

Université Libre de Bruxelles

Faculté des Sciences
Département de Biologie des Organismes
Service d'Evolution Biologique et Ecologie

Protection et survie du sperme chez les fourmis

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences
par

Francisco Dávila

Août 2018

Université Libre de Bruxelles

Faculté des Sciences
Département de Biologie des Organismes
Service d'Evolution Biologique et Ecologie

Protection et survie du sperme chez les fourmis

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de
Docteur en Sciences
par

Francisco Dávila

Directeur de thèse
Serge Aron

Université Libre de Bruxelles

Membres du jury
Jean-Christophe de Biseau
Pascale Lybaert
Sophie Armitage
Thibaud Monnin

Université Libre de Bruxelles (*président du jury*)
Université Libre de Bruxelles (*secrétaire du jury*)
Freie Universität in Berlin
Sorbonne Université

Abstract

Social Hymenoptera (wasps, ants, bees) possess a unique mode of reproduction. Typically, males produce the total amount of their spermatozoa during the nymphal phase solely from the energy reserves acquired during the larval phase. When the adult male hatches, the testes regress and the spermatozoa are then stored in their seminal vesicles. Mating takes place during a mating flight in which hundreds of males and females from surrounding colonies participate only once in their life. Sperm cells are transmitted during mating and are stored in the queen's spermatheca for the rest of its life (which can last several decades depending on the species). After mating, the male dies and the queen founds a new colony from the sperm received during the nuptial flight. She will never re-mate again and will use parsimoniously the spermatozoa to fertilize her eggs. Several factors are likely to damage sperm cells, among them nutritional deficiencies during development, pathogens transmitted during mating or the immune defenses of the female that hosts sperm. Yet these sperm cells are extremely valuable because they are not renewable, and the queen will use them throughout her whole life to maintain a sufficient working force ensuring all the functions of the colony. The reproductive success of both males and females is highly dependent on the protection and maintain of spermatozoa.

In this work we studied different factors that can affect the quantity, quality and protection of sperm in ants. The focus was made at three different stages: during the production of sperm cells, during their transmission at the time of mating and during their storage in the queen's spermatheca. First, we showed that the investment in somatic development and in sperm quality take precedence over the production of large quantities of sperm cells. Second, we tested the presence and activity of two major components of the immune system (phenoloxidase system and antibacterial substances) in the sexual organs of virgin and mated ants, and we show that sperm protection uses specific systems which response is variable over time. In addition, we studied the temporal variations of these immune responses in the general insect system before and after mating. Finally, we examine the bacterial abundances and communities present in the reproductive organs at these same periods. We show the presence of some bacterial groups from the sperm storage organs that could play a role in the maintenance of spermatozoa.

Résumé

Les hyménoptères sociaux (guêpes, abeilles fourmis) possèdent un mode de reproduction particulier. Typiquement, les mâles produisent la totalité de leurs spermatozoïdes pendant la phase nymphale avec les seules réserves énergétique acquises lors de la phase larvaire. Lorsque l'adulte éclot, les testicules régressent et les spermatozoïdes sont alors stockés dans leurs vésicules séminales. L'accouplement a lieu lors d'un vol nuptial auquel, des centaines de mâles et de femelles des colonies environnantes, participent une seule fois dans leur vie. Les spermatozoïdes sont transmis pendant l'accouplement et sont stockés dans la spermathèque de la reine pour le reste de sa vie (qui peut atteindre plusieurs décennies selon les espèces). Suite à l'accouplement, le mâle meurt et la reine fonde une nouvelle colonie sur seule base du sperme reçu. Elle ne se ré-accouplera plus jamais et utilisera parcimonieusement les spermatozoïdes pour féconder ses œufs. Plusieurs facteurs sont susceptibles de porter préjudice aux cellules spermatiques, parmi eux les carences alimentaires lors du développement, les pathogènes transmis lors de l'accouplement ou les défenses immunitaires de la femelle qui accueille le sperme. Or ces spermatozoïdes sont précieux car non renouvelables, et que la reine les utilisera tout au long de sa vie pour maintenir une force ouvrière suffisante qui assurera toutes les fonctions de la colonie. Le succès reproducteur du mâle et de la femelle dépend étroitement de la protection et le maintien des spermatozoïdes.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à différents facteurs pouvant affecter la quantité, la qualité et la protection des spermatozoïdes chez les fourmis. Le focus a été réalisé à trois stades différents : lors de la production des cellules spermatiques, lors de leur transmission au moment de l'accouplement et lors de leur stockage chez la reine. Premièrement, nous avons montré la priorité donnée par les fourmis au développement somatique et à la qualité du sperme, mais au détriment de la quantité de spermatozoïdes transmis. Deuxièmement, nous avons testé la présence et l'activité de deux composantes principales du système immunitaire (système de la phénoloxydase et substances antibactériennes) dans les organes sexuels de fourmis vierges et accouplés, et nous montrons que la protection des spermatozoïdes fait appel à des systèmes spécifiques et variables dans le temps. De plus nous amenons une étude plus approfondie sur les variations temporelles de ces réponses immunitaires dans le système général de l'insecte avant et après l'accouplement. Finalement, nous étudions les abondances et communautés bactériennes présentes dans les organes reproducteurs à ces mêmes périodes et montrons la présence de certains groupes bactériens dans les organes de stockage du sperme qui pourraient jouer un rôle dans le maintien des spermatozoïdes.

Remerciements

Avant tout je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude et respect pour mon promoteur de thèse Serge Aron. Merci Serge pour ton investissement dans ce travail, ta disponibilité, ta franchise, tes conseils plus qu'avisés et surtout pour ta patience, que j'ai mis à rude épreuve. Tu as été plus qu'un promoteur de thèse, j'ai trouvé en toi un maître dans cette belle discipline qu'est la recherche en biologie, et j'ai appris autant professionnellement qu'humainement.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, Jean-Christophe de Biseau, Pascale Lybaert, Sophie Armitage et Thibaud Monnin, pour avoir accepté de réviser ce travail.

Merci également Philippe Van Der Linden pour avoir lu ce travail et apporté des commentaires et remarques pertinents.

Merci Anne Botteaux pour toute l'aide et l'encadrement et la bonne humeur du début de ma thèse au Laboratoire de Bactériologie Moléculaire. Merci également à Youness, Lionel, Alaedine, Nargisse, Simon, Ahmed, Dalila, Valérie, Mahender, je suis heureux de me dire que même si maintenant nous ne sommes plus des collègues, nous restons toujours amis.

Merci Sarah Chérasse pour ton implication dans ce travail, il n'aurait jamais eu une aussi bonne qualité sans ton aide. Ça a été un plaisir de travailler avec toi.

Merci Véronique Fontaine pour les conseils et l'aide précieuse pour les longues dissections des fourmis en milieu stérile, et merci à l'équipe de l'Unité de Microbiologie Pharmaceutique et Hygiène : Céline R. Céline S. Sara, Katia, Dong et Sheng.

Merci Joël White pour ton accueil à l'UMR Evolution et Diversité Biologique à Toulouse, et pour ton encadrement dans la recherche de bactéries chez les fourmis. Merci Aimeric pour ton assistance au labo.

Merci David Bauman pour ton aide précieuse dans l'analyse statistique des deux derniers chapitres de cette thèse. Tu as apporté une rare expertise et tu as augmenté considérablement la valeur de ce travail. Ami de longue date, ça a été un plaisir de t'avoir comme collègue.

Merci Pascale Lybaert pour ton accueil au laboratoire d'Hormonologie Expérimentale et pour ton aide sur les premières mises au point de la méthode de viabilité des spermatozoïdes.

Merci Koos Boomsma pour ton accueil chaleureux à Copenhague et tes corrections sur le premier chapitre de ce travail.

Merci Isabelle George pour ses conseils méthodologiques en bactériologie et son accueil au laboratoire d'Ecologie des systèmes aquatiques. Merci Adriana pour l'accueil dans ce labo.

Merci Joëlle Nortier de m'avoir accueilli au Département de Néphrologie et à Valérian Bunel pour ton implication dans la mise au point de la cytométrie en flux appliquée au sperme de fourmis.

Merci Jean-Marie Vanderwinden pour les magnifiques images des bactéries trouvées dans les spermathèques des reines.

Merci aux étudiants avec qui j'ai pu mener à bien nombre de ces expériences et qui ont rendu ces moments agréables et enrichissants : Noémie Delescaille, Noémie Bleser, Flora Farruggia, Albert Lechêne, Maïssam Ben Ayed.

Merci aux membres du service Evolution Biologique et Ecologie pour toutes ces conversations, conseils, coups de main, moments de détente et de rigolade, échange de bons plans et verres partagés. Merci Sarah, Hugo, Alex, Laurane, Simon, Nico P., Franck, Jérémy, Dario, Sandra, Armel, Esra, Arthure, Boris, Claire, Quentin, Johana, Eulalia, Benoît, Rémy, Romain, JF, Nicolas S., Jean-Marc, Laurent, Laetitia M. Christopher, Angela et Laetitia

Merci au Laboratoire de Biologie Marine de m'avoir accueilli avec bienveillance quand je venais manger avec ma chérie, et pour ces chouettes discussions. Merci Philippe Dubois, Chantal De Ridder, Bruno Danis, Mathieu, Thierry, Saloua, Sarah, Camille, Mishal, Marie, Quentin.

Merci autres amis qui m'avez soutenu pendant ces années de travail et qui avez rigolé avec/de moi à propos de mes aventures dans le monde du sperme des fourmis. Particulièrement, merci aux gouches Julie, Marie et Claire pour les moments de détente mérités en famille. Merci aussi Fred et Marie C., Thomas, Seb, Etienne...

Merci Aurélie, je n'ai pas de mots pour décrire ton aide, soutien et compréhension pendant ce travail. Merci d'avoir traversé toute cette épreuve avec moi et d'avoir été si présente tant dans les aspects personnels que dans la réflexion du contenu de ce travail. Merci de m'avoir offert le plus beau des cadeaux, Léo et bientôt Lucie. Sans vous je n'aurais pas pu aller aussi loin, je vous aime.

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. LA SEXUALITE : BENEFICES ET COUTS	3
2. COMPROMIS LIES A LA REPRODUCTION	5
2.1. COMPROMIS AU SEIN DE LA FONCTION REPRODUCTRICE	5
2.2 COMPROMIS ENTRE LA REPRODUCTION ET D'AUTRES FONCTIONS	6
3. IMMUNITE CHEZ LES INSECTES	8
3.1 LES SYSTEME IMMUNITAIRE DES INSECTES	8
3.2 IMMUNITE ET SYSTEME REPRODUCTEUR	15
3.3 BACTERIES ASSOCIEES AUX ORGANES REPRODUCTEURS	16
4. HYMENOPTERES SOCIAUX : IMMUNITE ET REPRODUCTION	17
4.1 IMMUNITE	18
4.2 MODE DE REPRODUCTION	21
OBJECTIFS ET SYNTHÈSE DES RESULTATS	25
CHAPITRE 1.	41
<i>PROTEIN RESTRICTION AFFECTS SPERM NUMBER BUT NOT SPERM VIABILITY IN MALE ANTS</i>	43
CHAPITRE 2.	49
<i>ANT SPERM STORAGE ORGANS DO NOT HAVE PHENOLOXIDASE CONSTITUTIVE IMMUNE ACTIVITY</i>	51
CHAPITRE 3.	57
<i>ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MALE AND FEMALE SPERM-STORAGE ORGANS IN ANTS</i>	59
CHAPITRE 4.	65
<i>IMMUNE ACTIVATION AT THE TIME OF MATING AFFECTS BACTERIAL ABUNDANCE AND COMMUNITIES IN A SOCIAL HYMENOPTERA</i>	67
DISCUSSION	81
1. TRAJET DU SPERME ET REACTIONS IMMUNITAIRES LIEES A L'ACCOUPEMENT	83
2. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES	85
3. PERSPECTIVES	89
CONCLUSION	91

Introduction

Introduction

1. La sexualité : bénéfices et coûts

La reproduction sexuée est un des principaux moteurs de l'évolution (Maynard Smith 1978 ; Bell 1982). Elle repose sur la combinaison des génomes de deux individus suite à la fusion de leurs gamètes. La sexualité engendre une variabilité génétique dans la descendance due au mélange unique du génome des deux parents. Trois types de mécanismes amènent une telle diversité génétique: i) le mélange aléatoire des chromosomes parentaux lors de la méiose associée à la formation des gamètes (la proportion des chromosomes paternels ou maternels est variable selon les gamètes); ii) les recombinaisons génétiques lors de la méiose (crossing-over), qui entraînent l'assemblage de chromosomes inédits portant l'ADN des deux parents (un même chromosome porte des allèles paternels et maternels); iii) la combinaison de deux gamètes dans un zygote uniques rend impossible la production de deux descendants portant exactement le même génotype pour tous les allèles (tous les descendants d'un couple seront différents. Les vrais jumeaux résultent d'une division complète des premières cellules du zygote). Dans des environnements changeants, ou lorsqu'une population s'établit dans une nouvelle niche écologique, le fait que chacun des descendants d'un couple soit unique augmente leur chance respective de porter des combinaisons alléliques favorables dans ce nouveau milieu. Contrairement à la reproduction sexuée, la reproduction asexuée donne lieu à une descendance ayant une variabilité génétique réduite. Cette variabilité est due aux mutations ou, chez les eukaryotes pluricellulaires parthénogénétiques, est issue de la méiose : les réarrangements induits par les crossing-over peuvent conduire à des combinaisons génétiques différentes de celles portées par la mère.

L'adaptabilité accrue dans des environnements instables n'est pas le seul avantage majeur de la sexualité. La reproduction sexuée permet aussi la réparation d'un chromosome endommagé sur base de son homologue, l'augmentation du nombre d'individus d'une population portant des allèles favorables, ou la diminution du nombre d'individus portant des allèles défavorables (Encadré 1). Malgré ces avantages, la reproduction sexuée comporte aussi des coûts non négligeables dont la dilution de 50% de la contribution génétique individuelle à la descendance, les coûts énergétiques dans la production de gamètes et la recherche d'un partenaire, ou encore la transmission de pathogènes lors de l'accouplement (Encadré 1). Ces coûts peuvent avoir un effet direct sur le succès reproducteur – voire sur les chances de survie des individus. Par exemple, les maladies sexuellement transmissibles peuvent affecter la survie des partenaires, la viabilité des gamètes, ou les chances de survie des descendants (Knell et Webberley 2004). De manière indirecte, ces coûts peuvent aussi réduire le succès reproducteur des individus en induisant des compromis entre différentes fonctions vitales et/ou métaboliques. Ainsi, l'investissement énergétique dans le développement des organes sexuels et/ou des gamètes peut s'effectuer au détriment d'autres systèmes (Stearns 1989). Si la sélection a retenu la reproduction sexuée malgré ces désavantages, c'est probablement parce que les avantages qu'elle procure sont conséquents et que les désavantages qu'elle génère engagent des compromis entre les différentes fonctions biologiques qui pondèrent leur action.

Bénéfices de la reproduction sexuée	Coûts de la reproduction sexuée
<p><i>Adaptation à l'environnement.</i> En combinant deux génomes, des mutations bénéfiques situées sur des gènes différents portés par les parents peuvent se trouver rassemblées dans un même descendant. Ceci peut augmenter ses chances de survie et de reproduction et, à terme, accroître le nombre d'individus portant ces mutations bénéfiques dans la population. Ces individus jouissent, par exemple, d'une meilleure résistance aux pathogènes (<i>Red Queen theory</i> - Cockburn 1991 ; Futuyma 2005 ; Fournier et Aron 2007), d'une adaptation accrue aux microenvironnements voisins à celui des parents (<i>Tangled Bank theory</i> - Ghiselin 1974), ou avoir des besoins différents quant aux ressources, ce qui réduit potentiellement la compétition au sein des fratries (Avisé 2008 ; Cockburn 1991 ; Futuyma 2005 ; Maynard-Smith 1978). En outre, la recombinaison permet aux populations sexuées (si elles sont suffisamment grandes) d'évoluer plus rapidement que ne le feraient des populations asexuées.</p> <p><i>Purge des allèles délétères</i> De même, si des mutations défavorables se trouvent réunies dans un même individu, celui-ci aura moins de chances de survivre ou de se reproduire. Les mutations défavorables qu'il porte s'éteignant avec lui, ceci amène à une purge des allèles délétères au sein de la population (Kondrashov 1998 ; Avisé 2008 ; Cockburn 1991 ; Futuyma 2005).</p> <p><i>Cliquet de Muller</i> Dans les populations asexuées, les mutations délétères s'accumulent (les individus peuvent porter plus de mutations défavorables que leurs ancêtres mais pas moins). Cette accumulation est irréversible (d'où l'analogie avec un cliquet), et induit à terme une diminution de la fitness globale du groupe, voir son extinction (Lynch <i>et al.</i> 1993). Dans les populations sexuées, la recombinaison peut reconstituer une classe d'individus moins chargés en mutations délétères, et un retour vers une population portant des allèles sains est possible.</p> <p><i>Réparation de l'ADN</i> Lors de la méiose, les chromosomes homologues issus des parents s'apparient et donnent lieu à la recombinaison génétique. Lors de ce processus, il se produit des échanges de segments entre les chromosomes (crossing-over). Si l'un des brins d'ADN a été lésé ou sectionné, le chromosome homologue peut servir de matrice saine : il est utilisé comme modèle pour réparer l'ADN endommagé (Bernstein et Bernstein 1991).</p>	<p><i>Dilution de la contribution génétique à la descendance</i> Chaque parent ne peut transmettre que 50% de son génome à chaque descendant (contrairement à la reproduction asexuée où 100% du patrimoine génétique est généralement transmis). De plus, la sexualité implique la production de deux sexes, mais seules les femelles peuvent donner une descendance. Ce double coût de la sexualité (<i>two-fold cost of sex</i>; Maynard-Smith, 1978) implique que la croissance des populations est 2 fois plus lente chez les espèces à reproduction sexuée.</p> <p><i>Réarrangement des combinaisons favorables sélectionnées</i> La méiose peut conduire à la destruction de combinaisons génétiques adaptatives en séparant les chromosomes portant des allèles favorables. Ceci peut réduire l'adaptabilité et, partant, réduire le succès reproductif ou la survie de la descendance (Avisé 2008 ; Cockburn 1991 ; Futuyma 2005).</p> <p><i>Investissement énergétique</i> La reproduction sexuée requiert un investissement dans la fabrication d'organes sexuels ainsi que dans la production de gamètes dont la production est onéreuse (Dewsbury 1982 ; Reznick 1985 ; Simmons 2001 ; Parker et Pizzarri 2010). En outre, elle demande d'investir du temps et de l'énergie dans la recherche d'un partenaire sexuel, les parades nuptiales, l'accouplement, la ponte et éventuellement le soin aux jeunes.</p> <p><i>Risques associés à la compétition pré- et post-copulatoire</i> La compétition pré-copulatoire peut accroître les risques de prédation lors des parades nuptiales, ou des blessures éventuellement létales suite aux combats opposant les prétendants. La compétition post-copulatoire oppose les spermatozoïdes de plusieurs mâles en compétition pour féconder les œufs d'une même femelle, ce qui diminue les chances de chaque mâle de transmettre ses gènes à la génération suivante.</p> <p><i>Transmission de maladies sexuelles</i> Un des coûts majeurs associé à la reproduction sexuée concerne la transmission de pathogènes et de parasites entre les partenaires. Les maladies sexuellement transmissibles sont susceptibles de mettre en danger la santé - voire la survie - des partenaires et de leur descendance, mais également la viabilité des gamètes (Knell et Webberley 2004 ; Avisé 2008 ; Cockburn 1991).</p>

Encadré 1. Avantages et coûts de la reproduction sexuée

2. Compromis liés à la reproduction

Les ressources énergétiques dont dispose un individu à un moment donné sont quantitativement limitées (Stearns 2000 ; Reznick et Ruse 2011). L'organisme doit alors répartir l'énergie acquise entre différentes fonctions biologiques, telles que la croissance, l'immunité, la reproduction ou la survie (Edward et Chapman 2011). Des compromis peuvent apparaître lorsqu'un individu ne dispose pas d'énergie en suffisance pour répondre pleinement à ses fonctions, ou lorsqu'il doit faire face à un événement qui engendre un coût. Ces compromis s'installent entre les fonctions biologiques de l'organisme, mais également entre les différents traits d'une même fonction; par exemple, pour la fonction reproductrice, l'investissement dans la production d'un grand nombre de spermatozoïdes peut s'effectuer aux dépens de leur qualité (Gómez Montoto *et al.* 2011). De tels compromis se traduisent souvent par l'augmentation de l'allocation d'énergie dans une fonction ou un de ses facteurs au détriment de l'énergie investie dans d'autres (Reznick 1985 ; Stearns 1989 ; Roff et Fairbairn 2007 ; Garland 2014). Dans ce contexte, les compromis impliquant la fonction reproductrice sont fondamentaux, dès lors qu'ils affectent directement la fitness des individus (Stearns 1989 ; Reznick 1985).

2.1 Compromis au sein de la fonction reproductrice

La fonction reproductrice comprend différents traits qui peuvent entrer en compétition suite à une contrainte externe, comme les carences alimentaires, la compétition pour un partenaire, ou la compétition post-copulatoire. Cela conduit à des compromis entre les différents traits associés à la reproduction. En ce qui concerne les gamètes, par exemple, de tels compromis peuvent affecter leur taille, le nombre produit, leur motilité, ou leur viabilité (Snook 2005). Ainsi, la taille et le nombre de spermatozoïdes ne peuvent pas être maximisés simultanément (Parker et Pizzari 2010). Chez les poissons, plus la compétition spermatique est intense, plus le nombre des spermatozoïdes produits est important (Stockley *et al.* 1997). Cet accroissement de la productivité en gamètes s'accompagne d'une réduction significative de leur taille. Une étude comparative portant sur 196 espèces de passereaux montre que chez les espèces qui subissent un risque plus important de compétition sexuelle, les mâles investissent plus dans le nombre de spermatozoïdes, et ce au détriment de leur taille (Immler *et al.* 2011). Des résultats similaires ont été observés chez les insectes. Une étude portant sur 15 espèces de fourmis du genre *Cataglyphis* montre que le nombre de spermatozoïdes produits augmente avec le risque de compétition spermatique, alors que la longueur des spermatozoïdes n'est pas affectée par ce paramètre (Aron *et al.* 2015). Au contraire, les espèces du genre *Drosophila* exposées à un plus grand risque de compétition spermatique investissent dans la taille des cellules spermatiques plutôt que dans leur nombre (Immler *et al.* 2011). Un compromis existe donc entre la taille et la productivité en spermatozoïdes lorsque les mâles sont soumis à la compétition spermatique, mais aucune tendance claire ne semble se détacher quant à l'orientation de ce compromis.

