for Wolbachia Recruitment to the Host Germline', *PLOS Pathogens*, 3(12), pp. 1930–1937. doi: 10.1371/journal.ppat.0030190.
- Serrato-Salas, J. and Gendrin, M. (2022) 'The involvement of the microbiota in insect physiology: focus on B vitamins', *mBio*, 14(1), pp. 1–38.
- Sheppard, C. *et al.* (2022) "'When the bedbugs come, that's another problem': exploring the lived experiences of bedbug infestations among low-income older adults and service providers who support them', *Perspective in public health*, 20(10), pp. 1–8. doi: 10.1177/17579139221118777.
- Siddiqui, J. A. *et al.* (2022) 'Role of Insect Gut Microbiota in Pesticide Degradation: A Review', *Frontiers in Microbiology*, 13(May). doi: 10.3389/fmicb.2022.870462.
- Sieglwart, M. *et al.* (2015) 'Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: A review', *Frontiers in Plant Science*, 6(JUNE), pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2015.00381.
- Silverman, A. L. *et al.* (2001) 'Assessment of hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA in the common bedbug (*Cimex lectularius* L.) and kissing bug (*Rodnius prolixus*)', *American Journal of Gastroenterology*, 96(7), pp. 2194–2198. doi: 10.1016/S0002-9270(01)02518-7.
- Simonet, P. *et al.* (2016) 'Direct flow cytometry measurements reveal a fine-tuning of symbiotic cell dynamics according to the host developmental needs in aphid symbiosis', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (January), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep19967.
- Simonet, P. *et al.* (2018) 'Bacteriocyte cell death in the pea aphid / *Buchnera* symbiotic system', *PNAS*, pp. 1819–1828. doi: 10.1073/pnas.1720237115.
- Sinkins, S. P. (2013) 'Wolbachia and arbovirus inhibition in mosquitoes', *Future Microbiology*, 8(10), pp. 1249–1256. doi: 10.2217/fmb.13.95.
- Sinkins, S. P. and O'Neill, S. (2000) 'Wolbachia as a vehicle to modify insect populations, In AJA Handler, Insect transgenesis: methods and applications, CRC Press', *Insect Transgenesis: Methods and Applications*, pp. 271–288.
- Siva-jothy, M. T. *et al.* (2019) 'Female bed bugs (*Cimex lectularius* L) anticipate the immunological consequences of traumatic insemination via feeding cues', *PNAS*, 116(29). doi: 10.1073/pnas.1904539116.
- Siva-Jothy, M. T. (2006) 'Trauma, disease and collateral damage: Conflict in cimicids', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1466), pp. 269–275. doi: 10.1098/rstb.2005.1789.
- Skendžić, S. *et al.* (2021) *The impact of climate change on agricultural insect pests*, *Insects*. doi: 10.3390/insects12050440.
- Soh, L. S. and Veera Singham, G. (2022) 'Bacterial symbionts influence host susceptibility to fenitrothion and imidacloprid in the obligate hematophagous bed bug, *Cimex hemipterus*', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 12(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-022-09015-0.

- Song, X. *et al.* (2022) ‘Metabolic interactions between disease-transmitting vectors and their microbiota’, *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 38(8), pp. 697–708. doi: 10.1016/j.pt.2022.05.002.
- Steelman, C. D. (2000) ‘Biology and control of bed bugs’, *Avian advice*.
- Steffen, W. *et al.* (2016) ‘Stratigraphic and Earth System approaches to defining the Anthropocene’, *Earth’s Future*, 4(8), pp. 324–345. doi: 10.1002/2016EF000379.
- Štefka, J. *et al.* (2022) ‘*Cimex lectularius* and *Cimex hemipterus* (bed bugs).’, *Trends in parasitology*. England, 38(10), pp. 919–920. doi: 10.1016/j.pt.2022.04.006.
- Steidinger, B. S. *et al.* (2019) ‘Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses’, *Nature*, 569(7756), pp. 404–408. doi: 10.1038/s41586-019-1128-0.
- Sterkel, M. *et al.* (2017) ‘The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods’, *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 33(8), pp. 633–644. doi: 10.1016/j.pt.2017.04.008.
- Strand, M. A. (1978) *Pathogens of Cimicida (Bedbugs)*.
- Strunov, A. *et al.* (2022) ‘Restriction of Wolbachia Bacteria in Early Embryogenesis of Neotropical *Drosophila* Species via Endoplasmic Reticulum- Mediated Autophagy’, *mBio*. American Society for Microbiology, 13(2), pp. 1–24. doi: 10.1128/mbio.03863-21.
- Stutt, A. D. and Siva-Jothy, M. T. (2001) ‘Traumatic insemination and sexual conflict in the bed bug *Cimex lectularius*’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), pp. 5683–5687. doi: 10.1073/pnas.101440698.
- Sudakaran, S., Kost, C. and Kaltenpoth, M. (2017) ‘Symbiont Acquisition and Replacement as a Source of Ecological Innovation’, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 25(5), pp. 375–390. doi: 10.1016/j.tim.2017.02.014.
- Swiatoniowska, M. *et al.* (2013) ‘Ultrastructure, distribution, and transovarial transmission of symbiotic microorganisms in *Nysius ericae* and *Nithecus jacobaeae* (Heteroptera: Lygaeidae: Orsillinae)’, *Protoplasma*, 250(1), pp. 325–332. doi: 10.1007/s00709-012-0416-4.
- Szklarzewicz, T. *et al.* (2007) ‘Structure of the ovaries and oogenesis in *Cixius nervosus* (Cixiidae), *Javesella pellucida* and *Conomelus anceps* (Delphacidae) (Insecta, Hemiptera, Fulgoromorpha)’, *Arthropod Structure and Development*, 36(2), pp. 199–207. doi: 10.1016/j.asd.2006.09.001.
- Szklarzewicz, T. *et al.* (2013) ‘Ovary structure and transovarial transmission of endosymbiotic microorganisms in *Marchalina hellenica* (Insecta, Hemiptera, Coccoomorpha: Marchalinidae)’, *Acta Zoologica*, 94(2), pp. 184–192. doi: 10.1111/j.1463-6395.2011.00538.x.
- Szklarzewicz, T. and Michalik, A. (2017) ‘Transovarial transmission of symbionts in insects’, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 63, pp. 43–67. doi: 10.1007/978-3-319-60855-6_3.
- Tabashnik, B. E., Van Rensburg, J. B. J. and Carrère, Y. (2009) ‘Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data’, *Journal of Economic Entomology*, 102(6), pp. 2011–2025. doi: 10.1603/029.102.0601.
- Takano-Lee, M. *et al.* (2003) ‘An Automated Feeding Apparatus for In Vitro Maintenance of the Human Head Louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae)’, *Journal of Medical*

Entomology, 40(6), pp. 795–799. doi: 10.1603/0022-2585-40.6.795.

Tancos, K. A. *et al.* (2016) ‘Prevalence of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* in New York apple orchards’, *Plant Disease*, 100(4), pp. 802–809. doi: 10.1094/PDIS-09-15-0960-RE.

Teixeira, L., Ferreira, Á. and Ashburner, M. (2008) ‘The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*’, *PLoS Biology*, 6(12), pp. 2753–2763. doi: 10.1371/journal.pbio.1000002.

Thongprem, P. *et al.* (2020) ‘Transmission, Tropism, and Biological Impacts of *Torix Rickettsia* in the Common Bed Bug *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae)’, *Frontiers in Microbiology*, 11(December), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2020.608763.

Tsuchida, T. *et al.* (2010) ‘Symbiotic bacterium modifies aphid body color.’, *Science*. United States, 330(6007), pp. 1102–1104. doi: 10.1126/science.1195463.

Usinger, R. L. (1966) ‘Monograph of Cimicidae’, VII, p. 585.

Utarini, A. *et al.* (2021) ‘Efficacy of *Wolbachia*-infected mosquito deployments for the control of dengue’, *New England Journal of Medicine*, 384(2177–2186). doi: 10.1056/NEJMoa2030243.

Vásquez, V. N. *et al.* (2022) ‘wMel replacement of dengue-competent mosquitoes is robust to near-term climate change’, *bioRxiv*. Springer US, 13(August), p. 2022.10.12.511962. doi: 10.1038/s41558-023-01746-w.

Vavre, F. and Charlat, S. (2012) ‘Making (good) use of *Wolbachia*: What the models say’, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 15(3), pp. 263–268. doi: 10.1016/j.mib.2012.03.005.