En dehors de la compétition spermatique, Parker (1993) prédit qu'un mâle soumis à des restrictions de ressources devrait montrer une variabilité dans le nombre de spermatozoïdes, mais pas dans leur taille. La taille des cellules spermatiques serait optimisée indépendamment de leur nombre. Cette théorie semble confirmée par les travaux de Gage et Cook (1994) chez la Pyrale indienne des fruits secs *Plodia interpunctella* où, sous des

contraintes alimentaires, la taille des spermatozoïdes est maintenue au détriment de leur nombre.

Par ailleurs, un compromis s'installe entre la taille des cellules spermatiques et leur durée de vie chez les épinoches, *Gasterosteus aculeatus* : les spermatozoïdes plus longs sont plus rapides et ont une plus grande probabilité de fertiliser les œufs, mais ils ont une durée de vie plus courte (Bakker *et al.* 2014). Un résultat similaire a été observé chez le saumon atlantique *Salmo salar* (Gage *et al.* 2004).

Un compromis entre la motilité des spermatozoïdes et leur longévité a, lui, été mis en évidence chez les oursins du genre *Strongylocentrotus*. Les populations de *S. purpuratus* sont souvent caractérisées par une haute densité de population et, partant, une forte compétition spermatique. Les spermatozoïdes rapides mais moins durables sont sélectionnés. A l'inverse, chez *S. droebachiensis* dont la densité de population est faible, les spermatozoïdes ayant une plus longue durée de vie sont favorisés bien qu'ils soient plus lents. Chez *S. franciscanus*, la densité de population et les traits des spermatozoïdes sont intermédiaires aux deux espèces précédentes (Levitan 2000).

Le compromis entre le nombre de spermatozoïdes produits et leur viabilité (proportion de spermatozoïdes vivant sur le nombre total produit ou éjaculé) reste controversé. Certaines études suggèrent l'absence d'un tel compromis, ce qui permet de maximiser ces deux traits simultanément. C'est le cas chez des rongeurs de la famille des muroidea (Gómez Montoto *et al.* 2011), et des mouches du genre *Drosophila* (Holman et Snook 2008 ; Decanini *et al.* 2013), chez lesquels une corrélation positive a été montrée entre le nombre et la viabilité des spermatozoïdes lorsque les conditions environnementales (nourriture) sont maximales. Plus récemment, des travaux réalisés sur la blatte cendrée *Nauphoeta cinerea* ont révélé que, sous certaines contraintes alimentaires, un compromis s'installe entre le nombre et la viabilité des spermatozoïdes (Bunning *et al.* 2015): la viabilité des cellules spermatique est favorisée au détriment de leur nombre. Ces résultats suggèrent que le compromis entre la production et la viabilité des spermatozoïdes s'exprime particulièrement lorsque les ressources sont limitées.

2.2 Compromis entre la reproduction et d'autres fonctions

La fonction reproductrice demande de grandes quantités d'énergie. Pour y répondre, l'organisme met en place des compromis avec d'autres fonctions telles que la croissance (Lewis *et al.* 2010), l'immunité (Schwenke *et al.* 2016), le maintien, et l'espérance de vie (Partridge *et al.* 2005). Lors de son développement, un individu investit dans la production d'organes somatiques qui assurent sa survie, et dans la production d'organes sexuels et de gamètes qui assureront sa descendance. L'alimentation est un facteur clé de l'induction de compromis entre le développement et la reproduction, favorisant généralement le développement des organes somatiques au détriment des organes sexuels. Ainsi, les mâles élevés dans un milieu carencé en protéines produisent moins de spermatozoïdes que les mâles élevés dans un milieu riche, tant chez les vertébrés (Louis *et al.* 1994 ; Coulter *et al.* 1997 ; O'Dea *et al.* 2014 ; Kahrl et Cox 2015) y compris l'humain (Olsen *et al.* 2012), que chez les invertébrés (Gage et Cook 1994 ; Fedina et Lewis 2006 ; McGraw *et al.* 2007 ; Lewis *et al.* 2010 ; Pech-May *et al.* 2012 ; Bunning *et al.* 2015).

Des compromis s'installent également entre la reproduction, d'une part, et le maintien des fonctions vitales, la survie et l'espérance de vie, d'autre part. L'activation de certaines fonctions physiologiques en réponse au stress de prédation (Moore et Jessop 2003) ou à un stress thermique (Silbermann et Tatar 2000) mobilise des grandes quantités d'énergie, ce

qui diminue celle disponible pour les processus qui ne sont pas nécessaires à la survie immédiate, comme la reproduction, jusqu'à ce que les conditions s'améliorent (Moore et Hopkins 2009). De la même manière, en l'absence de stress extérieur, les coûts énergétiques liés à l'effort de reproduction sont tels qu'ils induisent une diminution du pouvoir reproductif futur des individus (Gustafsson et Pärt 1990 ; Stürup *et al.* 2014 ; Adler *et al.* 2013) – voire leur espérance de vie (Partridge *et al.* 2005)

Les fonctions reproductrices et immunitaires consomment énormément de ressources lors de leur activation, et pour leur maintien constitutif (Rolff et Siva-Jothy 2003; Schmid-Hempel 2003; Schmid-Hempel 2005). Le compromis entre ces deux fonctions peut pencher en défaveur de la reproduction ou en défaveur de l'immunité, selon les conditions du milieu et l'état de l'individu (Schwenke *et al.* 2016). Chez plusieurs espèces, on observe que l'investissement dans l'immunité induit une réduction de la fonction reproductrice. Chez les diptères, l'activation du système immunitaire suite à une infection bactérienne, fongique ou parasitoïde entraîne une diminution de la fécondité (par apoptose des cellules folliculaires), réduit la quantité de protéines présentes dans les ovaires et augmente le temps d'oviposition (*Drosophila melanogaster* – Fellowes *et al.* 1999 ; Lazzaro *et al.* 2008 ; McKean *et al.* 2008 ; Bashir-Tanoli et Tinsley 2014 ; Howick et Lazzaro 2014; *D. nigrospiracula* – Polak 1996; *Anopheles gambiae* - Ahmed et Hurd 2006; *A. stephensi* - Hogg et Hurd 1995; *Armigeres subalbatus* - Ferdig *et al.* 1993). De même, elle réduit la viabilité des spermatozoïdes produits, ainsi que ceux stockés par la femelle chez les orthoptères (*Teleogryllus oceanicus* – Simmons and Roberts 2005 ; McNamara *et al.* 2013 ; respectivement). Chez l'abeille domestique *Apis mellifera*, l'activation du système immunitaire se traduit par une chute de la viabilité des spermatozoïdes dans les vésicules séminales des mâles (Stürup *et al.* 2013). En outre, une infection par un pathogène au stade nymphal induit chez les mâles une réduction du nombre de spermatozoïdes produits (Duay *et al.* 2002 ; Stürup *et al.* 2013). Des répercussions sur la reproduction ont également été montrées suite à l'activation du système immunitaire par des agents non pathogènes - comme des bactéries tuées par la chaleur ou des lipopolysaccharides extraits des parois bactériennes. C'est le cas chez les diptères où l'exposition à ces composés réduit la fécondité (*D. melanogaster* - Zerofsky *et al.* 2005 ; McKean *et al.* 2008 ; Nystrand et Dowling 2014 ; Bashir-Tanoli et Tinsley 2014) et augmente le temps d'oviposition (*A. gambiae* – Ahmed *et al.* 2002). Chez les orthoptères une diminution du nombre d'œufs pondus et des protéines présentes dans l'œuf ont été rapportées suite à l'activation du système immunitaire par ces composés (*Acheta domesticus* - Bascuñán-García *et al.* 2010; *Gryllus texensis* - Stahlschmidt *et al.* 2013; *Hemideina crassidens* - Kelly 2011).

Plusieurs travaux ont également mis en évidence que l'investissement dans la reproduction réduit les réponses immunes (Sheldon et Verhulst 1996 ; Zuk et Stoehr 2002). La capacité à résister aux attaques de parasitoïdes diminue en fonction de la fécondité chez l'hémiptère *Acyrtosiphon pisum* (Gwynn *et al.* 2005). Chez *D. melanogaster*, l'accouplement réduit la résistance aux infections (Fedorka *et al.* 2007 ; Short et Lazzaro 2010) ainsi que la survie des femelles après une infection (Short *et al.* 2012). Une diminution du nombre d'hémocytes en fonction du nombre d'accouplements a été montrée chez le grillon *A. socius* (Fedorka *et al.* 2004). L'accouplement réduit également l'encapsulation et la mélanisation, deux processus clés de l'immunité des insectes, chez les grillons *A. socius* et *A. domesticus*, la libellule *Matrona basilaris japonica*, et la fourmi *Atta colombica* (Fedorka *et al.* 2004; Bascuñán-García *et al.* 2010; Siva-Jothy *et al.* 1998; Baer *et al.* 2006 ; respectivement). Il diminue l'activité de la phénoloxydase (enzyme impliquée dans la chaîne de la mélanisation - voir segment Immunité chez les insectes) chez le ténébrion meunier (*Tenebrio molitor* - Rolff

et Siva-Jothy 2002) et une fourmi (*Formica paralugubris* – Castella *et al.* 2009). Cependant l'action négative de la reproduction sur l'immunité ne semble pas être généralisée. Ainsi, suite à l'accouplement, les quantités de phénoloxydase présentes dans l'hémolymphe des femelles augmentent chez *A. socius* (Fedroka *et al.* 2004); la résistance aux pathogènes chez *T. molitor* (Valtonen *et al.* 2010) ainsi que chez *G. texensis* (Shoemaker *et al.* 2006) est accrue, la production de peptides anti-microbiens dans les tissus sexuels est induite chez *D. melanogaster* (Lawniczak *et al.* 2004 ; McGraw *et al.* 2004 ; Peng *et al.* 2005 ; Domanitskaya *et al.* 2007). Castella *et al.* (2009) montrent que l'activité de la phénoloxydase diminue juste après l'accouplement et augmente 7 jours après chez *F. paralugubris*.

3. Immunité chez les insectes

3.1 Le système immunitaire des insectes

Tous les animaux sont sujets aux infections pathogènes ou parasites. Très tôt dans l'évolution des mécanismes d'évitement et de défense qui réduisent l'exposition et les risques de transmission des microbes se sont mis en place (Flajnik et Du Pasquier 2004). Le système immunitaire joue plusieurs rôles à cet égard: la protection contre les infections virales, bactériennes ou de cellules étrangères ou aberrantes; la réparation des blessures de tissus ou organes; la maintenance de l'intégrité et la régénération (Cohen 2000). Avant d'avoir recours au système immunitaire, les individus évitent les agents pathogènes par des comportements adaptés (évitement des risques) qui concernent leur alimentation, leur relation avec des congénères ou l'habitat (Schmid-Hempel 2005). Les barrières physiques, telles que la paroi extérieure du corps, la cuticule, et les épithéliums de l'intestin, de la trachée ou du tractus génital, constituent ensuite une défense physique (Anselme *et al.* 2006 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Lorsque les pathogènes passent ces barrières et entrent dans l'organisme, ils sont alors confrontés aux défenses immunitaires de l'hôte. Le système immunitaire des insectes est divisé en deux ensembles majeurs : l'immunité innée et l'immunité acquise.

L'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense après l'entrée du pathogène dans l'organisme. Elle fait d'abord intervenir des facteurs de reconnaissance et d'élimination des microorganismes invasifs. Ces facteurs sont codés dans la lignée germinale, et sont transmis à la descendance (Hoffmann et Reichhart 2002 ; Anselme *et al.* 2006 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Dans l'immunité innée, deux voies sont mises en place pour combattre l'infection : la réponse humorale (voir Dunn 1990) et la réponse cellulaire (Ratcliffe et Rowley 1979). Ces deux voies sont à l'origine d'un troisième système : la réaction de mélanisation.

Réponse humorale et synthèse de peptides antimicrobiens

La voie systémique humorale comprend la synthèse et la sécrétion dans l'hémolymphe de peptides antimicrobiens, d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) par le corps gras et de cascades protéolytiques non spécifiques qui régulent les processus de coagulation et de mélanisation (Anselme *et al.* 2006 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

L'immunité innée montre une spécificité considérable. Elle ne distingue pas seulement le

« soi » du « non soi », mais elle différencie et adapte également sa réponse en fonction du type de pathogène rencontré. La reconnaissance des pathogènes se fait par des récepteurs spécifiques circulant dans l'hémolymphe de l'insecte et aptes à détecter les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), composants essentiels et propres à tous les microorganismes (Anselme *et al.* 2006 ; Schmid-Hempel 2005). Les PAMPs comprennent des lipopolysaccharides (LPS; présents notamment chez les bactéries Gram positif), des manannes (caractéristiques des levures) et des peptidoglycanes (présentes chez les bactéries Gram positif et Gram négatif) (Schmid-Hempel 2005). Parmi les récepteurs impliqués dans l'identification des PAMPs, on trouve divers types de protéines de reconnaissance, telles que les PRRs (Pattern-Recognition Receptor), la β -1,3 *glucan binding protein* (bGBP et LGBP) et des *peptidoglycan binding protein* (PGBP) (Cerenius *et al.* 2008 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

Une caractéristique de la défense immunitaire innée des insectes est la synthèse inductible de peptides antimicrobiens, de lysozymes, et d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS). Ces substances sont produites essentiellement par les cellules du corps gras des épithéliums et secrétées dans l'hémolymphe (Gillespie *et al.* 1997 ; Schmid-Hempel 2005). Plusieurs voies régulent la production de ces substances et leur activation dépend de la nature du microorganisme invasif. Les gènes qui régulent ces réactions sont présents également chez les vertébrés, ce qui suggère une homologie ancienne. La voie de « Spätzle-Toll » est induite par des infections de bactéries Gram (+) et de champignons, alors que la voie de « Imd » est induite par des bactéries Gram (-); finalement la voie « JAK/STAT » contrôle les réactions cellulaires (Schmid-Hempel 2005) (Figure 1).

Du point de vue structurel, les peptides antimicrobiens sont regroupés en 3 familles :

- les peptides d'hélice α , comme la cécropine (anti Gram (-), présentes dans le calyx, l'oviducte, la spermathèque et le réceptacle séminal);
- les peptides de la famille des défensines, stabilisées par des ponts disulfures (anti Gram (+), présentes dans la spermathèque, le réceptacle séminal et les glandes labiales);
- des peptides linéaires, sans structure secondaire caractéristique et riches en résidus proline et/ou glycine, comme la drosocine (antifongiques présentes dans la spermathèque, le réceptacle séminal, la trachée, les glandes salivaires et labiales) ou les coléoptéricines.

D'autres classifications identifient plutôt quatre familles de peptides antimicrobiens qui se différencient selon leur composition chimique (Meister *et al.* 1997):

- les cécropines sont des peptides cationiques dépourvus de résidus de cystéine et actifs principalement contre des bactéries Gram (-);
- les peptides antimicrobiens contenant de la cystéine qui forment des ponts disulfures intramoléculaires, notamment les défensines, qui sont principalement actives contre des bactéries Gram (+); la drosomycine, qui est principalement active contre des champignons filamenteux; et la thanatine, qui est largement active contre des bactéries Gram (+), Gram (-) et des champignons filamenteux;
- les peptides antibactériens riches en proline sont normalement de 2 à 3 kDa et sont principalement actifs contre des bactéries Gram (-);
- les protéines antibactériennes riches en glycine vont normalement de 8 à 30 kDa, contiennent environ 10 à 21% de glycine et sont principalement actives contre des bactéries à Gram (-).

Dans les épithéliums, l'induction des peptides dépend uniquement de la voie Imd et ce, même pour les peptides normalement produits par la voie Spätzle-Toll. Ryu *et al.* (2004) ont mis en évidence chez *Drosophila melanogaster* le rôle du gène homéotique *Caudal* dans l'expression constitutive de deux peptides antimicrobiens au niveau de l'épithélium: l'andropine dans le canal éjaculatoire et la drosomycine dans les glandes salivaires. Dans le tractus génital femelle, l'expression de la drosomycine est indépendante de *Caudal*, ce qui suggère l'existence d'autres voies de signalisation (Anselme *et al.* 2006).

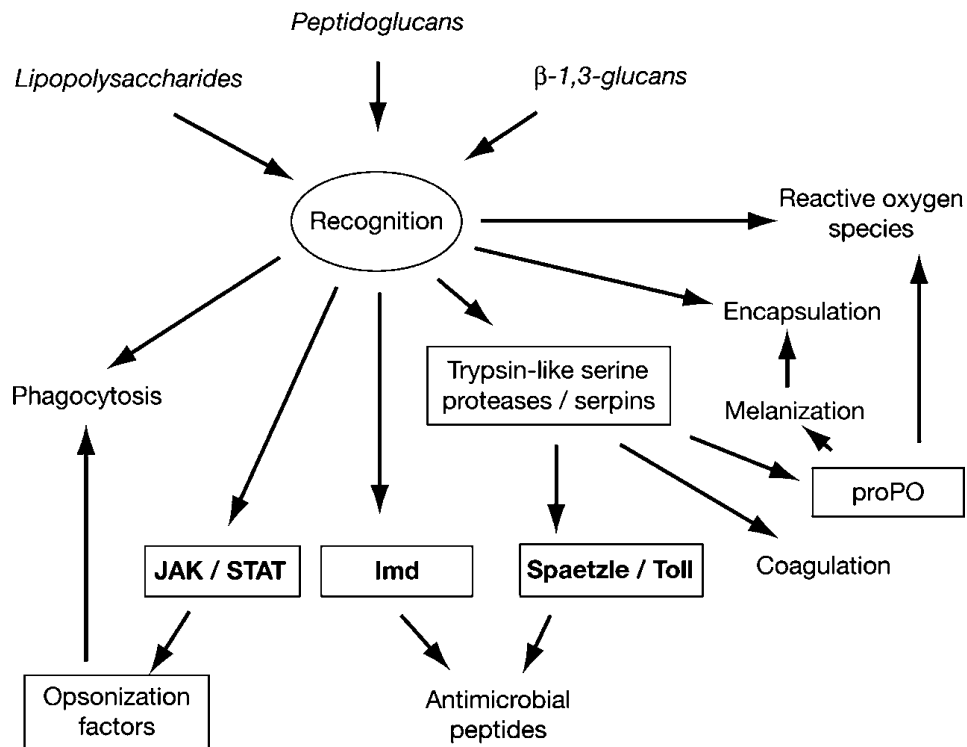


Figure 1. Synthèse des voies de signalisation et des réponses immunes suite à la reconnaissance des principaux groupes de PAMPs. Trois réponses principales sont activées : la réponse cellulaire amenant à la phagocytose, la réponse humorale amenant à la production de peptides antimicrobiens et la réaction de mélanisation amenant à l'encapsulation. D'après Schmid-Hempel 2005

Réponse cellulaire

La seconde voie de défense associée à l'immunité innée chez les insectes repose sur les réponses cellulaires impliquant une série d'hémocytes hautement différenciés. La prolifération de ces hémocytes est favorisée par les hormones, comme l'ecdysone (Rolf et Siva-Jothy 2003). Le nom des hémocytes diffère selon le modèle biologique. Nous utiliserons ici les noms des hémocytes de la drosophile, sachant que des homologues existent dans d'autres groupes d'insectes. Trois types d'hémocytes sont à noter :

- les plasmocytes: il s'agit des cellules phagocytaires prédominantes. Elles ingèrent les corps étrangers ainsi que les cellules apoptotiques et les débris cellulaires (Anselme *et al.* 2006 ; Gillespie *et al.* 1997 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). La phagocytose est initiée par la reconnaissance et la liaison à la cellule cible du plasmocyte. Elle est suivie par l'absorption, via la déformation du cytosquelette du plasmocyte, et le transport vésiculaire intracellulaire de

- phagosomes où la cible est détruite (Jiravanichpaisal *et al.* 2006);
- les lamellocytes: ces cellules forment une capsule autour d'un corps étranger trop gros pour être phagocyté (par exemple, un œuf de parasitoïde) (Anselme *et al.* 2006). On distingue deux types d'encapsulation chez les insectes: l'encapsulation mélatonique, humorale (surtout décrite chez les diptères), qui est toujours associée à l'activité de la prophénoloxydase, et l'encapsulation cellulaire (typique des lépidoptères) qui peut avoir lieu sans aucun signe de mélanisation (Gillespie *et al.* 1997);
 - les cellules à cristaux: ce sont des cellules présentant des inclusions cristallines. Elles jouent un rôle de stockage de la forme cristallisée de la phénoloxydase, une enzyme qui intervient dans la synthèse de la mélanine dans l'hémolymphe et/ou de la capsule formée par les lamellocytes (Anselme *et al.* 2006 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006).

La différenciation des lamellocytes et des plasmocytes peut être induite par les lipopolysaccharides ou les β -1, 3 glucanes bactériens. Les cellules à cristaux sont les premières à réagir lors d'une attaque pathogène activant le système de la prophénoloxydase.

Réaction de mélanisation : le système proPO

Un des systèmes majeurs de défense innée chez les invertébrés est celui de la prophénoloxydase (proPO system) (Cerenius *et al.* 2008 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006 ; Schmid-Hempel 2005). Il induit la mélanisation des pathogènes et des tissus endommagés, des réactions cytotoxiques, l'encapsulation et la phagocytose (Cerenius *et al.* 2008 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Ces processus sont contrôlés par la phénoloxydase (PO), enzyme qui à son tour est régulée de manière très élaborée ce qui évite toute production superflue de composés hautement réactifs et toxiques (Cerenius *et al.* 2008 ; Schmid-Hempel 2005).

En présence d'un corps étranger, la prophénoloxydase (proPO) est activée en phénoloxydase (PO). L'activation de la proPO en PO est induite par une cascade de protéinases et des facteurs additionnels suite à la présence de LPS, de β -1,3-glucanes et de peptidoglycanes (Figure 2) (Cerenius *et al.* 2008 ; Jiravanichpaisal *et al.* 2006). Ces enzymes sont elles-mêmes régulées par des inhibiteurs de protéases de la famille des serpins (Anselme *et al.* 2006). La forme active de la phénoloxydase déclenche les premières étapes de la formation de la mélanine. Elle catalyse (i) l'oxygénation de la tyrosine et autres monophénols en o-diphénols, et (ii) l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (Cerenius *et al.* 2008 ; Schmid-Hempel 2005). Les o-quinones polymérisent spontanément pour former la mélanine (Figure 3) (Anselme *et al.* 2006). La cascade de réactions de la proPO génère une série de composés aussi toxiques pour les microorganismes que pour l'hôte. Le système immunitaire possède des enzymes pour se débarrasser du surplus de ces produits nocifs, comme la superoxyde dismutase (SOD) ou la catalase pour lutter contre les ROS, ou encore la glutathion S-transférase (GST) pour détoxifier les composés endogènes tels que des lipides membranaires peroxydés par les ROS.