Veneti, Z. *et al.* (2004) ‘Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila*-*Wolbachia* system’, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), pp. 5366–5372. doi: 10.1128/AEM.70.9.5366-5372.2004.

Vigneron, A. *et al.* (2014) ‘Insects recycle endosymbionts when the benefit is over’, *Current Biology*, 24(19), pp. 2267–2273. doi: 10.1016/j.cub.2014.07.065.

Voronin, D. *et al.* (2012) ‘Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25). doi: 10.1073/pnas.1203519109.

Wang, C. *et al.* (2016) ‘Bed bugs: Prevalence in low-income communities, resident’s reactions, and implementation of a low-cost inspection protocol’, *Journal of Medical Entomology*, 53(3), pp. 639–646. doi: 10.1093/jme/tjw018.

Wang, J., Gao, L. and Aksoy, S. (2023) ‘Microbiota in disease-transmitting vectors’, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US. doi: 10.1038/s41579-023-00901-6.

Wang, Y. *et al.* (2022) ‘Autophagy Regulates White fl y-Symbiont Metabolic Interactions’, *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3), pp. 1–19.

Wasserstein, R. L. *et al.* (2016) ‘The ASA Statement on p -Values : Context , Process , and Purpose’, *The American Statistician*. Taylor & Francis, 70(2), pp. 129–133. doi: 10.1080/00031305.2016.1154108.

Wasserstein, R. L., Schirm, A. L. and Lazar, N. A. (2019) ‘Moving to a World Beyond “p < 0.05”’, *American Statistician*. Taylor & Francis, 73(sup1), pp. 1–19. doi:

10.1080/00031305.2019.1583913.

Wein, T. *et al.* (2019) 'Currency, Exchange, and Inheritance in the Evolution of Symbiosis', *Trends in Microbiology*. The Authors, 27(10), pp. 836–849. doi: 10.1016/j.tim.2019.05.010.

Weinert, L. A. *et al.* (2015) 'The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), pp. 3–8. doi: 10.1098/rspb.2015.0249.

Wendt, A. (1941) *Über Cimex pipistrelli jenyns und seine formen*.

Werren, J. H., Baldo, L. and Clark, M. E. (2008) 'Wolbachia: Master manipulators of invertebrate biology', *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), pp. 741–751. doi: 10.1038/nrmicro1969.

Whittle, M. *et al.* (2021) 'Insect-host control of obligate, intracellular symbiont density', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1963). doi: 10.1098/rspb.2021.1993.

Wilkinson, T. L. (1998) 'The elimination of intracellular microorganisms from insects: An analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*)', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 119(4), pp. 871–881. doi: 10.1016/S1095-6433(98)00013-0.

Williams, J. E. *et al.* (1976) 'Kaeng Khoi virus from naturally infected bedbugs (Cimicidae) and immature free tailed bats', *Bulletin of the World Health Organization*, 53(4), pp. 365–369.

Wilson, A. C. C. and Duncan, R. P. (2015) 'Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), pp. 10255–10261. doi: 10.1073/pnas.1423305112.

Wu, B. *et al.* (2009) 'The heme biosynthetic pathway of the obligate Wolbachia endosymbiont of *Brugia malayias* a potential anti-filarial drug target', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0000475.

Zaidman-rémy, A. *et al.* (2018) 'What can a weevil teach a fly , and reciprocally ? Interaction of host immune systems with endosymbionts in *Glossina* and *Sitophilus*', *BMC Microbiology*, 18(Suppl 1).

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Decline in symbiont-dependent host detoxification metabolism contributes to increased insecticide susceptibility of insects under high temperature', *ISME Journal*. Springer US, 15(12), pp. 3693–3703. doi: 10.1038/s41396-021-01046-1.

Zhu, F. *et al.* (2013) 'Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides', *Scientific Reports*, 3, pp. 1–8. doi: 10.1038/srep01456.

Zientz, E., Dandekar, T. and Gross, R. (2004) 'Metabolic Interdependence of Obligate Intracellular Bacteria and Their Insect Hosts', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), pp. 745–770. doi: 10.1128/mmb.68.4.745-770.2004.

Zorrilla-Vaca, A., Silva-Medina, M. M. and Escandón-Vargas, K. (2015) 'Bedbugs, *Cimex* spp.: Their current world resurgence and healthcare impact', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(5), pp. 342–352. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60795-7.

Zug, R. and Hammerstein, P. (2015) 'Wolbachia and the insect immune system: What reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of Wolbachia-host interactions', *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2015.01201.

Remerciements

Cette thèse est le résultat d'un long processus d'apprentissage qui ne s'étend pas seulement qu'aux trois dernières années. Je pourrais remercier toutes les institutions qui m'ont accueilli, les personnes qui y ont travaillé et les personnes que j'ai rencontrées car ils ont tous contribué à rendre mon parcours enrichissant. Les remerciements qui vont suivre témoignent de ma profonde gratitude et de mon respect envers vous tous, qui avez marqué mon parcours d'une manière ou d'une autre.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude envers mes directrices et directeurs de thèse, **Natacha, Anna, Fabrice et Romain**. Natacha, ta disponibilité exemplaire m'a convaincu dès nos premières discussions, et tu as su la conserver jusqu'aux révisions finales du manuscrit de thèse. Anna, tu as su me faire porter un regard différent sur certains problèmes lorsque je rencontrais des difficultés à les résoudre. J'ai beaucoup appris de vos méthodes. Votre duo constructif, fondé sur vos expertises, votre exigence et une entente respectueuse, a permis de faire avancer ce projet de la meilleure façon possible. Vous m'avez fait confiance et m'avez laissé la liberté nécessaire pour que je puisse m'approprier pleinement mon travail. Un énorme merci à vous deux. Fabrice, merci d'avoir apporté ton expertise lors des décisions cruciales de la thèse, ce qui a permis d'en tirer le meilleur et de me faire explorer de nouvelles perspectives. Romain, je te remercie de m'avoir accueilli au sein d'Izinovation et de m'avoir fait confiance en me confiant des missions qui ont servi l'entreprise.

Mes remerciements à **Christine Braquart-Varnier, Thierry Hance, Frédéric Landmann, Franck Dedeine et Laurence Mouton** pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse. Votre expertise et vos retours constructifs ont contribué à améliorer la qualité de mon travail et mon expérience.

Je remercie également **Delphine Destoumieux-Garzon, Olivier Duron, François Leulier et Patricia Doublet**. J'ai apprécié votre aide, votre présence, vos conseils et votre soutien à chaque réunion du comité de suivi.

Merci à **Izinovation**. Votre participation à ce projet et la mise à disposition des locaux nécessaires dans les périodes de pandémie et de travaux au laboratoire a été d'une grande aide dans les premiers mois de ma thèse. Merci particulièrement aux membres d'Izinovation, anciens et nouveaux, j'ai beaucoup aimé votre curiosité lors de nos échanges. J'ai vu l'entreprise se développer et vous remercie pour votre confiance dans les tâches qui m'ont été confiées.

Merci au **BF2i. Séverine**, merci de m'avoir formé à la microscopie. Merci à **Meriem** et **Lucie**, pour votre aide précieuse lors des manipulations complexes de cryofixation et d'électromicroscopie. Je remercie également l'équipe de **SymT** et **InEn** pour vos conseils et votre présence lors des événements en laboratoire, qui ont toujours été des moments très agréables. Des remerciements particulièrement chaleureux à l'équipe **SymSI** pour votre bienveillance et votre bonne humeur communicative, qui m'ont permis de me sentir à l'aise au sein de cette équipe.

Merci au **LBBE. Hélène**, tu m'as formé avec patience et une rigueur exemplaire à la réalisation et à l'analyse de qPCR. L'équipe **GEI**, vous m'avez accueilli, fourni les outils nécessaires à la réussite de mon projet et incarné la rigueur inhérente au métier de chercheur. Merci pour le partage de votre savoir et l'organisation des réunions d'équipe. Un merci à **Chloé H.** ma prédécesseuse punaisologue pour m'avoir accueilli et pour avoir passé de super moments ensemble à élever des punaises. Je tiens à adresser un remerciement particulier à **Zainab, Vincent, Sylvain, Benjamin, Alicia, Anaïs, William, Chloé G., Sara, Alejandra, Valentina** et **Dana** pour votre soutien et votre bonne humeur au laboratoire et en dehors. Vous avez rendu ces trois années si spéciales et importantes pour moi.