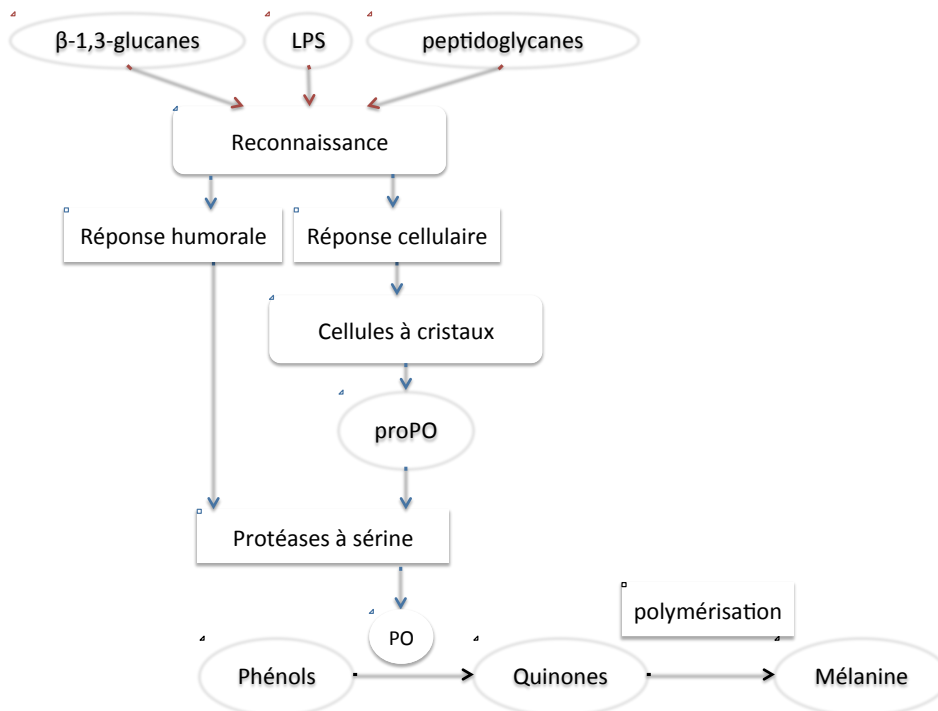


Figure 2. Chaîne de réactions (en bleu) amenant à la production de phénoloxydase (PO) suite à la reconnaissance de PAMPs (en rouge). La PO libérée catalyse la réaction de mélanisation (en noir).

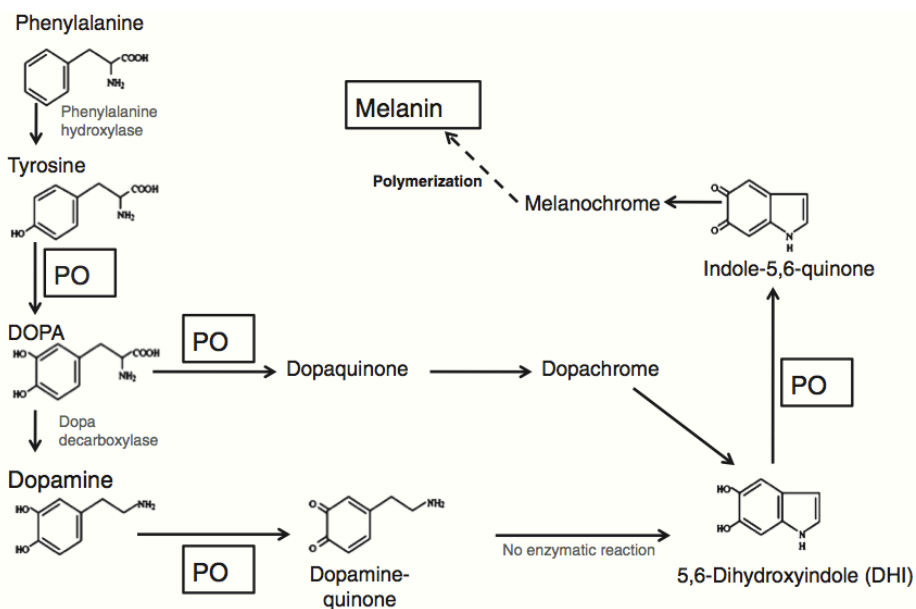


Figure 3. Rôle de la phénoloxydase (PO) dans la réaction de mélanisation. La PO participe à la formation de DOPA à partir de la tyrosine, elle convertit également la DOPA et la Dopamine en dopaquinone et le 5,6-dihydroxyindole en indole-5,6-quinone. D'après González-Santoyo et Córdoba-Aguilar 2011.

L'immunité acquise

Il a longtemps été supposé que les invertébrés ne possédaient pas d'immunité acquise. Cette dernière était censée reposer notamment sur la production d'anticorps par les lymphocytes; or, seuls les descendants des poissons cartilagineux possèdent ce type de cellules (Anderson *et al.* 2004). Il a été démontré depuis que d'autres mécanismes amènent, par convergence évolutive, à des résultats très similaires dans des groupes d'invertébrés (*A. mellifera* - Graveley *et al.* 2004 ; *D. melanogaster* - Watson *et al.* 2005 ; *A. gambiae* - Dong *et al.* 2006), de vertébrés agnathes (Pancer *et al.* 2004 ; Kasahara *et al.* 2004), et même de plantes (Spoel et Dong 2012).

L'immunité acquise des invertébrés repose sur la reconnaissance spécifique d'un antigène (molécule ou partie de molécule provenant d'un pathogène, corps étranger ou cellule aberrante), le développement d'une réponse intense contre celui-ci par production de cellules et de molécules spécialisées, ainsi que sur une mémoire immunitaire (Rimer *et al.* 2014). Chez les insectes, le gène codant pour la Dscam (*Down syndrome cell adhesion molecule* - un membre de la superfamille des immunoglobulines), code pour des protéines isoformes extrêmement diversifiées (Kurtz et Armitage 2006). Ces protéines peuvent agir comme récepteurs sur les membranes des hémocytes ou comme molécules solubles libres dans l'hémolymphe (Du Pasquier 2005). Contrairement aux vertébrés chez lesquels la diversité des récepteurs provient d'un réarrangement, mutation et conversion des gènes qui codent pour les récepteurs d'antigènes (Janeway *et al.* 2001), la diversité des récepteurs immunitaires des insectes résulte d'un épissage alternatif. Dscam contient quatre exons dont l'épissage produit trois domaines Ig hypervariables, résultant en plus de 18 000 isoformes chez *D. melanogaster* (Watson *et al.* 2005), ce à quoi s'ajoute un domaine transmembranaire variable qui amène le nombre de récepteurs possibles à plus de 38 000 (Crayton *et al.* 2006). Cette diversité de molécules assure la spécificité de la reconnaissance des antigènes étrangers. Par ailleurs, les hémocytes qui expriment ces récepteurs peuvent en porter entre 14 et 50 différents, contrairement aux vertébrés où chaque lymphocyte ne porte qu'un type de récepteur spécifique. Cette particularité pourrait conférer à l'hémocyte l'avantage des associations combinatoires des isoformes du récepteur pour la reconnaissance des pathogènes (Du Pasquier 2005), mais pourrait aussi présenter un risque d'interaction les uns avec les autres et donc de maladies auto-immunes (Wojtowicz *et al.* 2004) imposant une sélection sur les récepteurs.

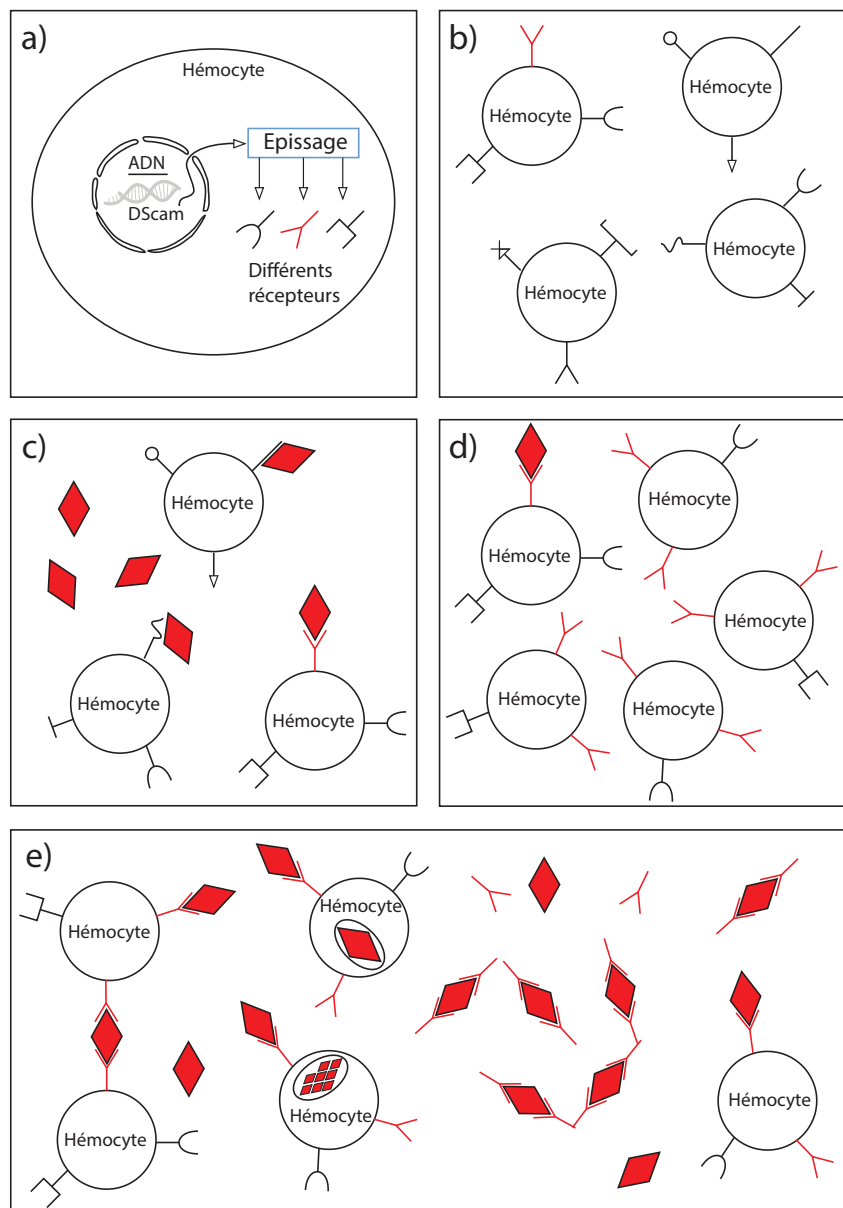
Outre la spécificité, la deuxième caractéristique majeure du système immunitaire acquis est sa mémoire. La production de molécules spécifiques prend quelques jours et ces dernières n'entrent véritablement en jeu que si l'immunité innée ne parvient pas à gérer l'infection dans de brefs délais. Une fois que l'hémocyte possédant le récepteur adéquat contre l'antigène infectieux se lie à celui-ci, il déclenche un processus de clonage en masse produisant de nombreux hémocytes qui possèdent les récepteurs pertinents contre cette infection. Cette armée d'hémocytes agit alors très efficacement contre l'infection, et certaines de ces cellules persistent dans l'organisme de l'insecte pour le reste de sa vie. De cette manière, si le même pathogène infecte le corps une deuxième fois, des hémocytes possédant les récepteurs spécifiques sont déjà présents dans l'organisme et peuvent déclencher immédiatement une réaction ciblée et intense (Janeway *et al.* 2001). Des évidences de cette mémoire immunitaire ont été montrées depuis longtemps (Boman *et al.* 1972), et elles se sont accumulées appuyant l'acceptation d'une immunité acquise chez les invertébrés (Cheng et Portnoy 2003 ; Dionne *et al.* 2003 ; Brandt *et al.* 2004 ; Eleftherianos *et al.* 2006 ; Pham *et al.* 2007 ; Cooper 2016 ; mais voir Reber et Chapuisat 2012 pour le constat inverse chez la fourmi *Formica selysi* infectée par le champignon pathogène

Beauveria bassiana).

Le système de récepteurs est très efficace contre des infections bactériennes ou parasites, mais montre ses limites face à une attaque virale. Dans ce cas, l'immunité acquise utilise des ARN d'interférence (ARNi). L'ARN double brin viral (ARNds – *double stranded RNA*) est reconnu par des récepteurs de la famille des protéines Dicer du système inné, qui le fragmentent en morceaux d'environ 20-25 paires de bases appelés ARNsi (*small interfering RNA*). Ces ARNsi sont très spécifiques au virus original et agissent comme des molécules de reconnaissance acquise. Leur spécificité tient de leur complémentarité avec l'ARNds viral. Les molécules de ARNsi se lient aux membres de la famille des protéines argonautes dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), qui éliminent les ARNds viraux. L'ARNsi peut être amplifié par des ARN polymérases ARN-dépendantes, stimulant ainsi la réponse de l'ARNi face aux virus (Rimer *et al.* 2014).

Figure 4. Mécanisme d'activation du système immunitaire acquis.

a) l'épissage alternatif du gène *Dscam* au sein des hémocytes génère une grande diversité de récepteurs transmembranaires;
b) les hémocytes portent une grande diversité de récepteurs;
c) lors d'une infection, les PAMPs du pathogène (en rouge) sont exposés aux récepteurs des hémocytes;
d) l'hémocyte portant le récepteur pertinent est cloné en masse;
e) lors d'une seconde infection du même pathogène, les hémocytes portant le récepteur approprié sont présents en grand nombre dans l'hémolymphe et prennent en charge (notamment par phagocytose) de manière ciblée et efficace le pathogène. La libération de ces récepteurs dans le milieu extra-cellulaire participe à l'opsonisation.



3.2 Immunité et système reproducteur

La protection des cellules reproductrices (notamment des gamètes et des œufs) joue un rôle essentiel dans le succès reproducteur des individus. Cette protection doit s'opérer avant, pendant et après l'accouplement. Le système immunitaire a été décrit comme étant actif ou activable dans plusieurs organes du système reproducteur, et une transmission de molécules de protection du mâle à la femelle lors de l'accouplement a été mise en évidence (Avila *et al.* 2011). L'activité immune des organes reproducteurs repose essentiellement sur la production de substances de défense contre des pathogènes. Premièrement, plusieurs types de protéines à activité antibactérienne ont été identifiés dans les tissus sexuels (Lawniczak et Begun 2004 ; McGraw *et al.* 2004 ; Peng *et al.* 2005 ; Mack *et al.* 2006 ; Domanitskaya *et al.* 2007 ; Innocenti et Morrow 2009 ; Schwenke *et al.* 2016). Cet aspect a bien été étudié chez la drosophile *D. melanogaster*. Chez les mâles, l'andropine est exprimée exclusivement dans le canal éjaculateur. Sa production est déclenchée par l'accouplement et son maximum d'induction a lieu 12 heures après l'accouplement protégeant ainsi le conduit génital mâle de toute infection ultérieure (Samakovlis *et al.* 1991 ; Peng *et al.* 2005). Deux autres peptides antimicrobiens, codés par les gènes *mst 355a* et *355b*, sont produits par les glandes annexes et pourraient avoir un rôle de protection du sperme transmis (Chapman et Wolfner 1988 ; Monsma et Wolfner 1988). Chez les femelles, la drosocine, un peptide antibactérien riche en proline, est exprimé dans le calice et les oviductes et son expression est également induite par l'accouplement (Charlet *et al.* 1996). L'expression de la cécropine, la défensine, la metchnikowine et l'attacine, tous des antibactériens, a été mise en évidence dans le réceptacle séminal et les spermathèques des mêmes mouches (Tzou *et al.* 2000). Chez les mâles de la punaise de lit *Cimex lectularius*, des activités bactériolytiques semblables à celle du lysozyme ont été mises en évidence dans l'éjaculat (Otti *et al.* 2009). La présence de peptides antimicrobiens et antifongiques dans le sperme produit par les mâles et stocké par les femelles a également été démontrée par des études de protéomique chez l'abeille domestique *A. mellifera* (Baer *et al.* 2009b et 2009a respectivement). Deuxièmement, des activités antifongiques ont également été mises en évidence chez plusieurs espèces : chez *D. melanogaster* la drosomycine a été détectée dans le conduit et le bulbe éjaculateur des mâles (Ferrandon *et al.* 1998), et elle est exprimée constitutivement dans le réceptacle séminal et la spermathèque des femelles (Tzou *et al.* 2000). Des activités antifongiques ont également été démontrées dans l'éjaculat chez l'abeille *A. mellifera* (Peng *et al.* 2016).

L'action des pathogènes n'est pas le seul danger auquel sont confrontées les cellules sexuelles. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), y compris les radicaux hydroxyle et hydroperoxyde, ainsi que le peroxyde d'hydrogène, sont produits par des réactions enzymatiques et non enzymatiques au cours des processus biologiques (Pardini 1995), et ils sont connus pour affecter la survie des spermatozoïdes de divers organismes (Ball *et al.* 2000 ; de Lamirande et Gagnon 1992). Chez les abeilles, des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion-S-transférase (GST) réduisent les niveaux de ROS nuisibles et le risque d'oxydation lors du stockage du sperme. Partant, ils pourraient accroître la longévité des spermatozoïdes (Weirich *et al.* 2002 ; Collins *et al.* 2004). La SOD convertit les anions superoxyde en H_2O_2 , qui est éliminé en partie par l'activité de la catalase. Les GST agissent en catalysant l'attachement des ROS et d'autres molécules toxiques au glutathion, une première étape dans leur élimination du corps. La présence de protéines antioxydatives a bien été montrée lors d'études de l'expression génique dans les tissus reproducteurs (Collins *et al.* 2004) et dans le cadre de l'analyse du protéome du liquide de la spermathèque et du fluide séminal des mâles chez les insectes

(Baer *et al.* 2009a, 2009b ; Zareie *et al.* 2013). Bien que le rôle des antioxydants dans la longévité des spermatozoïdes ait été validé chez plusieurs vertébrés *in vitro* (Ball *et al.* 2000 ; Bilodeau *et al.*, 2002), il n'a pas été confirmé expérimentalement chez les insectes à ce jour.

La protection des cellules reproductrices au sein des tissus est essentielle, mais le risque d'infection est maximal au moment de l'accouplement. Lors de la transmission de l'éjaculat, des pathogènes présents dans le milieu ou sur la cuticule des partenaires peuvent envahir le liquide séminal (Reinhardt et Naylor 2005). Le développement de microbes s'effectue alors au détriment de la survie des spermatozoïdes (Galdiero *et al.* 1988 ; Eley *et al.* 2005 ; Otti *et al.* 2013) et peut induire des dommages dans les tissus reproducteurs femelles. Les protéines antimicrobiennes et antioxydatives produites dans les tissus sexuels mâles sont transmises lors de l'accouplement, assurant ainsi une protection complète mais temporaire des cellules spermatiques. Cette transmission a été observée chez *D. melanogaster* (Lung *et al.* 2001), *C. lectularius* (Otti *et al.* 2009) et *A. mellifera* (Baer *et al.* 2009a). Ces résultats concordent avec ceux mis en évidence par Avila *et al.* (2011) qui ont dénombré la présence d'antibactériens dans le sperme de 16 espèces d'insectes appartenant à 6 ordres différents.

3.3 Bactéries associées aux organes reproducteurs

Bien qu'il ait été montré que certains microorganismes ont des actions néfastes sur les cellules reproductrices (Galdiero *et al.* 1988 ; Eley *et al.* 2005 ; Otti *et al.* 2013), peu de travaux ont mis en évidence la présence de microbes opportunistes dans ou sur les organes reproducteurs chez les insectes (Reinhardt *et al.* 2005 ; Otti *et al.* 2013 ; Rizzi *et al.* 2013). Il a été montré chez différentes espèces d'insectes que des bactéries ou des champignons sont présents de manière constitutive dans l'appareil reproducteur mâle et femelle, et qu'ils ne représentent aucune menace pour les gamètes (Otti 2015). Au contraire des bactéries produisant des bacteriocines létales pour les souches pathogènes résidentes (Lombardo *et al.* 1999) ou qui aident à la synthèse et à l'absorption des nutriments (Stevens et Hume 1998) fournissant ainsi de nouvelles bactéries probiotiques et antibiotiques aux femelles on été mises en évidence. Chez le moustique *Anopheles stephensi*, 6 espèces de levures ont été mises en évidence dans les ovaires et l'appareil mâle (en ce compris les testicules, les gonoductes et les glandes annexes) (Ricci *et al.* 2011). La levure *Wickerhamomyces anomalus* semble être spécifiquement associée au moustique et est présente à tous les stades de développement de celui-ci. Chez la punaise du lit *C. lectularius*, 3 espèces de champignons et 6 espèces de bactéries ont été identifiées dans les organes génitaux des mâles (Reinhardt *et al.* 2005), et 19 espèces de bactéries dans les organes copulatoires des femelles (Otti *et al.* 2013). Chez le capricorne asiatique des agrumes, *Anoplophora chinensis*, 7 genres de bactéries ont été identifiés notamment sur les œufs immatures chez les femelles et dans les testicules des mâles. Trois de ces genres seraient spécifiques aux femelles (Rizzi *et al.* 2013). Chez les termites, Raina *et al.* (2009) ont montré la présence de 11 espèces de bactéries anaérobiques et de 6 aérobiques dans les spermathèques des femelles. Les principaux embranchements bactériens (Actinobacteria, Firmicutes et Proteobacteria) et un embranchement fongique (Ascomycota) sont représentés dans ces études (Otti 2015). Le rôle de ces microorganismes n'est pas clairement établi.

En synthèse

L'immunité chez les insectes est basée sur deux mécanismes complémentaires: une immunité acquise (qui repose sur la reconnaissance spécifique, une réponse intense contre

tout corps étranger et une mémoire immune) et une immunité innée. Cette dernière présente deux voies de combat contre les pathogènes : la voie humorale (qui produit essentiellement des peptides antimicrobiens et des lysozymes) et la réponse cellulaire (à l'origine de la phagocytose, l'encapsulation et la nodulation des corps étrangers). Ces deux voies innées – humorale et cellulaire - participent également aux réactions de mélanisation via le système PO/proPO. Ce dernier, induit par la présence des PAMPs dans l'organisme, régule la plupart des actions du système immunitaire. Le système PO/proPO libère des substances cytotoxiques, dont des intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROS) contre lesquels l'organisme doit aussi se protéger, et il aboutit à la formation de mélanine.

Le système immunitaire est actif dans les organes reproducteurs et passe essentiellement par la production de protéines antimicrobiennes (antibactériens et antifongiques) et de protéines de protection contre les ROS. Ces substances protectrices sont transmises lors de l'accouplement, assurant ainsi une protection maximale des cellules spermatiques.