Une pensée pour la **BB-team. Elodie**, grâce à toi, j'ai pu me libérer de la tâche chronophage de l'élevage des punaises. Sans toi, ma thèse n'aurait pas atteint le stade où elle en est aujourd'hui. Ton aide a été inestimable, et je t'en suis extrêmement reconnaissant. **Raphaël**, je te transmets le flambeau et je te souhaite beaucoup de plaisir dans tes futurs projets. Il reste encore beaucoup de choses à accomplir.

Un grand merci au **Best-office**, composé de **Camille, Daniel, Miriam** et jadis quelques guppys. Qu'aurait été ces années sans vous. Notre équilibre parfait entre bonne humeur, confiance et sérieux a créé un environnement idéal pour réaliser une thèse, garder des souvenirs heureux et surtout se faire des amis. Ce sont des remerciements tout particuliers que je vous fais car ces années n'auraient pas été les mêmes sans votre présence et votre bonne humeur, que ce soit au bureau ou en dehors.

J'ai eu de la chance d'être au 3^{ème} étage du bâtiment Mendel. Peut-être que sans cela je n'aurais jamais rencontré mes amis de couloir du **LEM, Pauline, Adrian, Alix** et **Aline**. Outre le fait que vous m'avez permis de remonter mon taux de glycémie lors des longues périodes de rédaction, j'ai adoré nos escapades lyonnaises entre art et bar. Merci pour m'avoir appris à jouer à Mario Kart.

Merci à mes autres amis de l'université Lyon 1 et de l'INSA pour m'avoir accompagné lors des congrès international **ISS-Holobiont** et du congrès **REID**, où j'ai pu présenter mes travaux. Merci à **Lucas Lalande** de m'avoir accompagné dans l'aventure de « **Ma thèse en 180 secondes** » où à ma grande surprise j'ai touché du doigt le goût de la compétition.

Une pensée pour **mes amis lyonnais. Noémie** quand on se voit c'est toujours pour le mieux, je crois que je n'aurais pas pu avoir meilleure partenaire pour ce voyage à Istanbul. Merci à **mes amis du yoga. Rémi, Alexandre, Pierrick, Sylvain** votre ouverture vers les gens et votre simplicité sont un vrai bonheur. Merci enfin à **mes amis de toujours**. Vous êtes heureusement trop nombreux pour être cités. À vous tous, votre présence est quelque chose de précieux.

Je souhaite finalement remercier **ma famille**, en particulier **mes parents**. Vous m'avez inculqué, entre autres, la curiosité, la persévérance et l'autonomie, qui ont été essentielles tout au long de ma thèse. Vous m'avez offert la chance incroyable de voyager beaucoup et de satisfaire ma curiosité, nourrissant ainsi mon ouverture d'esprit. Votre soutien moral et financier m'a permis d'arriver jusqu'ici sans peur ni jugement. Je remercie également **mon oncle et ma tante** pour leur soutien et pour m'avoir hébergé lors de mon arrivée à Lyon et pendant la période de pandémie de la COVID-19. À **mes grands-parents, Claude et Janou**, je vous suis reconnaissant de m'avoir transmis cette curiosité, cet optimisme et cet amour de l'autre. Sans même l'avoir planifié, ces enseignements m'ont guidé jusqu'ici et qui sait jusqu'où encore à l'avenir.

Je suis pleinement conscient que cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien et la précieuse contribution de chacun d'entre vous, que vous ayez contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Au-delà de votre présence, vos conseils et votre bonne humeur, c'est votre confiance qui a depuis le début été un élément essentiel dans la réussite de ce projet, tant sur le plan professionnel que personnel. Je vous suis extrêmement reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Résumé

La punaise de lit a connu une augmentation de sa population au cours des dernières décennies en raison de la mondialisation et de la sélection de punaises résistantes aux insecticides. Cet insecte hémimétabole se nourrit strictement de sang. Chacun des cinq stades larvaires requiert un repas sanguin pour se développer, tandis que les adultes ont besoin de repas sanguins pour se reproduire. Les piqûres chroniques sont la cause d'insomnies et peuvent entraîner des troubles psychologiques et sociaux. En outre, l'infestation se propage dans divers environnements tels que les foyers et les industries, ce qui pose un défi économique croissant. En raison de la multiplicité des interventions et de la résistance développée par la punaise de lit aux insecticides existants qui sont limités dans leur efficacité sur le terrain et ont un impact environnemental négatif, il est nécessaire de développer de nouveaux outils de lutte.