Les pathogènes ne sont pas les seuls microorganismes associés au système reproducteur. Différents travaux ont trouvé plusieurs espèces de bactéries et de champignons dans les tissus reproducteurs mâles et femelles. La présence de ces microorganismes semble être spécifique et durable suggérant une forme de mutualisme plus que de parasitisme.

4. Hyménoptères sociaux : immunité et reproduction

Les Hyménoptères comptent environ une centaine de familles, dont seules onze présentent un mode de vie eusocial. L'eusocialité serait apparue de manière indépendante dans plusieurs de ces groupes au cours de l'évolution (Hölldobler et Wilson 2009). L'eusocialité est caractérisée par 3 critères : (i) une coopération dans les soins aux jeunes; (ii) le chevauchement d'au moins deux générations d'individus, de façon à ce que les enfants puissent aider leurs parents; et, (iii) une division du travail au niveau de la reproduction, conduisant à la formation de castes spécialisées en ouvrières et en reproducteurs (Wilson 1971 ; Aron et Passera 2000). Les hyménoptères sociaux (guêpes, abeilles et fourmis) remplissent parfaitement ces critères. Ils s'organisent en sociétés où une ou plusieurs reines ne s'occupent que de la reproduction alors que toutes les autres tâches (soin aux jeunes, confection et entretien du nid, recherche de nourriture, défense,...) sont assurées par leurs filles généralement stériles, les ouvrières. Lorsque la société atteint la maturité, elle produit des mâles et des femelles (futurs reines) sexués qui quitteront le nid pour s'accoupler. Une fois fécondées, les jeunes reines fondent leur propre société ou restent au nid maternel pour contribuer à son essor. Les sociétés d'hyménoptères présentent un caractère unitaire qui amène certains auteurs à les décrire comme des « superorganismes » composés d'individus plutôt que de cellules et de tissus (Wheeler 1911 ; Wilson 1971).

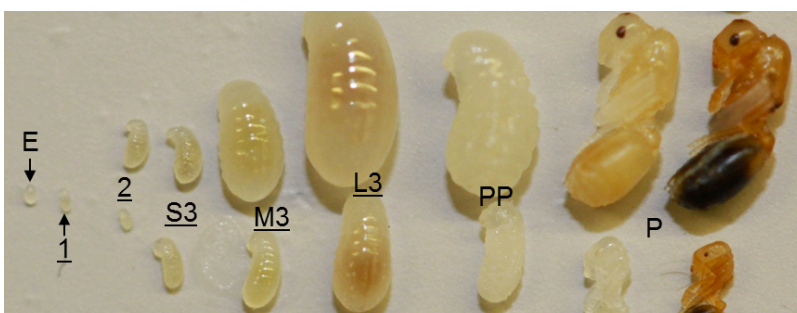


Figure 5. Stades de développement chez les hyménoptères sociaux. Exemple des fourmis pharaon (*Monomorium pharaonis*). Ligne supérieure : développement d'une future reine ; ligne inférieure : développement d'une ouvrière. Oeuf (E); larve 1^{er} stade (1); larve 2^{ème} stade (2); larve petit, moyen, et grand 3^{ème} stade (S3, M3, L3); prenymph (PP); et nymphe (P).

4.1 Immunité

L'immunité sociale

Vivre en groupe augmente les risques de transmission d'une infection par un pathogène. Chez les hyménoptères sociaux, le fait que les individus d'une société sont généralement étroitement apparentés a pour conséquence qu'ils présentent une sensibilité semblable aux infections (Cremer *et al.* 2007). Cependant fourmis, abeilles et guêpes ne montrent pas de faiblesse particulière face aux pathogènes. Ils ont développé un système de défense qualifié d'immunité sociale. Ce type d'immunité consiste en des défenses et des comportements au niveau du groupe, et est d'autant plus efficace que le groupe est peuplé (Hughes *et al.* 2002). Premièrement, le nettoyage du nid et l'évacuation des individus morts ou infectés préserve le reste de la société. Chez l'abeille domestique *A. mellifera*, il a été montré que ce comportement réduit significativement la propagation du parasite au sein de la ruche (Boecking et Spivak 1999). Il s'agit ici d'un comportement héréditaire qui peut être sélectionné (Rosenkranz *et al.* 2010). Les gènes impliqués dans cette défense ne semblent pas liés à une hypersensibilité olfactive mais montrent plutôt un lien avec le soin au couvain (Le Conte *et al.* 2011). Par ailleurs, les ouvrières infectées restent loin du couvain, et leurs sœurs saines augmentent les soins aux larves et aux œufs, ce qui évite l'entrée du pathogène dans le couvain (Ugelvig *et al.* 2007). Chez la fourmi *Myrmica rubra*, lorsque l'évacuation des cadavres présents dans le nid est expérimentalement restreinte, les adultes et les larves ont des taux de survie inférieurs à ceux des colonies contrôles qui éliminent librement les cadavres (Diez *et al.* 2014). L'évacuation des corps et la gestion des déchets en général semblent être des tâches attribuées à des ouvrières spécialisées (Hart et Ratnieks 2002 ; Ballari *et al.* 2007 ; Waddington et Hughes 2010). Chez les fourmis champignonnistes *A. colombica*, 1 à 5% des ouvrières sont spécialisées dans la prophylaxie et n'effectueraient d'autres tâches que très rarement (Hart et Ratnieks 2002), ce qui réduit le nombre d'individus exposés aux pathogènes et prévient la contamination du reste de la société. Deuxièmement, le toilettage mutuel est un comportement très répandu (Cremer *et al.* 2007). Il permet de retirer les ectoparasites des congénères de manière efficace (Rosengaus *et al.* 1998 ; Hughes *et al.* 2002 ; Yanagawa *et al.* 2008). De plus, des peptides antimicrobiens contenus dans la salive (Turillazzi *et al.* 2004) réduisent le risque d'infection. Les fourmis sont capables de détecter leurs congénères infectées mais ne les évitent pas (Leclerc et Detrain 2016). Les individus infectés bénéficient au contraire d'un toilettage plus intense de la part des autres membres de la société, ceci augmente les chances de survie de la fourmi infectée et confère aux ouvrières qui les ont toilettées une résistance accrue au parasite auquel leur congénère a été exposée (Ugelvig et Cremer 2007 ; Walker et Hughes 2009). Le toilettage mutuel joue alors un rôle important dans la mémoire immune au niveau social, et permet au groupe de répondre de manière spécifique. Troisièmement, le maintien d'une température élevée a été montré chez plusieurs hyménoptères sociaux (revu dans Kadochová et Frouz 2013). La production de chaleur peut avoir une origine métabolique comme chez les fourmis, ou peut être due au frottement des ouvrières les unes contre les autres comme chez les abeilles. Ces dernières peuvent utiliser cette technique pour générer une « fièvre » autour du couvain en réaction, par exemple, à une infection par le pathogène thermosensible *Ascospaera apis* (Starks *et al.* 2000). Finalement, certaines fourmis et abeilles récoltent des résines de plantes qui, une fois ramenées au nid, jouent un rôle antibactérien. Ces résines ne subissent aucun changement chimique par rapport à la plante d'origine et assurent une protection chimique du nid (Christe *et al.* 2003 ; Schlüns et Crozier 2009).

Ainsi, l'immunité individuelle et l'immunité sociale présentent diverses similitudes : détection des parasites et discrimination du non soi, défense frontalière, défense somatique, défense de la lignée germinative (Cremer *et al.* 2007 ; Cremer et Sixt 2009). L'efficacité de l'immunité sociale est remarquable : des analyses génétiques indiquent que l'abeille domestique ne possède qu'un tiers des gènes impliqués dans l'immunité comparativement à d'autres espèces d'insectes comme la drosophile (Evans *et al.* 2006). Les gènes impliqués dans l'immunité sociale auraient donc remplacé – en partie - l'action des gènes de l'immunité individuelle (Le Conte *et al.* 2011).

Les défenses immunitaires chez les fourmis

Les différentes composantes du système immunitaire des insectes se retrouvent chez les fourmis. Ces dernières montrent un comportement poussé d'évitement des pathogènes en maintenant le nid propre : les déchets, nourriture avariée ou cadavres des congénères sont évacués régulièrement (Bot *et al.* 2001). Des comportements de nettoyage de la nourriture ont été décrits chez *Atta sexdens* et *Atta laevigata*, où les ouvrières *minor* retirent des champignons et autres organismes présents sur les feuilles transportées au nid par les ouvrières *major* (Vieira-Neto *et al.* 2006). Il a été montré également chez la fourmi *Temnothorax unifasciatus* que les individus moribonds (infectés par le champignon *Metarhizium anisopliae*) s'isolent pour mourir en solitaire, ce qui prévient la propagation du pathogène dans le reste de la société (Heinze *et al.* 2009). De même, les individus infectés par ce même champignon évitent d'entrer en contact avec le couvain chez la fourmi *Lasius neglectus* (Ugelvig et Cremer 2007). L'utilisation de résine de conifères a été décrite chez *F. paralugubris*. Les propriétés antibactériennes de cette résine empêchent le développement de microorganismes dans le nid (Christe *et al.* 2003).

En ce qui concerne l'immunité sociale, la prophylaxie et le toilettage mutuel sont communs à toutes les espèces de fourmis (Cremer *et al.* 2007). Ces comportements permettent d'accroître la résistance globale de la société aux pathogènes et d'établir une mémoire immune collective. Il a été montré que les ouvrières infectées par le pathogène *M. anisopliae* survivent mieux si elles bénéficient du toilettage de leurs congénères, chez *Lasius neglectus* (Ugelvig et Cremer 2007) et *Acromyrmex echinator* (Walker et Hughes 2009).

La cuticule chitineuse des fourmis constitue la première barrière physique solide contre les corps étrangers. Cette cuticule est également présente dans les parties externes des voies digestives et reproductrices (Chapman et Wolfner 1998). Les champignons sont les seuls pathogènes décrits qui sont capables de traverser la cuticule des insectes (Siva-Jothy et Moret 2005).

Le système de reconnaissance de peptidoglycanes et de GGBP (Gram Negative Binding Protein) a été mis en évidence chez *Myrmica ruginodis*, *Formica aquilonia* (Viljakainen 2008), *Nothomyrmecia macrops* et plusieurs espèces du genre *Myrmecia* (Schlüns *et al.* 2008). Des analyses du génome de *Linepithema humile*, *Pogonomyrmex barbatus*, *Atta cephalotes*, *Myrmica ruginodis* et *Formica aquilonia* montrent que des éléments impliqués dans les voies de signalisation Toll, Imd, JNK, et JAK/STAT sont également présents (Viljakainen 2008 ; Smith *et al.* 2011a et 2011b, Suen *et al.* 2011). La réponse systémique, dont la production de peptides antimicrobiens et de molécules fortement réactives de l'oxygène (ROS) a été montrée chez un grand nombre d'espèces de fourmis (Schlüns et Crozier 2009). Un des principaux peptides antimicrobiens des fourmis est la défensine. Celle-ci diffère de la défensine de l'abeille car elle ne possède pas de terminaison C-amide, et elle est efficace contre des bactéries Gram (+) tel que *Micrococcus luteus* (Taguchi *et al.* 1998). D'autres peptides comme l'abaécine, l'hymenoptaécine, la transferrine, la formaécine

ont également été décrits chez les fourmis (Schlüns et Crozier 2009). Leur efficacité contre les microorganismes n'a cependant pas été testée expérimentalement *in vivo*. Quant à la réaction de mélanisation déclenchée par l'activation de la phénoloxydase, elle est décrite chez *Atta colombica* (Baer *et al.* 2005 ; 2006), *Acromyrmex octospinosus* (Armitage et Boomma 2010), et *Formica selysi* (Castella *et al.* 2010), et est probablement commune à toutes les fourmis.

Tout comme chez l'abeille domestique, les fourmis semblent montrer un nombre réduit de gènes liés à l'immunité par comparaison avec les insectes non sociaux. L'analyse du génome révèle qu'environ la moitié des gènes impliqués dans l'immunité de *D. melanogaster* sont présents chez les fourmis *Linepithema humile* (Smith *et al.* 2011a), *Pogonomyrmex barbatus* (Smith *et al.* 2011b) et *Atta cephalotes* (Suen *et al.* 2011). Une autre caractéristique qui différencie les fourmis des autres insectes est que les individus des différentes castes montrent des forces immunitaires différentes. Chez les fourmis champignonnistes *Acromyrmex echinator* et *Atta colombica* (Baer *et al.* 2005 ; Stürup *et al.* 2014) et les fourmis des bois *Formica exsecta* (Vainio *et al.* 2004), les mâles montrent des défenses immunes (encapsulation) significativement plus faibles que les femelles, ouvrières et reines. Deux hypothèses justifient ce phénomène : (1) les mâles, haploïdes, ont une susceptibilité accrue due au manque total de loci hétérogènes liés à l'immunité (O'Donnell et Beshers 2004), et/ou (2) les mâles ont un investissement réduit dans l'immunité, étant donné la courte espérance de vie (Stürup *et al.* 2014). Cette faible immunité des mâles a également été démontrée chez le bourdon *Bombus terrestris* (Gerloff *et al.* 2003)

Les fourmis présentent cependant certaines caractéristiques immunitaires qui leur sont propres. Seules les fourmis possèdent une glande métapleurale (structure en paire située à l'extrémité postérolatérale du mésosoma). Schlüns et Crozier (2009) ont compilé les données concernant la production des substances antimicrobiennes par les glandes métapleurales chez 22 espèces de fourmis appartenant à 5 familles majeures (Dorylinae, Formicinae, Myrmicinae, Ponerinae, Pseudomyrmecinae). Les glandes métapleurales sécrètent différentes substances antimicrobiennes (notamment l'acide phénylacétique, l'acide indole-3-acétique, l'acide 3-hydroxydecanoïque, l'acide 3-hydroxyhexanoïque ou l'acide 3-hydroxyoctanoïque) qui ont des actions antibactériennes (Gram (+) et Gram (-)) et/ou antifongiques (Schlüns et Crozier, 2009). La glande subépithéliale est également décrite comme productrice de substances antimicrobiennes (Gobin *et al.* 2003).

La protection immunitaire du sperme

La transmission de pathogènes lors de l'accouplement représente un coût considérable. Des défenses immunes qui protègent le sperme et les organes sexuels sont également présents chez les hyménoptères sociaux (Avila *et al.* 2011).

Des analyses d'expression génique ont montré l'expression de deux peptides antibactériens, abaécine and défensine, dans les glandes accessoires des mâles, ainsi que dans la *bursa copulatrix* et la spermathèque des reines vierges et inséminées artificiellement chez la fourmis champignonnistes *A. colombica* and *A. echinator* (Chérasse *et al.* 2018). D'un autre côté, des analyses protéomiques ont identifié la présence des substances antifongiques et antibactériennes, ainsi que des enzymes antioxydatives dans le fluide séminal chez l'abeille *A. mellifera* (Collins *et al.* 2006 ; Baer *et al.* 2009a, 2009b). Peu de travaux ont porté sur l'immunité du sperme chez les fourmis. La majorité des études consacrées au sperme traitent de la compétition spermatique (Den Boer *et al.* 2010), du coût immunitaire pour les jeunes fondatrices associé au stockage du sperme (Baer *et al.* 2006 ; Loof 2010), de l'action du liquide séminal sur la viabilité du sperme (den Boer *et al.* 2008), ou

encore des voies empruntées par le sperme lors de l'accouplement (Allard *et al.* 2006). De récentes analyses de l'expression des gènes liés à l'immunité dans les organes reproducteurs mâles (glandes annexes) et femelles (spermathèque et *bursa copulatrix*) montrent une très faible expression de prophénoloxydase mais une expression normale à forte de peptides antimicrobiens (défensine et abaécine). Cette étude suggère que les défenses du sperme sont spécifiques contre les pathogènes et non généralistes (Chérasse *et al.* 2018).

De manière complémentaire, l'activité de trois enzymes (catalase, superoxyde dismutase et glutathion-S-transférase) a été montrée dans le sperme et dans le liquide de la spermathèque des reines chez *A. mellifera* (Weirich *et al.* 2002). Les concentrations en catalase et glutathion-S-transférase sont supérieures dans le liquide de la spermathèque des reines accouplées aux concentrations présentes dans le liquide de la spermathèque des reines vierges, ce qui suggère un rôle protecteur des spermatozoïdes qui y sont stockés. Les travaux de Wegener *et al.* (2013) montrent que les phospholipides des spermatozoïdes sont en effet protégés de l'oxydation pendant le stockage. Curieusement, en dépit de l'existence d'un grand nombre de protéines antimicrobiennes dans le sperme stocké, l'activité immunitaire de ces substances contre les pathogènes reste très mal étudiée chez les hyménoptères sociaux. La seule étude complète réalisée à ce jour dans ce domaine concerne l'abeille domestique *A. mellifera*, chez laquelle une activité antifongique contre le champignon pathogène *Nosema apis* a été mise en évidence par Peng *et al.* (2016) : la fraction protéique du liquide séminal induit la germination des spores extracellulaires, ce qui perturbe le cycle de vie du champignon, alors que la fraction non protéique du liquide séminal induit une perte de viabilité directe des spores intactes.

A notre connaissance, aucun travail n'a porté sur l'activité antibactérienne du liquide séminal. En outre, la protection du sperme contre les pathogènes susceptibles d'intégrer la spermathèque, au moment ou après l'accouplement, reste totalement inexploré et ce, malgré son rôle capital sur la productivité et la survie des sociétés.

4.2. Mode de reproduction

Le cycle de vie des hyménoptères sociaux présente des caractéristiques uniques qui font de ce groupe un modèle d'étude privilégié dans le domaine de la reproduction. Les mâles et femelles (futurs reines), ne sont produits qu'une seule fois par an par les sociétés matures. La production des spermatozoïdes a lieu dans les testicules des mâles pendant la phase nymphale. Lorsque le mâle atteint sa maturité sexuelle, l'ensemble des spermatozoïdes migrent vers les vésicules séminales, où ils sont stockés jusqu'à l'accouplement, et les testicules s'atrophient (Figure 6). Il n'y a donc plus de production de cellules spermatiques par la suite, ce qui pose des contraintes sélectives extrêmement fortes sur la quantité, la qualité et la protection des spermatozoïdes, puisque le succès reproducteur des mâles repose sur cet unique stock de cellules spermatiques (Boomsma *et al.* 2005). Lors de l'éjaculation, le liquide des vésicules séminales - composé essentiellement d'éléments nutritifs pour le sperme et de cellules spermatiques - est mélangé avec le contenu des glandes annexes. Ces glandes semblent produire différents composés qui aident à maintenir les spermatozoïdes viables une fois transmis aux femelles (King *et al.* 2010), ainsi que des peptides antimicrobiens qui protègent le sperme et la femelle contre d'éventuelles infections suite à l'accouplement (Baer *et al.* 2009a ; Peng *et al.* 2016).

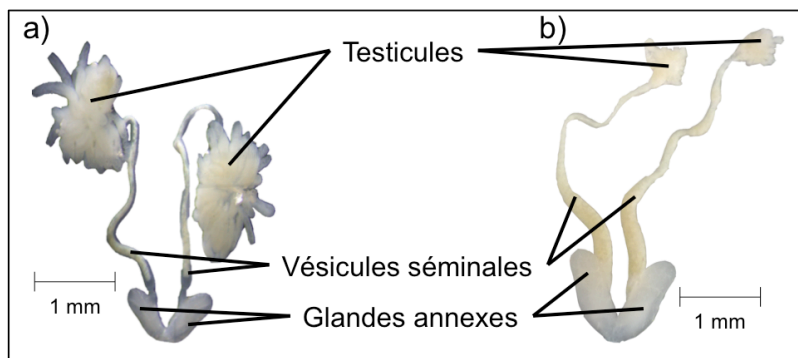
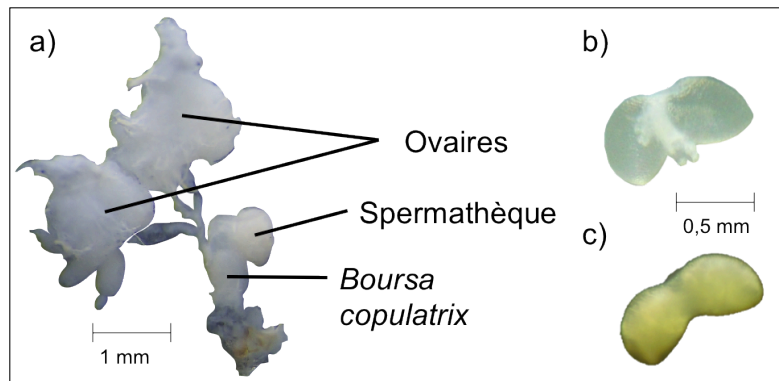


Figure 6. Organes sexuels mâles de *Cataglyphis bombycina*. a) état à la fin du développement de la nymphe : testicules actifs produisent et contiennent les spermatozoïdes ; b) état à maturité du mâle : testicules atrophiés et spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales.

Figure 7. Organes sexuels femelles de *Lasius niger* à maturité. a) ensemble des organes sexuels ; b) spermathèque vide d'une femelle avant l'accouplement ; c) spermathèque contenant le sperme après l'accouplement.



En règle générale, l'accouplement procède par un vol nuptial impliquant un grand nombre d'individus des deux sexes, ce qui limite très probablement toute forme de compétition sexuelle directe. Les mâles s'accouplent généralement avec une, plus rarement quelques femelles. Ils meurent quelques heures après l'accouplement. C'est donc à titre posthume qu'ils participent à l'élaboration de la nouvelle société, et qu'ils assurent leur succès reproducteur. Lors de cet unique événement, les femelles s'accouplent avec un ou plusieurs mâles. Elles stockent le sperme reçu dans un organe spécialisé, la spermathèque (Boomsma 2009). Les reines fraîchement accouplées retombent au sol et cherchent un orifice pour y démarrer leur nouvelle société. Elles ne se ré-accouplent jamais; le sperme acquis lors du vol nuptial leur permet de fertiliser les œufs pondus tout au long de leur vie adulte, laquelle est plus ou moins longue selon l'espèce. Le record de longévité est détenu par la fourmi noire des jardins *Lasius niger* dont une des colonies a été gardée vivante en laboratoire pendant 28 ans et 8 mois (Kutter et Stumper 1969).

Lors de l'accouplement, le sperme arrive d'abord dans la *bursa copulatrix*, organe qui accueille le(s) éjaculat(s). Les spermatozoïdes migrent ensuite vers la spermathèque où ils seront stockés en vue de leur utilisation. Une fois dans la spermathèque, le métabolisme des spermatozoïdes ralentit et ils entrent en dormance parfois pendant plusieurs décennies (Ribou et Reinhardt 2012). Un des secrets de leur longévité serait la faculté à passer en métabolisme anaérobie, n'ayant plus besoin que des étapes de production d'ATP de la glycolyse, et évitant ainsi les dommages causés par les ROS produits par la respiration (Paynter *et al.* 2017). La fécondation des œufs a lieu probablement dans la *bursa copulatrix* (Baer et Boomsma 2006) et se fait avec une utilisation particulièrement parcimonieuse des spermatozoïdes. Chez la fourmi champignoniste *A. colombica*, les reines utilisent en moyenne 2 spermatozoïdes/œuf (den Boer *et al.* 2009). Cette extrême efficacité dans la fertilisation des œufs met en évidence la valeur de chaque cellule spermatique, et l'importance de leur préservation pour le succès reproducteur des mâles et des femelles.

En résumé, les hyménoptères sociaux possèdent un système reproductif particulier dans lequel les mâles produisent une quantité limitée de spermatozoïdes, qui est transférée

dans sa totalité aux femelles lors d'un unique épisode d'accouplement. Les femelles ne se ré-accouplent jamais, elles gardent le sperme qu'elles ont reçu parfois pendant plusieurs décennies et l'utilisent parcimonieusement. La protection et le maintien des spermatozoïdes jouent un rôle primordial dans le succès reproducteur des mâles et des femelles reproductrices, et semblent être soumis à de fortes pressions de sélection qui optimisent ces traits. Malgré leur importance, les mécanismes de protection des spermatozoïdes avant, pendant et après l'accouplement restent mal connus, et nécessitent des études qui mettent en évidence des activités immunes des organes de stockage des spermatozoïdes, ainsi que les microorganismes qui sont associés au système reproducteur mâle et femelle.

Objectifs et synthèse des résultats

Objectifs et synthèse des résultats

Le but de ce travail est d'analyser l'effet de différents facteurs pouvant affecter la quantité, la qualité et la protection des spermatozoïdes chez les fourmis. Les expériences ont été réalisées à trois épisodes de la reproduction : lors de la production des cellules spermatiques, lors de leur transmission au moment de l'accouplement, et lors de leur stockage chez la reine. Nous avons exploité des méthodes issues de plusieurs champs de la biologie ; ceci nous ont permis d'obtenir des résultats robustes malgré les contraintes d'échantillonnage liées à la très faible quantité de sperme collectable pour chaque individu ($\sim 0,2 \mu\text{l}$). Quatre chapitres complémentaires traitent ces questions.

Chapitre 1. Protein restriction affects sperm number but not sperm viability in male ants. Dávila et Aron. 2017. *Journal of Insect Physiology* 100: 71-76.

La production de spermatozoïdes est coûteuse (Dewsbury 1982 ; Reznick 1985 ; Simmons 2001 ; Parker et Pizzari 2010). L'investissement dans la production de cellules spermatiques se fait en fonction des ressources disponibles et, en cas de carences, des compromis s'installent avec d'autres fonctions biologiques comme le développement somatique (Olsson *et al.* 1997 ; Sella et Lorenzi 2003). Chez les insectes holométaboles, les réserves énergétiques liées au développement des organes et des fonctions adultes sont acquises lors de la phase larvaire. Des contraintes alimentaires subies lors de cette phase affectent inévitablement le développement des organes somatiques et reproducteurs. De manière générale chez les fourmis, la production de la totalité des cellules spermatiques a lieu lors de la phase nymphale, et se fait donc sur les seules réserves acquises au stade larvaire. Peu de temps avant ou après l'éclosion de l'adulte, les testicules régressent et les spermatozoïdes migrent dans les vésicules séminales où ils sont stockés en vue de l'accouplement. Toute production ultérieure de cellules spermatiques est impossible, ce qui impose une sélection sévère sur la quantité, la qualité et la conservation des cellules spermatiques.

Nous avons étudié les effets d'une restriction protéique au cours du développement sur le nombre de spermatozoïdes et leur viabilité (proportion de spermatozoïdes vivants par rapport au nombre total) chez le mâle de la fourmi d'Argentine *Linepithema humile*. Nous avons également examiné son impact sur le développement des caractères somatiques des mâles : la masse et l'asymétrie fluctuante des adultes. Les analyses du nombre et de la viabilité des spermatozoïdes ont été réalisées par cytométrie en flux. Cette méthode permet d'analyser la totalité des cellules spermatiques contenues dans les vésicules séminales des mâles, et évite les biais induits par les extrapolations inhérentes aux méthodes classiques de comptage en microscopie optique (Paynter *et al.* 2014).

Nos résultats montrent que la viabilité des spermatozoïdes des mâles élevés en conditions de restriction protéique ne diffère pas de celle des mâles élevés sans carences. Par contre le nombre de spermatozoïdes des mâles test est inférieur à celui des mâles contrôle. Cette différence suggère l'existence d'un compromis entre la qualité et la quantité de spermatozoïdes produits, deux paramètres principaux de la reproduction. Le nombre de mâles produits par colonie, leur masse ou leur asymétrie n'ont pas été affectés par le traitement. Cependant les mâles élevés dans les colonies carencées se sont développés

deux fois plus lentement. Ces résultats suggèrent que l'investissement dans la qualité du sperme et également dans la croissance somatique, qui améliore la capacité d'un mâle à se disperser et à trouver un partenaire, sont essentiels à la réussite de la reproduction des mâles.

Chapitre 2. *Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity.* Dávila *et al.* 2015. *Journal of Insect Physiology* 78: 9-14.

Chez les fourmis, le nombre de spermatozoïdes dont dispose une reine pour féconder ses œufs tout au long de sa vie est limité. La période d'accouplement n'a lieu qu'une fois au début de la vie des adultes et est très brève (quelques heures) (Baer 2011). La femelle stocke et utilise parcimonieusement des spermatozoïdes durant toute sa vie (qui peut atteindre plusieurs décennies selon les espèces) sans possibilité de refaire des réserves de sperme par la suite. Des pathogènes transmis lors de l'accouplement (Knell et Webberley 2004; Otti 2015) peuvent réduire la motilité et la survie des spermatozoïdes (Eley *et al.* 2005; Galdiero *et al.* 1988; Otti *et al.* 2013), et avoir des effets dramatiques sur le succès reproducteur des deux partenaires. La protection des cellules spermatiques est donc essentielle, surtout pour les espèces à longue durée de vie. Une des réponses majeures du système immunitaire des insectes est menée par le système de la phénoloxydase. Ce système est constitutif, non-spécifique et génère des sous-produits cytotoxiques qui peuvent attaquer les pathogènes mais également endommager les spermatozoïdes (Cerenius *et al.* 2008 ; Schmid-Hempel 2005). Des études portant sur l'immunité dans l'hémolymphe des fourmis montrent l'activation du système de la phénoloxydase (Castella *et al.* 2009) et de l'encapsulation qui s'en suit (Baer *et al.* 2006) au moment de l'accouplement, mais son action n'a pas été testée dans les organes reproducteurs.

Cette étude teste l'activité de la phénoloxydase (PO) et de sa forme zymogène la phénoloxydase (proPO) dans les vésicules séminales des mâles vierges ainsi que la spermathèque des femelles vierges (gynes) et fécondées, chez les fourmis *Lasius niger*, *Atta colombica* et *Acromyrmex echinator*. A titre comparatif, les broyats de la tête-thorax des mêmes individus ont été testés. L'activité de la PO et de la pro-PO a été analysée chez les reines de *L. niger* un jour, une semaine, deux semaines et quatre mois après l'accouplement. Nous avons utilisé une méthode classique de détection colorimétrique basée sur la conversion de *L-dopa* en dopachrome par la phénoloxydase présente dans l'échantillon. La catalase, une enzyme antioxydative probablement impliquée dans la protection du sperme contre les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), a également été mesurée.

Nous avons démontré que la PO et la proPO sont absentes des organes sexuels mâles et femelles, et ce chez tous les individus testés. L'action de la PO pourrait avoir des effets négatifs sur la mobilité ou la survie des spermatozoïdes, son absence suggère une adaptation favorisant la conservation du sperme. Une activité significative de la catalase a été montrée dans les mêmes organes, confirmant une protection contre les ROS dans les organes de stockage du sperme et écartant la possibilité d'un manque de détection de la PO due aux très faibles volumes des organes sexuels. Dans le broyat de la tête-thorax, les réserves de proPO diminuent juste après l'accouplement et augmentent lors des semaines qui suivent l'accouplement. Ces variations sont en accord avec une activation du système immunitaire déclenchée par l'accouplement et d'un assouplissement de celui-ci lorsque la femelle démarre la ponte.

Chapitre 3. *Antibacterial activity of male and female sperm-storage organs in ants.* Dávila *et al.* 2018. *Journal of Experimental Biology* 221: jeb175158.

L'absence d'une activité immune généraliste dans les organes sexuels mâles et femelles, suggère que d'autres mécanismes de défense contre les infections doivent être présents.

Une étude d'expression génique dans les organes sexuels avant et après l'accouplement chez *L. niger* (Chérasse *et al.* 2018) ainsi que l'analyse du protéome de l'éjaculat (Baer *et al.* 2009b) et du sperme stocké chez la reine de *Apis mellifera* (Baer *et al.* 2009a) montrent la présence de peptides antibactériens et antifongiques associés au sperme. Ces mesures indirectes sont confirmées par les travaux de Peng *et al.* (2016) qui indiquent une activité antifongique dans le liquide séminal des mâles chez l'abeille domestique *A. mellifera*. Malgré leur importance dans la protection des spermatozoïdes avant et après l'accouplement, aucune activité antibactérienne n'a été montrée à ce jour chez les insectes sociaux.

Ici, nous testons l'activité antibactérienne (ABA) du liquide contenu dans les vésicules séminales des mâles vierges et dans les spermathèques des reines vierges et des reines un jour, une semaine, deux semaines et quatre semaines après l'accouplement. Le broyat de la tête-thorax des mêmes individus a été utilisé comme mesure de l'ABA dans les tissus somatiques. Les tests ont été menés en incubant le contenu des organes sexuels ou le broyat de la tête-thorax avec des bactéries *E. coli* et en déterminant leur abondance grâce à une méthode de dosage colorimétrique. Cette méthode repose sur la transformation d'un substrat (MTT) en un produit coloré par la réaction de respiration cellulaire, évitant ainsi le biais des mesures classiques d'abondance bactérienne basées sur la turbidité du milieu qui ne peuvent pas distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes.

Une forte ABA a été montrée dans le contenu de la spermathèque de la femelle avant l'accouplement. Cette activité est maintenue, bien qu'atténuée, le lendemain de l'accouplement. Une semaine après l'accouplement l'ABA chute drastiquement allant jusqu'à favoriser la croissance bactérienne. Deux et quatre semaines après l'accouplement l'ABA dans le contenu de la spermathèque des reines se stabilise à une valeur nulle. Chez les mâles vierges, le contenu des vésicules séminales ne montre aucune ABA, et favorisent même la croissance des bactéries. Les analyses des broyats de la tête-thorax montrent qu'il n'y a pas d'ABA chez les mâles ou femelles vierges, une forte augmentation de l'ABA le lendemain de l'accouplement chez les reines, suivie d'une forte diminution une semaine après l'accouplement et une ABA stabilisation à des valeurs nulles deux et quatre semaines après l'accouplement. Ces variations dans l'ABA suivent celles décrites lors de l'analyse de la proPO dans les broyats de la tête-thorax des reines de *L. niger*. L'accouplement déclenche une activation du système immunitaire, mais cette activité n'est pas maintenue dans le temps, probablement car elle est très coûteuse en énergie, et que la femelle alloue ces ressources à la ponte.

Chapitre 4. *Immune activation at the time of mating affects bacterial abundance and communities in a social Hymenoptera.* Article en préparation.

La présence de bactéries dans les organes reproducteurs mâles et femelles a été documentée dans une large gamme d'animaux dont les insectes (Knell et Webberley 2004 ; Otti 2015). Parmi ces bactéries, des pathogènes sont transmis lors de l'accouplement et peuvent détériorer la qualité et la survie des spermatozoïdes (Eley *et al.* 2005 ; Otti *et al.* 2013). Les activités immunitaires mises en avant lors des études précédentes (citer les refs, pour que l'on comprenne bien qu'il ne s'agit pas QUE de toi) montrent que l'accouplement active le système immunitaire (Baer *et al.* 2006 ; Castella *et al.* 2009), mais peu d'attention a été donnée à l'impact des activités antimicrobiennes sur les communautés de bactéries présentes naturellement dans les organes sexuels et non sexuels chez les fourmis.

A l'aide de la méthode ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analyses), nous avons distingué les différents phylotypes bactériens (ou OTU - 'Operational Taxonomic Units') présents dans les vésicules séminales et les glandes annexes des mâles vierges, ainsi que dans les spermathèques des gynés, et des reines 1 jour et 24 jours après l'accouplement. Nous avons alors compté le nombre total d'OTU et l'abondance bactérienne dans chaque tissu, et comparé l'occurrence de chaque OTU entre les tissus et au cours du temps afin de caractériser les communautés bactériennes. Nous avons également analysé

ces paramètres dans le broyat de la tête-thorax des mêmes individus afin de suivre les variations des communautés bactériennes dans le système général.

Nous avons montré que des bactéries sont bien présentes dans les organes génitaux mâles et femelles des fourmis et que leur abondance et structure varient avant et après l'accouplement. Conformément à l'activation du système immunitaire déclenchée par l'accouplement, l'abondance bactérienne et le nombre d'OTU chutent drastiquement chez les reines le lendemain de l'accouplement. De plus, les OTU détectés dans la spermathèque de ces reines sont totalement différents de ceux identifiés dans le même organe avant l'accouplement ou 24 jours après. Étonnamment, une forte abondance bactérienne a été trouvée dans la spermathèque des gynes (qui présente pourtant une forte ABA – voir Chapitre 3). Le faible nombre d'OTU présents dans cet organe laisse penser que ces bactéries ne sont pas ciblées par le système immunitaire des gynes. Une relativement grande abondance et diversité bactériennes ont été trouvées dans les vésicules séminales des mâles et dans la spermathèque des reines 24 jours après l'accouplement. Ceci suggère que ces bactéries ne sont pas nocives pour les spermatozoïdes, et forment plutôt une association à long terme avec le sperme plutôt qu'un parasitisme ou ponctuel. Finalement, l'abondance bactérienne et le nombre d'OTU présents dans le broyat de la tête-thorax des femelles suivent les variations des ABA autour de l'accouplement.

Références

- Adler MI, Cassidy EJ, Fricke C, Bonduriansky R. 2013. The lifespan-reproduction trade-off under dietary restriction is sex-specific and context-dependent. *Exp Gerontol.* 48: 539-548. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2013.03.007>
- Ahmed AM, Baggott SL, Maingon R, Hurd H. 2002. The costs of mounting an immune response are reflected in the reproductive fitness of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Oikos* 97:371–77
- Ahmed AM, Hurd H. 2006. Immune stimulation and malaria infection impose reproductive costs in *Anopheles gambiae* via follicular apoptosis. *Microbes Infect.* 8: 308-15
- Alcock J. 2005. *Animal behaviour: an evolutionary approach*. Sinauer. Sunderland - UK
- Allard D, Børgesen L, Van Hulle M, Bobbaers A, Billen J, Gobin B. 2006 Sperm transfer during mating in the pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis*. *Physiol Entomol.* 31: 294-298
- Anderson MK, Pant R, Miracle AL, Sun X, Luer CA, Walsh CJ, Telfer JC, Litman GW, Rothenberg EV. 2004. Evolutionary origins of lymphocytes: ensembles of T cell and B cell transcriptional regulators in a cartilaginous fish. *J Immunol.* 172: 5851-60
- Anselme C, Vallier A, Balmand S, Fauvarque MO, Heddi, A. 2006. Host *PGRP* gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl Environ Microbiol.* 72: 6766-6772.
- Armitage SAO, Boomsma JJ. 2010. The effects of age and social interactions on innate immunity in a leaf-cutting ant. *J Insect Physiol.* 56: 780-787
- Aron S, Lybaert P, Baudoux C, Vandervelden M, Fournier D. 2015. Sperm production characteristics vary with level of sperm competition in *Cataglyphis* desert ants. *Func Ecol.* 30: 614–624
- Avila FW, Sirot LK, LaFlamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF. 2011. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu Rev Entomol.* 56: 21-40
- Avise JC. 2008. *Clonality: the genetics, ecology, and evolution of sexual abstinence in vertebrate animals*. Oxford University Press. Princeton - USA
- Baer B, Krug A, Boomsma JJ, Hughes WHO. 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinatior* and the effect of infection. *Insect Soc.* 52:298–303
- Baer B, Armitage SAO, Boomsma JJ. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* 441: 872–75
- Baer B, Boomsma JJ. 2006. Mating biology of the leaf-cutting ants *Atta colombica* and *A. cephalotes*. *J Morphol.* 267: 1165-1171
- Baer B, Eubel H, Taylor NL, O'Toole N, Millar AH. 2009a. Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biol.* 10:R67
- Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, Eubel H, Millar AH. 2009b. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics.* 9:2085–97
- Baer B. 2011. The copulation biology of ants. *Myrmecol Nexs.* 24: 55-68
- Bakker TCM, Holmann M, Mehlis M, Zbinden M. 2014. Functional variation of sperm morphology in sticklebacks. *Behav Ecol Sociobiol.* 68: 617-627
- Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK. 2000. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res.* 61: 1026–1030
- Ballari S, Farji-Brener AG, Tadey M. 2007. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. *J. Insect Behav.* 20: 87–98.
- Bascuñán-García AP, Lara C, Córdoba-Aguilar A. 2010. Immune investment impairs growth, female reproduction and survival in the house cricket, *Acheta domestica*. *J Insect Physiol.* 56: 204–11
- Bashir-Tanoli S, Tinsley MC. 2014. Immune response costs are associated with changes in resource acquisition and not resource reallocation. *Funct Ecol.* 28: 1011–19
- Bell G. 1982. *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. Univ. of California Press. Berkeley USA
- Bernstein C, Bernstein H. 1991. *Ageing, sex and DNA repair*. Academic Press. San Diego - USA

- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*. 57: 1105-1122
- Boecking O, Spivak M. 1999. Behavioral defenses of honeybees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 30: 141-158
- Boman HG, Nilsson I, Rasmuson B. 1972. Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature*. 237: 232–235
- Boomsma JJ, Baer B, Heinze J. 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annu Rev Entomol*. 50: 395-420. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130416
- Boomsma JJ. 2009. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos T R Soc B*. 364: 3191-3207
- Bot ANM, Currie CR, Hart AG, Boomsma J. 2001. Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol Ecol Evol*. 13: 225-237
- Bourke AFG, Franks NR. 1995. *Social Evolution in Ants*. Princeton Univ Press. New York USA. 529 pp
- Brandt SM, Dionne MS, Khush RS, Pham LN, Vigdal TJ, Schneider DS. 2004. Secreted bacterial effectors and host-produced eiger/TNF drive death in a salmonella-infected fruit fly. *PLoS Biol*. 2: e418. 10.1371/journal.pbio.0020418.
- Bunning H, Rapkin J, Belcher L, Archer CR, Jensen K, Hunt J. 2015. Protein and carbohydrate intake influence sperm number and fertility in male cockroaches, but not sperm viability. *Proc R Soc Lond B*. 282: 2014-2144
- Castella G, Christie P, Chapuisat M. 2009. Mating triggers dynamic immune regulations in wood ant queens. *J. Evol. Biol*. 22:564–70
- Castella G, Christie P, Chapuisat M. 2010. Covariation between colony social structure and immune defences of workers in the ant *Formica selysi*. *Insect Soc*. 57:233-238
- Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol*. 29: 263-271. doi: 10.1016/j.it.2008.02.009
- Chapman KB, Wolfner MF. 1988. Determination of male-specific gene expression in *Drosophila* accessory glands. *Dev. Biol*. 126 :195-202
- Charlet M, Lagueux M, Reichhart JM, Hoffmann D, Braun A, Meister M, 1996. Cloning of the gene encoding the antibacterial peptide drosocin involved in *Drosophila* immunity. *Eur J Biochem*. 241: 699-706
- Cheng LW, Portnoy DA. 2003. *Drosophila* S2 cells: an alternative infection model for *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol*. 5: 875–885.
- Chérasse S, Baer B, Schiøtt M, Boomsma JJ. 2018. Differential immune gene expression in sperm storage organs of leaf-cutting ants. *J Exp Biol*. 221: jeb173435
- Christie P, Oppliger A, Bancala F, Castella G, Chapuisat M. 2003. Evidence for collective medication in ants. *Ecol Lett*. 6: 19-22
- Cockburn A. 1991. *An introduction to evolutionary ecology*. Blackwell Scientific. Oxford - UK
- Cohen IR. 2000. *Tending Adam's Garden: Evolving the Cognitive Immune Self*. Academic Press. London - UK
- Collins AM, Williams V, Evans JD. 2004. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol*. 13, 141–146
- Collins AM, Caperna TJ, Williams V, Garrett WM, Evans JD. 2006. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol*. 15: 541–49
- Cooper EL. 2016. Commentary: blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Front Microbiol*. 7: 358. doi:10.3389/fmicb.2016.00358
- Coulter G, Cook R, Kastelic J. 1997. Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. *J Anim Sci*. 75: 1048-1052.
- Crayton ME, Powell BC, Vision TJ, Giddings MC. 2006. Tracking the evolution of alternatively spliced exons within the Dscam family. *BMC Evol Biol* 6: 16
- Cremer S, Armitage SAO, Schmid-Hempel P. 2007. Social immunity. *Curr Biol*. 17: R693-R702. doi:10.1016/j.cub.2007.06.008