Comme d'autres insectes hématophages, les punaises de lit hébergent une bactérie symbiotique essentielle pour compléter leur régime sanguin nutritionnellement déséquilibré et dépourvu de vitamines B. Ainsi, on retrouve chez toutes les punaises de lit une souche de *Wolbachia*, une bactérie intracellulaire qui infecte de nombreux arthropodes qui au cours de l'évolution, a acquis un ensemble de gènes impliqués dans la biosynthèse des vitamines B. Symbiote nutritionnel obligatoire, *Wolbachia* est transmis verticalement, en son absence le cycle de vie de la punaise est fortement altéré. Ainsi, une approche prometteuse pour contrôler les populations de punaises de lit consiste à rompre les interactions entre la punaise et son microbiote. Cela permettrait de développer des méthodes alternatives aux pesticides, offrant un contrôle ciblé des insectes ravageurs tout en réduisant les impacts néfastes sur l'environnement. Ainsi, l'étude des mécanismes par lesquels les punaises de lit maintiennent leurs partenaires microbiens tout en contrôlant leur croissance et leur multiplication permettra d'identifier de nouvelles cibles spécifiques de l'interaction hôte-symbiote.

Cette thèse apporte de nouvelles connaissances pour comprendre l'interaction que *Wolbachia* entretient avec son hôte. Parce que *Wolbachia* est un symbiote nutritionnelle important tout au long du cycle de vie de la punaise, nous avons mesuré la dynamique de la densité du symbiote chez son hôte. Nous avons également suivi sa localisation en examinant des effets potentiels de facteurs comme le sexe, l'âge et les prises de repas. De plus, étant donné que *Wolbachia* est un symbiote transmis verticalement et qu'il est essentiel pour la fertilité des œufs pondus, nous avons étudié sa localisation dans les ovaires. Ces résultats contribuent à une compréhension nécessaire à l'étude des caractéristiques de vie et du dialogue moléculaire qui s'exerce entre le symbiote et son hôte.

Mots clefs : Symbiose nutritionnelle, punaise de lit, *Wolbachia*, dynamique, développement

Abstract

The bed bug has witnessed a surge in its population over the past decades due to globalization and the selection of insecticide-resistant bugs. This hemimetabolous insect strictly feeds on blood. Each of its five larval stages requires a blood meal to develop, while adults need blood meals for reproduction. Chronic bites lead to insomnia and can result in psychological and social disorders. Furthermore, infestations spread across various environments such as homes and industries, posing an increasing economic challenge. Given the multiplicity of interventions and the developed resistance of bed bugs to existing insecticides, which are limited in their field effectiveness and carry negative environmental impacts, the need arises to develop new control tools.

Like other blood-feeding insects, bed bugs harbor an essential symbiotic bacterium to supplement their diet. Blood being nutritionally imbalanced and lacking essential components like B vitamins, all bed bugs carry a strain of *Wolbachia*, an intracellular bacterium that infects numerous arthropods. Over evolutionary time, it has acquired a set of genes involved in B vitamin biosynthesis. Being an obligatory nutritional symbiont, *Wolbachia* is vertically transmitted. In its absence, the bed bug's life cycle is significantly altered. Thus, a promising approach for controlling bed bug populations is disrupting the interactions between the bug and its microbiota. This could lead to the development of pesticide alternatives, offering targeted pest control while reducing detrimental impacts on the environment. Therefore, investigating the mechanisms by which bed bugs continuously maintain their microbial partners while controlling their growth and multiplication will help identify new specific targets of the host-symbiont interaction.

This thesis brings new insights into understanding the interaction that *Wolbachia* maintains with its host. Since *Wolbachia* is a significant nutritional symbiont throughout the bed bug's life cycle, we measured the symbiont's density dynamics in its host. We also tracked its localization while examining potential effects of factors such as sex, age, and feeding. Additionally, considering *Wolbachia*'s vertical transmission and its essential role in egg fertility, we studied its localization in the ovaries. These findings contribute to a necessary understanding of studying life traits and the molecular dialogue between the symbiont and its host.

Keywords: Nutritional symbiosis, bed bug, *Wolbachia*, dynamics, development