- Cremer S, Sixt M. 2009. Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Phil Trans R Soc B*. 364: 129–142. doi: 10.1098/rstb.2008.0166
- de Lamirande E, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*. 13: 368-378.
- Decanini DP, Wong BBM, Dowling DK. 2013 Context-dependent expression of sperm quality in the fruitfly. *Biol Lett*. 9: 20130736. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0736>
- den Boer SPA, Boomsma JJ, Baer B. 2008. Seminal fluid enhances sperm viability in the leafcutter ant *Atta colombica*. *Behav Ecol Sociobiol* 62: 1843-1849
- den Boer SPA, Baer B, Dreier S, Aron S, Nash DR, Boomsma JJ. 2009. Prudent sperm use by leafcutter ant queens. *Proc R Soc London B Biol Sci*. 276: 3945-3953.
- den Boer SPA, Baer B, Boomsma JJ. 2010. Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. *Science*. 327: 1506
- Dewsbury DA. 1982. Ejaculate cost and male choice. *Am Nat*. 119: 601-610
- Diez L, Lejeune P, Detrain C. 2014. Keep the nest clean: Survival advantages of corpse removal in ants. *Biol Letters*. 10 : 20140306. doi: 10.1098/rsbl.2014.0306)
- Dionne MS, Ghori N, Schneider DS. 2003. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for *Mycobacterium marinum*. *Infect Immun*. 71: 3540-3550.
- Domanitskaya EV, Liu H, Chen S, Kubli E. 2007. The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *FEBS J*. 274: 5659-5668
- Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G. 2006. AgDscam, a hypervariable immuno-globulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biol*. 4: e229. doi:10.1371/journal.pbio.0040229
- Du Pasquier L. 2005. Insects diversify one molecule to serve two systems. *Science* 309: 1826-1827. doi: 10.1126/science.1118828
- Duay P, De Jong D, Engels W. 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet Mol Res*. 1:227–232
- Dunn P. 1990. Humoral Immunity in Insects. *BioScience*. 40: 738-744. doi:10.2307/1311506
- Edward DA, Chapman T. 2011. Mechanisms underlying reproductive trade-offs: Costs of reproduction. In *Mechanisms of Life History Evolution: The Genetics and Physiology of Life History Traits and Trade-Offs*. eds Flatt T, Heyland A. Oxford – UK. Chapter 11. doi:10.1093/acprof:oso/9780199568765.001.0001
- Eleftherianos I, Marokhazi J, Millichap PJ, Hodgkinson AJ, Sriboonlert A, French-Constant RH, *et al*. 2006. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photobacterium luminescens*: roles of immune-related proteins shown by RNA interference. *Insect Biochem Mol Biol*. 36: 517–25. doi:10.1016/j.ibmb.2006.04.001
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. 2005. Apoptosis of ejaculated human sperm induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Human Reprod*. 20: 2601-2607
- Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*. 15: 645-656
- Fedina TY, Lewis SM. 2006. Proximal traits and mechanisms for biasing paternity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Behav Ecol Sociobiol*. 60: 844-853. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-006-0228-7>
- Fedorka KM, Zuk M, Mousseau T. 2004. Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket, *Allonemobius socius*. *Evolution* 58: 2478-2485
- Fedorka KM, Linder JE, Winterhalter W, Promislow D. 2007. Post-mating disparity between potential and realized immune response in *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci*. 274: 1211-1217
- Fellowes MDE, Kraaijeveld AR, Godfray HCJ. 1999. The relative fitness of *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) that have successfully defended themselves against the parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera, Braconidae). *J. Evol. Biol*. 12:123–28

- Ferdig MT, Beerntsen BT, Spray FJ, Li J, Christensen BM. 1993. Reproductive costs associated with resistance in a mosquito-filarial worm system. *Am J Trop Med Hyg.* 49: 756–62
- Ferrandon D, Joung AC, Criqui M, Lemaitre B, Uttenweiler-Joseph S, Michaut L, Reichart J, Hofmann JA. 1998. A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not on the *Toll* pathway. *EMBO J.* 17: 1217-1227
- Flajnik MF, Du Pasquier L. 2004. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends Immunol.* 25: 640-644. doi:10.1016/j.it.2004.10.001
- Fournier D, Aron S. 2007. Le sexe, si nécessaire. *Les dossiers de la recherche.* 27:20-25
- Futuyma DJ. 2005. *Evolution.* Sinauer Associates Inc. Sunderland - USA
- Gage et Cook. 1994. Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm Pproduction strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidea). *Funct Ecol.* 8: 594-599
- Gage MJ, Macfarlane CP, Yeates S, Ward RG, Searle JB, Parker GA. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr Biol* 14: 44–47
- Galdiero F, Gorga F, Bentivoglio C, Mancuso R, Galdiero E, Tufano MA. 1988. The action of LPS porins and peptidoglycan fragments on human spermatozoa. *Infection.* 16: 349–353.
- Garland T. 2014. Trade offs. *Curr Biol.* 4: R60-R61
- Gerloff CU, Ottmer BK, Schmid-Hempel P. 2003. Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect, *Bombus terrestris*. *Funct Ecol.* 17: 582–589
- Ghiselin MT. 1974. *The economy of nature and the evolution of sex.* University of California. Berkeley - USA. pp. 216
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol.* 42: 611-643
- Gobin B, Ito F, Billen J. 2003: The subepithelial gland in ants: a novel exocrine gland closely associated with the cuticle surface. *Acta Zoologica* 84: 285-291
- Gómez Montoto L, Magaña C, Tourmente M, Martín-Coello J, Crespo C, Luque-Larena JJ, Gomendio M, Roldan ERS. 2011. Sperm Competition, Sperm Numbers and Sperm Quality in Muroid Rodents. *PLoS ONE.* 6: e18173
- González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomo Exp Appl.* 142: 1-16. doi: 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x
- Graveley BR, Kaur A, Gunning D, Zipursky SL, Rowen L, Clemens JC. 2004. The organization and evolution of the dipteran and hymenopteran Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam) genes. *RNA* 10:1499-1506. 10.1261/rna.7105504
- Gustafsson L, Pärt T. 1990. Acceleration of senescence in the collared flycatcher *Ficedula albicollis* by reproductive costs. *Nature.* 347: 279-281
- Gwynn DM, Callaghan A, Gorham J, Walters KFA, Fellowes MDE. 2005. Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity, and survival in the pea aphid. *Proc R Soc B.* 272: 1803-1808
- Hart AG, Ratnieks FLW. 2002. Waste management in the leafcutting ant *Atta colombica*. *Behav. Ecol.* 13: 224–231
- Heinze J, Walter B. 2009. Moribound ants leave their nests to die in social isolation. *Curr Biol.* 20: 249-252
- Hoffmann JA, Reichhart JM. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3:121–126
- Hogg JC, Hurd H. 1995. *Plasmodium yoelii nigeriensis*: the effect of high and low intensity of infection upon the egg production and bloodmeal size of *Anopheles stephensi* during three gonotrophic cycles. *Parasitology* 111: 555–62
- Hölldobler B, Wilson EO. 2009. *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies.* WWNorton & Co. New York - USA. pp 544
- Holman L, Snook RR. 2008. A sterile sperm caste protects brother fertile sperm from female-mediated death in *Drosophila pseudoobscura*. *Curr Biol.* 18: 292-296. doi: 10.1016/j.cub.2008.01.048

- Holman L, Stürup M, Trontti K, Boomsma JJ. 2011. Random sperm use and genetic effects on worker caste fate in *Atta colombica* leaf-cutting ants. *Mol Ecol.* 20: 5092-5102. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05338.x
- Howick VM, Lazzaro BP. 2014. Genotype and diet shape resistance and tolerance across distinct phases of bacterial infection. *BMC Evol Biol.* 14: 56. doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.036
- Hughes WOH, Eilenberg J, Boomsma JJ. 2002. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc R Soc Lond B.* 269: 1811-1819. doi:10.1098/rspb.2002.2113
- Immler S, Pitnick S, Parker GA, Durrant KL, Lüpold S, Calhim S, Birkhead TR. 2011. Resolving variation in the reproductive tradeoff between sperm size and number. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108, 5325–5330. doi:10.1073/pnas.1009059108
- Innocenti P, Morrow EH. 2009. Immunogenic males: a genome-wide analysis of reproduction and the cost of mating in *Drosophila melanogaster* females. *J Evol Biol.* 22: 964-73
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. 2001. Immunobiology. The immune system in health and disease 5th edition. Garland Science. New York -USA
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology.* 211: 213-236
- Kadochová S, Frouz J. 2014. Termoregulation strategies in ants in comparison to other social insects, with a focus on red wood ants (*Formica rufa* group). *F1000Research.* 2: 280
- Kahrl AF, Cox RM. 2015. Diet affects ejaculate traits in a lizard with conditiondependent fertilization success. *Behav Ecol.* 26: 1502–1511. doi: http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv105
- Kasahara M, Suzuki T, Du Pasquier L. 2004. On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends immunol.* 25: 105-111. doi: 10.1016/j.it.2003.11.005
- Kelly CD. 2011. Reproductive and physiological costs of repeated immune challenges in female Wellington tree weta (Orthoptera: Anostostomatidae). *Biol J Linn Soc.* 104: 38-46
- King M, Eubel H, Millar AH, Baer B. 2010. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. *J Insect Physiol.* 57: 409–414
- Knell RJ, Webberley KM. 2004. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biol Rev.* 79:557–581
- Kondrashov A. 1998. Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336:435-441
- Kurtz J, Armitage SA. 2006. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol.* 27: 493-496. doi:10.1016/j.it.2006.09.001
- Kutter H, Stumper R, 1969. Hermann Appel, ein leidgeadelter Entomologe (1892–1966). *Proc. VIth Int. Congr. IUSI. Bern – Switzerland.* pp. 275–266
- Lawniczak MKN, Begun DJ. 2004. A genome-wide analysis of courting and mating responses in *Drosophila melanogaster* females. *Genome* 47: 900–910
- Lazzaro BP, Flores HA, Lorigan JG, Yourth CP. 2008. Genotype-by-environment interactions and adaptation to local temperature affect immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathog.*4:e100025
- Le Conte Y, Alaux C, Martin J-F, Harbo JR, Harris JW, Dantec C, Séverac D, Cros-Arteil S, Navajas M. 2011. Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behavior. *Insect Mol Biol.* 20:399-408
- Leclerc J-B, Detrain C. 2016. Ants detect but do not discriminate diseased workers within their nest. *Naturwissenschaften.* 103 :70. doi: 10.1007/s00114-016-1394-8
- Levitan DR. 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267: 531-534
- Lewis Z, Brakefield PM, Wedell N. 2010. Speed or sperm: A potential trade-off between development and reproduction in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Eur J Entomol.* 107: 55-59
- Loof AD. 2010. Longevity and aging in insects: Is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the "trade-off" concept. *J Insect Physiol.* 57: 1-11. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.018

- Lombardo MP, Thorpe PA, Power HW. 1999. The beneficial sexually transmitted microbe hypothesis of avian copulation. *Behav Ecol.* 10: 333–337.
- Louis GF, Lewis AJ, Weldon WC, Ermer PM, Miller PS, Kittok RJ, Struop WW. 1994. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics and plasma hormone concentrations. *J Anim Sci.* 72: 2051-2060
- Lung O, Kuo L, Wolfner MF. 2001. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J Insect Physiol.* 47: 617-622
- Lynch M, Bürger R, Butcher D, Gabriel W. 1993. The mutational meltdown in an asexual population. *J Hered.* 84: 339-344
- Mack PD, Kapelnikov A, Heifetz Y, Bender M. 2006. Mating-responsive genes in reproductive tissues of female *Drosophila melanogaster*. *PNAS.* 103: 10358-63
- Maynard-Smith J. 1978. The evolution of sex. Cambridge Univ. Press, Cambridge - UK. Infection pp 54
- McGraw LA, Fiumera AC, Ramakrishnan M, Madhavarapu S, Clark AG, Wolfner MF. 2007. Larval rearing environment affects several post-copulatory traits in *Drosophila melanogaster*. *Biol Lett.* 3: 607-610. doi: <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2007.0334>
- McGraw LA, Gibson G, Clark A, Wolfner MF. 2004. Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 14: 1509–1514
- McKean KA, Yourth CP, Lazzaro BP, Clark AG. 2008. The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. *BMC Evol. Biol.* 8:76–95
- McNamara KB, Van Lieshout E, Simmons LW. 2013. Females suffer a reduction in the viability of stored sperm following an immune challenge. *J. Evol. Biol.* 27:133–40
- Meister M, Lemaitre B, Hoffmann JA. 1997. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bio essays.* 19: 1019-1026
- Monsma SA, Wolfner MF. 1988. Structure and expression of a *Drosophila* male accessory gland gene whose product resembles a peptide pheromone precursor. *Genes Dev.* 2:1063-1073.
- Moore IT, Jessop TS. 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm Behav.* 43: 39–47
- Moore PJ, Harris WE, Montrose VT, Levin D, Moore AJ. 2004. Constraints on evolution and postcopulatory sexual selection: trade-offs among ejaculate characteristics. *Evolution* 58: 1773-1780. doi:10.1111/j.0014-3820.2004.tb00460.x
- Moore IT, Hopkins WA. 2009. Interactions and trade-offs among physiological determinants of performance and reproductive success. *Integr Comp Biol.* 49: 441-451
- Nystrand M, Dowling DK. 2014. Dose-dependent effects of an immune challenge at both ultimate and proximate levels in *Drosophila melanogaster*. *J Evol Biol.* 27: 876–88
- O’Dea, R.E., Jennions, M.D., Head, M.L., 2014. Male body size and condition affects sperm number and production rates in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *J Evol Biol.* 27: 2739-2744. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.12534>
- O’Donnell S, Beshers SN. 2004. The role of male disease susceptibility in the evolution of haplodiploid insect societies. *Proc R Soc Lond. B.* 271: 979–983
- Olsen J, Ramlau-Hansen CH. 2012. Dietary fats may impact semen quantity and quality. *Asian J Androl.* 14: 511–512. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2012.52>
- Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M. 1995. Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature.* 377: 334-336. doi: 10.1038/377334a0
- Otti O, Naylor R., Siva-Jothy MT, Reinhardt K. 2009. Bacteriolytic activity in the ejaculate of an insect. *Am Nat.* 174: 292-295
- Otti, O, McTighe AP, Reinhardt K. 2013. In vitro antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Funct Ecol.* 27: 219-226
- Otti O. 2015. Genitalia-associated microbes in insects. *Insect Science.* 22: 325-339. doi: 10.1111/1744-7917.12183
- Pancer Z, Amemiya CT, Ehrhardt GRA, Ceitlin J, Gartland GL, Cooper MD. 2004. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature.* 430: 174–180

- Pardini RS. 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Arch Insect Biochem Physiol* 29: 101-118.
- Parker GA. 1993. Sperm competition games: sperm size and number under adult control. *Proc. R. Soc. B.* 253: 245-254
- Parker GA, Pizzari T. 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biol. Rev.* 85: 897–934
- Partridge L, Gems D, Withers DJ. 2005. Sex end death: what is the connection? *Cell*, Vol. 120: 461-472
- Passera, L, Aron S. 2005. *Les Fourmis : Comportement, Organisation Sociale et Évolution*. Les Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, Canada.
- Paynter E, Baer-Imhoof B, Linden M, Lee-Pullen T, Heel K, Rigby P, Baer B. 2014. Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry A.* 85: 463–472. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto. a.22462>.
- Paynter E, Millar AH, Welch M, Baer-Imhoof B, Cao D, Baer B. 2017. Insights into the molecular basis of long-term storage and survival of sperm in the honeybee (*Apis mellifera*). *Sci Rep-UK.* 7: 40236. doi:10.1038/srep40236
- Pearcy M, Delescaille N, Lybaert P, Aron S. 2014. Team swimming in ant spermatozoa. *Biol Lett.* 10: 20140308
- Pech-May F, Medina-Medina L, May-Itzá W de J, Paxton RJ, Quezada-Euán JJG. 2012. Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insect Soc.* 59: 417-424. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-012-0236-8>.
- Peng J, Zipperlen P, Kubli E. 2005. *Drosophila* Sex-peptide stimulates female innate immune system after mating via the Toll and Imd pathways. *Curr Biol.* 15: 1690–94
- Peng Y, Grassl J, Millar AH, Baer B. 2016. Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proc R Soc B-Biol. Sci* 283: 20151785.
- Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog.* 3: e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0030026
- Pizzari T, Parker GA. 2009. Sperm competition and sperm phenotype. In *Sperm Biology: an Evolutionary Approach*. Eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S. Academic Press. London – UK. pp 207–245
- Polak M. 1996. Ectoparasite effects on host survival and reproduction: the *Drosophila*-*Macrocheles* association. *Ecology* 77: 1379-89
- Raina A, Murphy C, Florane C, Williams K, Park YI, Ingber B. 2009. Structure of spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in *Formosan* subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am.* 100: 418-424
- Ratcliffe NA, Rowley AF. 1979. Role of hemocytes in defense against biological agents. In A. P. Gupta. ed. *Insect Hemocytes*. Cambridge University Press. Cambridge - UK pp331-414
- Reber A, Chapuisat M. 2012. No evidence for immune priming in ants exposed to a fungal pathogen. *PLoS One.* 7: e35372. doi:10.1371/journal. pone.0035372
- Reinhardt K, Naylor R, Siva-Jothy MT. 2005. Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect. *Ecol Entom.* 30: 607-611
- Reznick D. 1985. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos.* 44: 257-267. doi: 10.2307/3544698
- Reznick DN, Ruse M. 2011. The « origin » then and now : an interpretative guide to the « origin of species ». Princeton University Press, United States of America, 448 p.
- Ribou, A. C. & Reinhardt, K. 2012 Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proc. R. Soc. B.* 279: 2196-2203. doi: 10.1098/rspb.2011.2422
- Ricci I, Damiani C, Scuppa P, Mosca M, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Capone A, Gonella E, Ballarini P, Chouaia B, Sagnon N, Esposito F, Alma A, Mandrioli M, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G. 2011. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Environ Microbiol.* 13: 911-921.

- Rimer J, Cohen IR, Friedman N. 2014. Do all creatures possess an acquired immune system of some sort? *Bioessays*. 36: 273-281. doi:10.1002/bies.201300124
- Rizzi A, Crotti E, Borruso L, Jucker C, Lupi D, Colombo M, Daffonchio D. 2013. Characterization of the bacterial community associated with larvae and adults of *Anoplophora chinensis* collected in Italy by culture and culture-independent methods. *BioMed Res Int*. 2013: 42087
- Rolff J, Siva-Jothy MT. 2002. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *PNAS*. 99:9916-18
- Rolff J, Siva-Jothy MT. 2003. Invertebrate ecological immunology. *Science*. 301: 472-475
- Roff DA, Fairbairn DJ. 2007. The evolution of trade-offs: where are we? *J Evolution Biol*. 20: 33-447. 10.1111/j.1420-9101.2006.01255.x
- Rosengaus RB, Maxmen AB, Coates LE, Traniello JFA. 1998 Disease resistance: a benefit of sociality in the dampwood termite *Zootermopsis angusticollis* (Isoptera: Termopsidae). *Behav Ecol Sociobiol*. 44: 125-134. doi:10.1007/s002650050523
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol*. 103: 96-119.
- Ryu JH, Nam KB, Oh CT, Nam HJ, Kim SH, Yoon JH, Jang IH, Brey PT, Lee WJ. 2004. The homeobox gene *Caudal* regulates constitutive local expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* epithelia. *Mol Cell Biol*. 24: 172-185
- Samakovlis C, Kylsten P, Kimbrell DA, Engstrom A, Hultmark D. 1991. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*. 10: 163-169
- Schlüns H, Schlüns EA, van Praagh J, Moritz RFA. 2003. Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera* L.) depend on body size. *Apidologie* 34: 577-584
- Schlüns H, Crozier YC, Crozier RH. 2008: Sequence evolution of immune genes in bulldog ants (Myrmeciinae). – Proceedings of the 4th European meeting of the International Union for the Study of Social Insects, La-Roche-en-Ardenne, Belgium, p. 65.
- Schlüns H, Crozier RH. 2009. Molecular and chemical immune defenses in ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol news*. 12: 237-249
- Schmid-Hempel P. 2003. Variation in immune defense as a question of evolutionary ecology. *Proc R Soc Lond Sci Ser B*. 270: 357-366
- Schmid-Hempel P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune system defenses. *Annu Rev Entomol*. 50: 529-51. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130420
- Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF. 2016. Reproduction-Immunity Trade-Offs in Insects. *Annu Rev Entomol*. 61:239-56
- Sheldon BC, Verhulst S. 1996. Ecological immunology: costly parasite defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*. 1: 317-321.
- Shoemaker KL, Parsons NM, Adamo SA. 2006. Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Anim. Behav*. 71:371-80
- Short SM, Lazzaro BP. 2010. Female and male genetic contributions to post-mating immune defense in female *Drosophila melanogaster*. *Proc Biol Sci*. 277: 3649-57
- Short SM, Wolfner MF, Lazzaro BP. 2012. Female *Drosophila melanogaster* suffer reduced defense against infection due to seminal fluid components. *J Insect Physiol*. 58: 1192-201
- Silbermann R, Tatar M. 2000. Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 54: 2038-45.
- Simmons LW. 2001. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press. Princeton - USA
- Simmons LW, Roberts B. 2005. Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science*. 309: 2031
- Siva-Jothy MT, Yoshitaka T, Hooper R. 1998. Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiol Entomol*. 23: 274-77
- Siva-Jothy M, Moret Y, Rolff J. 2005: Insect immunity: an evolutionary ecology perspective. *Adv Insect Physiol*. 32: 1-48.
- Smith CD *et al.* 2011a. Draft genome of the globally widespread and invasive Argentine ant (*Linepithema humile*) *PNAS* 108 :5673-5678

- Smith CR *et al.* 2011b: Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. PNAS. 108: 5667-5672. doi: 10.1073/pnas.1007901108
- Snook RR. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. Trends Ecol Evol. 20: 46-53.
- Spoel SH, Dong X. 2012. How do plants achieve immunity? Defense without specialized immune cells. Nat Rev Immunol 12: 89–100.
- Stahlschmidt ZR, Rollinson N, Acker M, Adamo SA. 2013. Are all eggs created equal? Food availability and the fitness trade-off between reproduction and immunity. Funct. Ecol. 27: 800–806
- Starks PT, Blackie CA, Seeley TD. 2000. Fever in honeybee colonies. Naturwissenschaften. 87: 229–231
- Stearns SC. 1989. Trade-Offs in Life-History Evolution. Functional Ecology. 3:259-268. doi:10.2307/2389364
- Stearns SC. 2000. Life history evolution: successes, limitations, and prospects. Naturwissenschaften 87: 476-486
- Stevens CE, Hume ID. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiol Rev. 78: 393–427.
- Stockley P, Gage MJG, Parker GA, Moller AP. 1997. Sperm competition in fishes : the evolution of testis size and ejaculate characteristics. Am Nat. 5: 933-954
- Stürup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. Behav Ecol. 24: 1192-1198. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/art049>
- Stürup M, Boomsma JJ. 2014. Short independent lives and selection for maximal sperm survival make investment in immune defences unprofitable for leaf-cutting ant males. Behav Ecol Sociobiol. 68:947-955. doi: 10.1007/s00265-014-1707-x
- Suen G, *et al.* 2011. The genome sequence of the leaf-cutter ant *Atta cephalotes* reveals insights into its obligate symbiotic lifestyle. PLoS Genet. 7: e1002007
- Taguchi S, Bulet P, Hoffmann JA. 1998: A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. Biochimie 80: 343-346.
- Turillazzi S, Perito B, Pazzagli L. 2004. Antibacterial activity of larval saliva of the European paper wasp *Polistes dominulus* (Hymenoptera, Vespidae). Insect Soc. 51:339
- Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, Hoffmann JA, Imler JL. 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia. Immunity 13:737–748.
- Ugelvig LV, Cremer S. 2007 Social prophylaxis: group interaction promotes collective immunity in ant colonies. Curr. Biol. 17: 1967-1971. doi:10.1016/j.cub.2007.10.029
- Vainio L, Hakkarainen H, Rantala MJ, Sorvari J. 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. Evol Ecol. 18:75–84
- Valtonen TM, Viitaniemi H, Rantala MJ. 2010. Copulation enhances resistance against an entomopathogenic fungus in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. Parasitology 137: 985–89
- Vieira-Neto EHM, Mundim FM, Vasconcelos HL. 2006. Hitchhiking behaviour in leaf-cutting ants: an experimental evaluation of three hypotheses. Insect Soc. 53: 326-332
- Viljakainen L. 2008: Evolutionary genetics of immunity and infection in social insects. – PhD thesis, University of Oulu. Oulu - Finland, 50 pp.
- Waddington SJ, Hughes WOH. 2010. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator*: the role of worker size, age and plasticity. Behav Ecol Sociobiol. 64: 1219–1228
- Walker TN, Hughes WHO. 2009. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. Biol Lett. 5: 446-448. doi: 10.1098/rsbl.2009.0107
- Watson F, Püttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, Rebel VI, Schmucker D. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily in the immune system of insects. Science. 309: 1874-1878. doi:10.1126/science.1116887
- Wegener J, Zschörnig K, Onischke K, Fuchs B, Schiller J, Müller K. 2013. Conservation of honey bee (*Apis mellifera*) sperm phospholipids during storage in the bee queen—A TLC/MALDI–TOF MS Study. Exp Gerontol. 48: 213–222.

- Weirich GF, Collins AM, Williams VP. 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 33: 3–14.
- Wheeler DE. 1986. Developmental and physiological determinants of caste in social Hymenoptera: evolutionary implications. *The American Naturalist*. 128:13-34. doi:<https://doi.org/10.1086/284536>
- Wheeler WM. 1911. The ant-colony as an organism. *J Morphol*. 22: 307-325
- Wilson, E.O., 1971. *The insect societies*. Harvard University Press, Cambridge - USA. 548 pp.
- Wojtowicz WM, Flanagan JJ, Millard SS, Zipursky SL, Clemens JC. 2004. Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell*. 118: 619
- Yanagawa A, Yokohari F, Shimizu S. 2008 Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. *J Invertebr Pathol*. 97: 165-170. doi:10.1016/j.jip.2007.09.005
- Zareie R, Eubel H, Millar AH, Baer B. 2013. Long-term survival of high quality sperm: insights into the sperm proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Proteome Res*. 12: 5180-5188
- Zerofsky M, Harel E, Silverman N, Tatar M. 2005. Aging of the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 4:103–8
- Zuk M, Stoehr AM. 2002. Immune defense and host life history. *Am Nat*, 160: S9–S22

Chapitre 1.

*Protein restriction affects sperm number
but not sperm viability in male ants.*

Dávila et Aron. 2017. *Journal of Insect Physiology* 100: 71-76.



Protein restriction affects sperm number but not sperm viability in male ants



Francisco Dávila*, Serge Aron

Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, Avenue F.D. Roosevelt 50, CP160/12, 1050 Brussels, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

Sperm production
Sperm viability
Diet
Ant

ABSTRACT

Sperm cells are costly to produce; diet should therefore affect sperm number and/or viability. In non-social insects and vertebrates, there is compelling evidence that diet influences sperm production. Less is known about this relationship in eusocial hymenopterans (all ants and some bees and wasps), whose mating systems impose unique selective pressures on sperm production. Males face physiological constraints: they acquire all of the resources they will use in future reproductive efforts as larvae and emerge from the pupal stage with a fixed, non-renewable amount of sperm. Furthermore, males die shortly after copulation, but their genetic material persists for years since their spermatozoa are stored in their mates' spermathecae. We examined the effects of protein restriction during larval development on sperm number and viability in the Argentine ant *Linepithema humile*. We also looked at its impact on male development, adult mass, and adult fluctuating asymmetry. We found that protein restriction during larval development significantly reduced sperm production, but not sperm viability. It did not affect the number of males reared, male mass, or male asymmetry. However, males from protein-restricted nests developed much more slowly than males from protein-supplemented nests. These results suggest investing in sperm quality and in somatic growth, which enhances a male's ability to disperse and find a mate, are critical to successful male reproduction.

1. Introduction

The production of sperm cells is energetically costly (Dewsbury, 1982; Reznick, 1985; Simmons, 2001; Parker and Pizzari, 2010). In several species, there is an energetic trade-off between sperm production and other physiological functions, namely growth (Olsson et al., 1997; Sella and Lorenzi, 2003), reproduction (Simmons et al., 2010), immunity (Simmons and Roberts, 2005; Skau and Folstad, 2005; Simmons, 2011; Radhakrishnan and Fedorka, 2012; Stürup et al., 2014; Schwenke et al., 2016), and survival (Van Voorhies, 1992). A number of studies have also found evidence of trade-offs among sperm traits, including between sperm size and number (Parker, 1970; Pitnick, 1996; Stockley et al., 1997; Oppliger et al., 1998; Tourmente et al., 2009; Immler et al., 2011) and between sperm size and viability (Stockley et al., 1997; Levitan, 2000; Bakker et al., 2014). Such trade-offs exist even though sperm competition can result in selection that works to simultaneously maximize sperm size, number, and morphology (Fitzpatrick et al., 2009; Gómez Montoto et al., 2011; Rowe and Pruett-Jones, 2009; Decanini et al., 2013; Tourmente et al., 2015).

Given that males have a finite amount of energy and nutrients to dedicate to sperm production, dietary quality should affect sperm number and/or viability. When males experience dietary restrictions, sperm number declines; this pattern has been documented in both

invertebrates (Gage and Cook, 1994; Fedina and Lewis, 2006; McGraw et al., 2007; Bunning et al., 2015) and vertebrates (Louis et al., 1994; Coulter et al., 1997; O'Dea et al., 2014; Kahrl and Cox, 2015), including humans (Olsen and Ramlau-Hansen, 2012).

Eusocial hymenopterans provide an interesting model system with which to study the effects of diet on sperm traits. First, in this group, males have usually completed spermatogenesis by the time they reach adulthood (Hölldobler and Wilson, 1990). They acquire all the resources they will use in future reproductive efforts as larvae and emerge from the pupal stage with a fixed, non-renewable amount of sperm. They cannot later increase their supplies because their testes degenerate before or shortly after eclosion. Thus, the energy available for sperm production is determined by a larva's diet, and the number of sperm stored in the accessory testes at eclosion reflects the total investment in sperm production. Second, the reproductive systems of ants, bees, and wasps impose unique selective pressures on sperm production. Both sexes typically mate during a short window of time at the beginning of their adult lives. Queens store a lifetime's supply of sperm in their spermathecae and use it to fertilize their eggs, sometimes for decades. Fertilization therefore goes on long after insemination has occurred. Consequently, although males die shortly after copulation, their genetic material persists *post mortem* for years. Therefore, males are under strong selective pressure to maximize sperm quantity and

* Corresponding author.

E-mail address: jdavilag@ulb.ac.be (F. Dávila).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.05.012>

Received 28 February 2017; Received in revised form 24 May 2017; Accepted 26 May 2017

Available online 27 May 2017

0022-1910/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

quality, since it directly influences the lifetime reproductive success of the partners (Baer, 2003, 2011; Boomsma et al., 2005).

Surprisingly, the effect of resource availability on sperm number and viability remains poorly studied in social Hymenoptera, and the available data are ambiguous. In the stingless bee *Melipona beecheii*, males reared in pollen-deficient colonies were significantly smaller and produced fewer spermatozoa than did males reared in pollen-supplemented colonies (Pech-May et al., 2012). In the honeybee *Apis mellifera*, in contrast, pollen restriction during development or adulthood did not have a significant effect on sperm number or viability (Stürup et al., 2013; Czekonska et al., 2015). Similarly, dietary restrictions at adulthood did not affect sperm number in the neotropical ant *Ectatomma ruidum* (Shik et al., 2012).

Here, we investigated the effects of protein restriction during larval development on sperm number and viability in the Argentine ant *Linepithema humile*. In this species, males are the dispersing sex: they fly away from the natal nest within a few days after eclosion and enter neighboring colonies to mate with virgin females (Markin, 1970; Keller and Passera, 1992, 1993; Passera and Keller, 1992). Males and queens mate only once (Krieger and Keller, 2000), which relaxes the potential selective pressure exerted by sperm competition on sperm traits. Consequently, males should be expected to allocate resources towards traits that maximize the chances of insemination, namely finding a mate and fertilizing all her eggs. We compared the number and viability of spermatozoa stored in the accessory testes at the time of eclosion for males reared in protein-restricted versus protein-supplemented nests. Given that sperm number (and possibly viability) might be correlated with male size, we examined how protein availability affected male mass, number, and development time within nests. Finally, because environmental stress during growth can result in developmental instability (Palmer and Strobeck, 1986; Parsons, 1994), we assessed the effect of protein availability on fluctuating asymmetry (FA), which is the difference in size between the right and left sides of bilaterally symmetrical organisms (Van Valen, 1962).

2. Material and methods

2.1. Field sampling and laboratory rearing

Large numbers of *L. humile* were collected in Giens (southern France) in early March 2015. In French populations of *L. humile*, queens stop laying eggs in the winter. Males develop from overwintering brood (i.e., eggs laid by queens in late fall) and the very first eggs produced by queens after hibernation (Benois, 1973; Passera et al., 1988). Colonies were collected before queens had resumed egg laying. From these, we established 50 experimental nests, each consisting of 30 queens, 3000 workers, and no brood. They were maintained under standard laboratory conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, 12:12 light:dark cycle, $\sim 40\%$ humidity) and given sugar water and mealworms *ad libitum*. After three weeks, queens were removed from the experimental nests to trigger the rearing of reproductives from eggs laid by the queens (Keller et al., 1989). Therefore, at this point in time, the brood consisted exclusively of eggs. The nests were then randomly assigned to one of two dietary treatments. Twenty-five nests were in the protein-restriction treatment and were given only sugar water (1 M sucrose). The other 25 nests were in the protein-supplementation treatment and were given sugar water plus 0.5 g of protein (ground mealworms mixed with sunflower oil) five days/week. The nests were monitored each day for six weeks, and the numbers of males produced were counted. Following eclosion, males were weighed and set aside (with a group of workers) to ensure they reached full sexual maturity without copulating. In *L. humile*, spermatogenesis is complete one to three days after eclosion, and males are able to mate quite quickly (Passera and Keller, 1992). The males were dissected to determine sperm number and viability; their heads and thoraces were stored in ethanol (90%) for quantification of the FA (see below).

2.2. Sperm number and viability

The number of spermatozoa stored in the accessory testes as well as sperm viability (i.e., the percentage of total sperm cells that were alive) were determined using flow cytometry (FCM), in accordance with the method described in Paynter et al. (2014). FCM is rapid and accurate; it saves time and effort and, more importantly, reduces the potential photobleaching that occurs with conventional microscopy (Paynter et al., 2014).

Males were placed in semen diluent (50 nM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 188.3 mM NaCl, and 5.6 mM glucose; pH 8.7) and dissected under a Leica MZ6 stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). All the males sampled had degenerated testes, and their accessory testes were filled with spermatozoa ready to be ejaculated, an indication that the ants were fully mature. For each male, both accessory testes were transferred to a drop of semen diluent. The testes were then punctured and carefully squeezed; the released semen was transferred to a vial, and semen diluent was added to bring the final volume of the suspension to 800 μl . Sperm cells were stained using the Live/Dead Sperm Viability Kit (Life Technologies, California, USA); SYBR 14 labels live sperm with green fluorescence, while propidium iodide (PI) dyes membrane-compromised or dead sperm with red fluorescence. We proceeded as follows: first, 100 μl of 1 μM SYBR 14 dye was added to the semen suspension, and the resulting mixture was incubated in the dark at room temperature for 15 min; second, 100 μl of 120 μM PI was also added, and the modified mixture was incubated for another 15 min under the same conditions. The final suspension was gently mixed, filtered through a nylon filter with a 30 μm mesh diameter, which allowed sperm to pass through while removing any remaining tissue of larger size, and transferred to a 3.5 ml Sysmex Partec FCM tube. The concentration of sperm cells and their viability were estimated using a CyFlow Counter cytometer (Sysmex Partec, Germany), employing the same parameter values as Paynter et al. (2014). Briefly, events were triggered by forward scatter and side scatter. Both the SYBR 14 and PI in the solution were excited by a 488 nm blue solid state 50 mW laser. SYBR 14 fluorescent emissions were collected at 530 nm (bandpass FITC filter), whereas PI fluorescent emissions were collected at 630 nm (PE-TR-Tandem filter); there was no compensation for spectral overlap. We recorded the height of the resulting spectra. Data were analyzed with using *FloMax Software*® (v. 2.9; Quantum Analysis GmbH).

2.3. Fluctuating asymmetry

To quantify the effects of protein restriction during larval development on FA, we measured 17 morphological characters for each male ($n = 30$): scape length, antenna length, coxa + trochanter length, femur length, tibia length, basitarsus length, and tarsus length for the forelegs, midlegs, and hind legs. The antennae and legs were mounted on slides using Euparal. They were photographed using light microscopy at 50x magnification (MZ6 stereomicroscope; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), and the length of each character was measured to the nearest 0.01 mm using IMAGEJ software (v. 1.8; NIH, Bethesda, MD, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>). Each character was measured twice, and at least 24 h was allowed to elapse between the two measurements (Palmer, 1994). There was a strong correlation between the first and second measurements (Spearman correlation test: $r_s = 0.995$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$), indicating that measurement error was very low and could be ignored. For each character, we measured the difference in length between the right and left sides ($R_L - L_L$) and compared this difference for males from protein-restricted versus protein-supplemented nests (Palmer and Strobeck, 1986; Keller and Passera, 1993). There was no association between a character's mean value $((R_i + L_i)/2)$ and its estimated asymmetry $(|R_i - L_i|)$ (Spearman correlation test: $P > 0.05$ for all characters).

2.4. Statistics

To test for treatment effects on sperm number and viability, we used nested ANOVAs where sperm number or viability was the dependent variable, colony was a random effect and dietary treatment was a fixed effect. Males were considered to be replicates within colonies, and the different colonies were replicates within treatments. When appropriate, Box-Cox transformations were applied to achieve normality. Treatment-based differences in the number of males reared and male body mass were tested for significance using a Wilcoxon-Mann-Whitney test and a Student's *t*-test, respectively, after checking the assumption of normality using a Shapiro-Wilk test. A Cox proportional hazards regression analysis was used to compare the number of males produced over time between treatments. All statistical analyses were conducted using R (v. 3.2.1; R Development Core Team 2013). Means \pm SD are given.

3. Results

Forty-three of the experimental nests produced adult males. The treatments affected neither the number of males reared (Wilcoxon-Mann-Whitney test: $W = 673.5$, $P = 0.698$) nor male mass (Student *t*-test: $t = -0.069$, $df = 41$, $P = 0.945$) (Table 1). However, males from protein-restricted nests grew more slowly and reached adulthood later than those from protein-supplemented nests (Cox proportional regression: Wald statistics: 65.08; 95% CI: 3.84–9.10, $P = 6.7 \times 10^{-16}$; Fig. 1): it took 46 days for all males to reach maturity in the former, but 34 days to do so in the latter.

Protein availability during development significantly influenced sperm number (nested ANOVA: $F = 34.618$, $P = 5.43 \times 10^{-7}$; treatment \times colony interaction: $F = 0.638$, $P = 0.429$) (Fig. 2a). On average, males from protein-restricted nests produced 1.7-fold fewer sperm than males from protein-supplemented nests (Table 1). In contrast, sperm viability did not differ between treatments (nested ANOVA: $F = 1.407$, $P = 0.246$; treatment \times colony interaction: $F = 0.038$, $P = 0.847$) (Fig. 2b).

None of the 17 characters studied showed a significant treatment-related difference in FA (Wilcoxon-Mann-Whitney test, $65.5 \leq W \leq 144$, $n = 30$, all $P > 0.05$), indicating that protein restriction had a weak effect on asymmetry of bilateral traits, if any at all.

4. Discussion

Our study shows that protein restriction during larval development significantly reduces sperm number, but not sperm viability, in the Argentine ant *Linepithema humile*. This suggests that, in this species, sperm viability may play a more important role than sperm number in male fertility. These results contrast with those reported for the honeybee (*Apis mellifera*), where pollen restriction during development

has no effect on sperm number or viability in adult males (Czekonska et al., 2015). Such a discrepancy might stem from phylogenetic differences, or from disparities in the intensity of post-copulatory sexual selection. Honeybee queens mate with 12 males on average, although this number can exceed 40 (Tarpay and Nielsen, 2002). Consequently, ejaculates from multiple males may co-occur in the female's reproductive tract and sperm may compete to reach the queen's spermatheca. Recent work has indeed shown that proteins in the seminal fluid, which are produced by the males' accessory glands, reduce the survival of rival male sperm in the female genital tract (den Boer et al., 2010, 2015). Sperm competition is expected to generate intense directional selection on sperm traits that enhance fertilization success, such as sperm number and viability (Simmons, 2001; Birkhead et al., 2009). However, to date, only a few studies have explored the relationship between sperm number and viability. They show that the two can be uncorrelated (cockroaches: Moore et al., 2004) or positively associated (*Drosophila*: Holman and Snook, 2008; Decanini et al., 2013; rodents: Gómez Montoto et al., 2011), suggesting that post-copulatory sexual selection does not underlie trade-offs between sperm number and quality in polyandrous species. In contrast, in monandrous species, selection is relaxed on competition-related sperm traits, such as sperm number (Simmons, 2001; Parker and Pizzari, 2010). Indeed, in ants, there is evidence that the level of sperm production covaries with the level of sperm competition (Baer and Boomsma, 2004; Aron et al., 2016). In our study species, the ant *L. humile*, males and females mate only once and the number of sperm cells transferred is largely sufficient to ensure the fertilization of all the eggs laid during a queen's lifetime (see Table 1) (Keller and Passera, 1992; Cournauld and Aron, 2008). In support of this argument, queens of the Argentine ant store as many sperm cells as present in one male's entire ejaculate (Keller and Passera, 1992), they are short lived (lifetime expectancy of about 1 year; Keller et al., 1989), and die fully fertile while still harbouring large amounts of sperm in their spermatheca (Keller et al., 1989; L. Passera, pers. comm.). Therefore, sperm limitation does not constrain lifetime reproductive success in this species. It would appear that the percentage of live, fertilization-competent sperm transferred to queens is a key element of fitness for both sexual partners. There is thus strong selective pressure on males to produce a high percentage of viable sperm.

Our results are consistent with those of other studies showing that sperm production is positively associated with protein intake in mammals (Ng et al., 2004; Cheah and Yang, 2011), as well as in both social (Pech-May et al., 2012) and non-social insects (Gage and Cook, 1994; McGraw et al., 2007; Bunning et al., 2015; but see Cook and Wedell, 2006 or Lewis and Wedell, 2007 for evidence that diet does not affect sperm production in butterflies). Studies in mammals showed that amino acids like arginine or L-carnitine contribute to spermatogenesis, sperm maturation and motility (Ng et al., 2004; Wu et al., 2009). In a meticulous study of the effects of diet on sperm production in the speckled cockroach *Nauphoeta cinerea*, Bunning et al. (2015) demonstrated that protein and carbohydrate intake influenced sperm number, but not sperm viability. Sperm number was closely associated with the number of offspring produced by the mating partner and was maximized at a protein-to-carbohydrate ratio of 1:2. The effect of this nutritional ratio on sperm production in social Hymenoptera remains unknown. As in many ants, *L. humile* raises aphids and scale insects, whose honeydew can account for more than half of the ants' diet (Lester et al., 2003; Shik and Silverman, 2013; Shik et al., 2014). Carbohydrates are a nutritional requirement for larvae. We conducted a preliminary study in which we found that colonies fed a no-sugar diet (i.e., consisting of just water and homogenized mealworms) failed to produce any adults from their brood (Dávila, unpublished data). Similarly, larvae of the green-head ant *Rhytidoponera metallica* die within 2–3 weeks when colonies are fed a carbohydrate-poor diet (Dussutour and Simpson, 2009). More recently, it has been shown in the fire ant *Solenopsis invicta* that access to carbohydrates resulted in colonies producing higher numbers of workers and larger workers

Table 1

Total number of males reared, and mean \pm SD of the number of males produced, male mass, fluctuating asymmetry, sperm number and sperm viability, for protein-restricted versus protein-supplemented nests of the Argentine ant *Linepithema humile*.

	Protein-restricted nests (n = 20)	Protein-supplemented nests (n = 23)
Total number of males reared	76	81
Number of males produced per nest	3.8 \pm 1.7	3.5 \pm 1.5
Male mass (mg)	1.3 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1
Fluctuating asymmetry (mm)	0.022 \pm 0.025	0.028 \pm 0.029
Sperm number	381328 \pm 157388.9	674675 \pm 179727.4
Sperm viability (%)	90.1 \pm 5.4	88.7 \pm 4.1

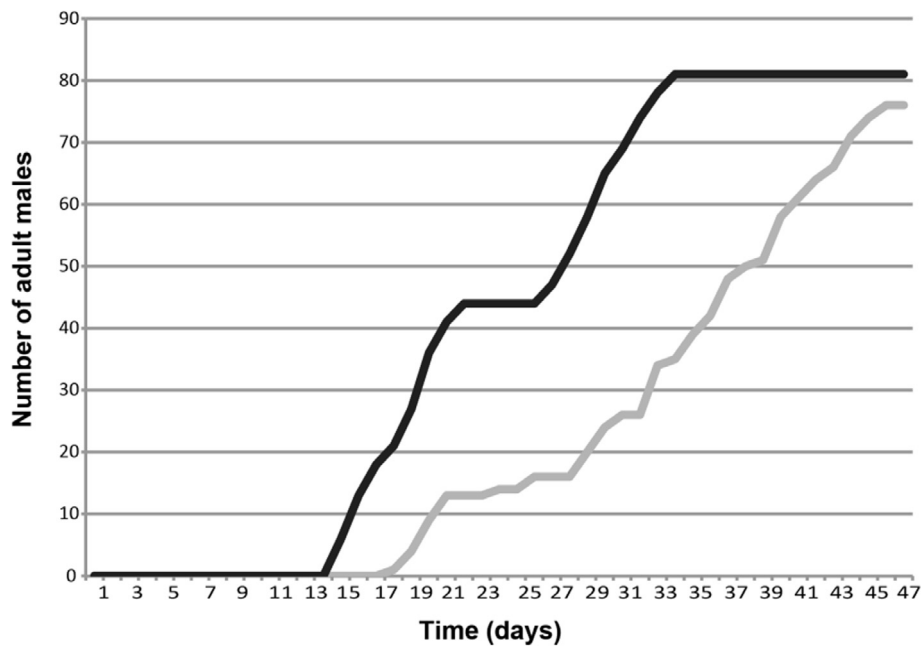


Fig. 1. Cumulated number of adult males produced across all colonies in protein-restricted (gray) and protein-supplemented (black) nests of the Argentine ant *Linepithema humile* over time.

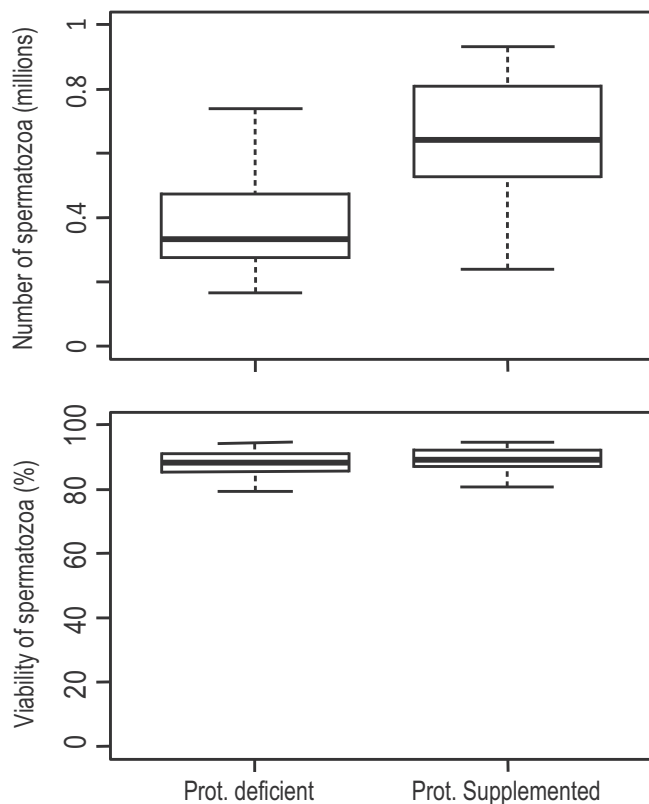


Fig. 2. (a) Sperm number and (b) sperm viability (percentage of total sperm cells that were alive) produced by males reared in protein-restricted versus protein-supplemented nests of the Argentine ant (number of males: $n = 76$ and $n = 81$, respectively). The median is marked by a horizontal line. The lower and upper ends of each box represent the 25% and 75% quartiles of the data, respectively, and the whiskers show the entire range of the data.

(Wills et al., 2015).

Interestingly, we found there was no difference in the number of males produced or in the male mass between protein-restricted and protein-supplemented nests. Male larvae reared in protein-restricted

nests took longer to develop but reached the same mass at maturity as males reared in protein-supplemented nests. The lack of detectable male phenotypic differences between diet treatments might stem from workers having a buffering effect on the nutritional conditions. Indeed, food shortage has been shown to trigger cannibalism of siblings in ants and other social insects (Hölldobler and Wilson, 1990; Crespi, 1992). Cannibalism by workers permits tailoring of reproductive efforts of the colony to resource availability or other environmental conditions (Chapuisat et al., 1997; Wharton et al., 2008). In the Argentine ant, it has been shown that workers discriminate between sex, caste and age of the brood and selectively eliminate larvae according to social environment (Aron et al., 1994; Passera and Aron, 1996). In the protein-restriction treatment, nurse workers could have consumed developing worker or female larvae and provided the amino acids to developing male larvae via trophallaxis. Our results suggest that investment in mass (up to a certain threshold) is pivotal in maximizing fitness. Males are the dispersing sex in *L. humile*: they undergo short nuptial flights to reach neighboring nests, where they mate with virgin queens (Passera and Keller, 1992). Although dispersal distances are no more than a few meters, a male's flying abilities are key to his reproductive success. There is probably an optimal mass (or size) that maximizes dispersal capacity (Clobert et al., 2012). Lighter males might be at a disadvantage due to their underdeveloped wing muscles, whereas heavier males might face the challenge of increased wing loading and drag. Since males are short lived and die a few hours after mating, there is no need for them to allocate energy to anything but growth and reproduction. Our results show that protein restriction during larval development affects sperm number but not body mass, suggesting that dispersal and mating success take priority over investment in offspring when resources are limited. This finding is fully consistent with the optimal energy allocation model, which predicts that short-lived organisms (like male ants) should first allocate all their energy to vegetative growth and then completely shift to allocating all their energy to reproduction (Kozłowski, 1992; Roff, 1992; Stearns, 1992).

We found that male bilateral symmetry is unaffected by protein restrictions. This is consistent with other research showing that environmental conditions (in ants; Fjerdingstad and Keller, 2004) and protein availability (in honeybees; Szentgyörgyi et al., 2016) caused no or only weak differences in the fluctuating asymmetry of size and shape

in workers, males, and queens. In the same vein, a previous study showed that inbreeding had no effect on the level of fluctuating asymmetry in *L. humile* workers (Keller and Passera, 1993). These results contrast with other studies showing that nutritional stress often increases fluctuating asymmetry of bilateral traits in animals (e.g., birds: Nilsson, 1994; *Drosophila*: Imasheva et al., 1999), and lend credence to the idea that social Hymenoptera could have mechanisms maintaining developmental stability that allow them to counteract the effects of environmental stress on growth.

In conclusion, our study shows that protein restriction during larval development in *Linepithema humile* impacts sperm number but not sperm viability. Furthermore, although protein restriction increased developmental time, male mass at eclosion was unaffected. Taken together, these findings suggest that males experience selective pressure that promotes investment in sperm quality and somatic growth, which enhances their ability to disperse and find a mate. Argentine ant queens are short-lived (~1 year) and mate just once. In other social Hymenoptera, however, queens may live several years (Keller and Genoud, 1997) and/or mate with multiple males (Boomsma et al., 2005, 2009). Future studies should examine if and how investment in sperm traits depends on life-history traits, such as the queen's life expectancy and mating frequency, which could drive sperm competition.

Acknowledgments

We thank N. Bleser, F. Farruggia, A. Lechêne, and E. Soutif for their assistance with data collection, J. Pearce-Duvel for her language editing services and two anonymous referees for their constructive comments. This work was supported by the Belgian Fund for Research Training in Industry and Agriculture (FRIA; fellowship to F.D.), the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS; grants 2.36026.40 and 2.4516.11 to S.A.) and the Fonds Emile Defay (grant to S.A.).

References

- Aron, S., Passera, L., Keller, L., 1994. Queen-worker conflict over sex ratio. A comparison of primary and secondary sex ratios in the Argentine ant, *Iridomyrmex humilis*. *J. Evol. Biol.* 7, 403–418.
- Aron, S., Lybaert, P., Baudoux, C., Vandervelden, M., Fournier, D., 2016. Sperm production characteristics vary with level of sperm competition in *Cataglyphis* desert ants. *Funct. Ecol.* 30, 614–624. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12533>.
- Baer, B., 2003. Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 54, 521–533. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-003-0673-5>.
- Baer, B., 2011. The copulation biology of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News* 14, 55–68 (ISSN: 1997-3500).
- Baer, B., Boomsma, J.J., 2004. Male reproductive investment and queen mating frequency in fungus growing ants. *Behav. Ecol.* 15, 426–432. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arl025>.
- Bakker, T.C., Hollmann, M., Mehli, M., Zbinden, M., 2014. Functional variation of sperm morphology in sticklebacks. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 617–627. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-013-1676-5>.
- Benois, A., 1973. Incidences des facteurs écologiques sur le cycle annuel et l'activité saisonnière de la fourmi d'Argentine *Iridomyrmex humilis* (Mayr) (Hymenoptera, Formicidae), dans la région d'Antibes. *Insectes Soc.* 20, 267–296.
- Birkhead, T.R., Hosken, D.J., Pitnick, S., 2009. *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*. Academic Press, London, UK978-0-12-372568-4.
- Boomsma, J.J., Baer, B., Heinze, J., 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 395–420. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130416>.
- Boomsma, J.J., Kronauer, D.J.C., Pedersen, J.S., 2009. The evolution of social insect mating systems. In: Gadau, J., Fewell, J., Wilson, E.O. (Eds.), *Organization of Insect Societies*. Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Bunning, H., Rapkin, J., Belcher, L., Archer, C.R., Jensen, K., Hunt, J., 2015. Protein and carbohydrate intake influence sperm number and fertility in male cockroaches, but not sperm viability. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 282, 2014–2144. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2144>.
- Chapuisat, M., Sundström, L., Keller, L., 1997. Sex-ratio regulation: the economics of fratricide in ants. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 264, 1255–1260.
- Cheah, Y., Yang, W., 2011. Functions of essential nutrition for high quality spermatogenesis. *ABB* 2, 182–197. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2011.24029>.
- Clobert, J., Baguette, M., Benton, T.G., Bullock, J.M., 2012. *Dispersal Ecology and Evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK9780199608904.
- Cook, P.A., Wedell, N., 2006. Ejaculate dynamics in butterflies: a strategy for maximising fertilization success? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 263, 1047–1051. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1996.0154>.
- Coulter, G., Cook, R., Kastelic, J., 1997. Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. *J. Anim. Sci.* 75, 1048–1052. <http://dx.doi.org/10.2527/1997.7541048x>.
- Courmault, L., Aron, S., 2008. Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insect Soc.* 55, 283–287. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-008-1003-8>.
- Crespi, B.J., 1992. Cannibalism and trophic eggs in subsocial and eusocial insects. In: Elgar, M., Crespi, B.J. (Eds.), *The Ecology and Evolution of Animal Cannibalism*. Oxford University Press, Oxford, pp. 214–237.
- Czakońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., Samboeski, J., 2015. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie* 46, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0296-z>.
- Decanini, D.P., Wong, B.B.M., Dowling, D.K., 2013. Context-dependent expression of sperm quality in the fruitfly. *Biol. Lett.* 9 (6), 20130736. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0736>.
- den Boer, S.P.A., Baer, B., Boomsma, J.J., 2010. Seminal fluid mediates ejaculate competition in social insects. *Science* 327, 1506–1508. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1184709>.
- den Boer, S.P.A., Stürup, M., Boomsma, J.J., Baer, B., 2015. The ejaculatory biology of leafcutter ants. *J. Insect Physiol.* 74, 56–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.02.006>.
- Dewsbury, D.A., 1982. Ejaculate cost and male choice. *Am. Nat.* 119, 601–610.
- Dussutour, A., Simpson, S.J., 2009. Communal nutrition in ants. *Curr. Biol.* 19, 740–744. doi: 0003-0147/82/1905-0002\$2.00.
- Fedina, T.Y., Lewis, S.M., 2006. Proximal traits and mechanisms for biasing paternity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 844–853. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-006-0228-7>.
- Fitzpatrick, J.L., Montgomerie, R., Desjardins, J.K., Stiver, K.A., Kolm, N., Balshine, S., 2009. Female promiscuity promotes the evolution of faster sperm in cichlid fishes. *PNAS* 106, 1128–1132. <http://dx.doi.org/10.3410/f.1160063.620333>.
- Fjerdingstad, E.J., Keller, L., 2004. Relationships between phenotype, mating behavior, and fitness of queens in the ant *Lasius niger*. *Evolution* 58, 1056–1063. <http://www.jstor.org/stable/3449200>.
- Gage, M.J.G., Cook, P.A., 1994. Sperm size or numbers? Effects of nutritional stress upon eupyrene and apyrene sperm production strategies in the moth *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Funct. Ecol.* 8, 594–599. <http://www.jstor.org/stable/2389920>.
- Gómez Montoto, L., Magaña, C., Tourmente, M., Martín-Coello, J., Crespo, C., Luque-Larena, J.J., Gwendio, M., Roldán, E.R.S., 2011. Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in muroid rodents. *PLoS One* 6, e18173. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018173>.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The Ants*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Holman, L., Snook, R.R., 2008. A sterile sperm caste protects brother fertile sperm from female-mediated death in *Drosophila pseudoobscura*. *Curr. Biol.* 18, 292–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.048>.
- Imasheva, A.G., Bosenko, D.V., Bubli, O.A., 1999. Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82, 187–192. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.hdy.6884660>.
- Immler, S., Pitnick, S., Parker, G.A., Durrant, K.L., Lupold, S., Calhoun, S., Birkhead, T.R., 2011. Resolving variation in the reproductive tradeoff between sperm size and number. *PNAS* 108, 5325–5330. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1009059108>.
- Kahl, A.F., Cox, R.M., 2015. Diet affects ejaculate traits in a lizard with condition-dependent fertilization success. *Behav. Ecol.* 26, 1502–1511. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/aru105>.
- Keller, L., Genoud, M., 1997. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature* 389, 958–960. <http://dx.doi.org/10.1038/40130>.
- Keller, L., Passera, L., 1992. Mating system, optimal number of matings, and sperm transfer in the Argentine ant *Iridomyrmex humilis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 31, 359–366. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00177776>.
- Keller, L., Passera, L., 1993. Incest avoidance, fluctuating asymmetry, and the consequences of inbreeding in *Iridomyrmex humilis*, an ant with multiple queen colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 33, 191–199. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00216600>.
- Keller, L., Passera, L., Suzzoni, J.P., 1989. Queen execution in the Argentine ant *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Physiol. Entomol.* 14, 157–163. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.1989.tb00947.x>.
- Kozłowski, J., 1992. Optimal allocation of resources to growth and reproduction: implications for age and size at maturity. *Trends Ecol. Evol.* 7, 15–19. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90192-E](http://dx.doi.org/10.1016/0169-5347(92)90192-E).
- Krieger, M.J., Keller, L., 2000. Mating frequency and genetic structure of the Argentine ant *Linepithema humile*. *Mol. Ecol.* 9, 119–126. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00837.x>.
- Lester, P.J., Baring, C.W., Longson, C.G., Hartley, S., 2003. Argentine and other ants (Hymenoptera: Formicidae) in New Zealand horticultural ecosystems: distribution, hemipteran hosts, and review. *N. Z. Entomol.* 26, 79–89.
- Levitán, D.R., 2000. Sperm velocity and longevity trade off each other and influence fertilization in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 267, 53–54. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1032>.
- Lewis, Z., Wedell, N., 2007. Effect of adult feeding on male mating behaviour in the butterfly, *Bicyclus anynana* (Lepidoptera: Nymphalidae). *J. Insect Behav.* 20, 201–213. <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-007-9075-2>.
- Louis, G.F., Lewis, A.J., Weldon, W.C., Ermer, P.M., Miller, P.S., Kittok, R.J., Stroup, W.W., 1994. The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics, and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72, 2051–2060.
- Markin, G.P., 1970. The seasonal life cycle of the Argentine ant *Iridomyrmex humilis*

- (Hymenoptera: Formicidae), in southern California. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63, 1238–1242. <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/63.5.1238>.
- McGraw, L.A., Fiumera, A.C., Ramakrishnan, M., Madhavarapu, S., Clark, A.G., Wolfner, M.F., 2007. Larval rearing environment affects several post-copulatory traits in *Drosophila melanogaster*. *Biol. Lett.* 3, 607–610. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2007.0334>.
- Moore, P.J., Harris, W.E., Montrose, V.T., Levin, D., Moore, A.J., 2004. Constraints on evolution and postcopulatory sexual selection: trade-offs among ejaculate characteristics. *Evolution* 58, 1773–1780. <http://www.jstor.org/stable/3449349>.
- Ng, C.M., Blackman, M.R., Wang, C., Swerdloff, R.S., 2004. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann. New York Acad. Sci.* 1033, 177–188. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1320.017>.
- Nilsson, J.A., 1994. Energetic stress and the degree of fluctuating asymmetry: implications for a long lasting, honest signal. *Evol. Ecol.* 8, 248–255. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01238276>.
- O'Dea, R.E., Jennions, M.D., Head, M.L., 2014. Male body size and condition affects sperm number and production rates in mosquitofish, *Gambusia holbrooki*. *J. Evol. Biol.* 27, 2739–2744. <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.12534>.
- Olsen, J., Ramlau-Hansen, C.H., 2012. Dietary fats may impact semen quantity and quality. *Asian J. Androl.* 14, 511–512. <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2012.52>.
- Olsson, M., Madsen, T., Shine, R., 1997. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 264, 455–459. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1997.0065>.
- Oppliger, A., Hosken, D.J., Ribi, G., 1998. Snail sperm production characteristics vary with sperm competition risk. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 265, 1527–1534. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1998.0468>.
- Palmer, A.R., 1994. Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In: Markow, T.A. (Ed.), *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic, Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 335–364.
- Palmer, A.R., Strobeck, C., 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17, 391–421. <http://dx.doi.org/10.2307/2000000>.
- Parker, G.A., 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45, 525–567. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x>.
- Parker, G.A., Pizzarri, T., 2010. Sperm competition and ejaculate economics. *Biol. Rev.* 85, 897–934. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00140.x>.
- Parsons, P.A., 1994. Developmental variability and the limits of adaptation: interactions with stress. In: Markow, T.A. (Ed.), *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. Kluwer Academic, London UK, pp. 247–255.
- Passera, L., Aron, S., 1996. Early sex discrimination and male brood elimination by workers of the Argentine ant. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 263, 1041–1106. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.1996.0153>.
- Passera, L., Keller, L., 1992. The period of sexual maturation and the age at mating in *Iridomyrmex humilis* an ant with intranidal mating. *J. Zool. Lond.* 228, 141–153. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04438.x>.
- Passera, L., Keller, L., Suzzoni, J.P., 1988. Queen replacement in dequeened colonies of the Argentine ant *Iridomyrmex humilis* (Mayr). *Psyche* 99, 59–66. <http://dx.doi.org/10.1155/1988/59259>.
- Paynter, E., Baer-Imhoof, B., Linden, M., Lee-Pullen, T., Heel, K., Rigby, P., Baer, B., 2014. Flow cytometry as a rapid and reliable method to quantify sperm viability in the honeybee *Apis mellifera*. *Cytometry A* 85, 463–472. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22462>.
- Pech-May, F., Medina-Medina, L., May-Itzá, de J.W., Paxton, R.J., Quezada-Euán, J.J.G., 2012. Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insect Soc.* 59, 417–424. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-012-0236-8>.
- Pitnick, S., 1996. Investment in testes and the cost of making long sperm in *Drosophila*. *Am. Nat.* 148, 57–80. <http://www.jstor.org/stable/2463071>.
- Radhakrishnan, P., Fedorka, K.M., 2012. Immune activation decreases sperm viability in both sexes and influences female sperm storage. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 279, 3577–3583. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.0654>.
- Reznick, D., 1985. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos* 44, 257–267. <http://dx.doi.org/10.2307/3544698>.
- Roff, D.A., 1992. *The Evolution of Life Histories. Theory and Analysis*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Rowe, M., Pruett-Jones, S., 2009. Sperm competition selects for sperm quantity and quality in the Australian Maluridae. *PLoS One* 6, e15720. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015720>.
- Schwenke, R.A., Lazzaro, B.P., Wolfner, M.F., 2016. Reproduction-immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 239–256. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023924>.
- Sella, G., Lorenzi, M.C., 2003. Increased sperm allocation delays body growth in a protandrous simultaneous hermaphrodite. *Biol. J. Linn. Soc.* 78, 149–154. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1095-8312.2003.00167.x>.
- Shik, J.Z., Silverman, J., 2013. Towards a nutritional ecology of invasive establishment: aphid mutualists provide better fuel for incipient Argentine ant colonies than insect prey. *J. Biol. Invasions* 15, 829–836. <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-012-0330-x>.
- Shik, J.Z., Flatt, D., Kay, A., Kaspari, M., 2012. A life history continuum in the males of a Neotropical ant assemblage: refuting the sperm vessel hypothesis. *Naturwissenschaften* 99, 191–197. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-012-0884-6>.
- Shik, J.Z., Kay, A., Silverman, J., 2014. Aphid honeydew provides a nutritionally balanced resource for incipient Argentine ant mutualists. *Anim. Behav.* 95, 33–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.06.008>.
- Simmons, L.W., 2001. *Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in the Insects*. Princeton University Press, Princeton, USA.
- Simmons, L.W., 2011. Resource allocation trade-off between sperm quality and immunity in the field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Behav. Ecol.* 23, 168–173. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arr170>.
- Simmons, L.W., Roberts, B., 2005. Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science* 309, 2031. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1114500>.
- Simmons, L.W., Tinghitella, R.M., Zuk, M., 2010. Quantitative genetic variation in courtship song and its covariation with immune function and sperm quality in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. *Behav. Ecol.* 21, 1330–1336. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arq154>.
- Skau, P.A., Folstad, I., 2005. Does immunity regulate ejaculate quality and fertility in humans? *Behav. Ecol.* 16, 410–416. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/ari004>.
- Stearns, S.C., 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, New York, USA.
- Stockley, P., Gage, M.J.G., Parker, G.A., Møller, A.P., 1997. Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am. Nat.* 149, 933–954. <http://dx.doi.org/10.1086/286031>.
- Stürup, M., Baer-Imhoof, B., Nash, D.R., Boomsma, J.J., Baer, B., 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol.* 24, 1192–1198. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/art049>.
- Stürup, M., Baer, B., Boomsma, J.J., 2014. Short independent lives and selection for maximal sperm survival make investment in immune defences unprofitable for leaf-cutting ant males. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 947–955. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-014-1707-x>.
- Szentgyörgyi, H., Czekońska, K., Tofilski, A., 2016. Influence of pollen deprivation on the fore wing asymmetry of honeybee workers and drones. *Apidologie* 47, 653–662. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-015-0415-5>.
- Tarpy, D.R., Nielsen, D.I., 2002. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95, 513–528.
- Tourmente, M., Gomendio, M., Roldan, E.R.S., Gnojales, L.C., Chiaraviglio, M., 2009. Sperm competition and reproductive mode influence sperm dimensions and structure among snakes. *Evolution* 63, 2513–2524. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00739.x>.
- Tourmente, M., Delbarco, Trillo J., Roldan, E.R.S., 2015. No evidence of trade-offs in the evolution of sperm numbers and sperm size in mammals. *J. Evol. Biol.* 28, 1816–1827. <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.12698>.
- Van Valen, L., 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16, 125–142. <http://dx.doi.org/10.2307/2406192>.
- Van Voorhies, W.A., 1992. Production of sperm reduces nematode lifespan. *Nature* 360, 456–458. <http://dx.doi.org/10.1038/360456a0>.
- Wharton, K.E., Dyer, F.C., Getty, T., 2008. Male elimination in the honeybee. *Behav. Ecol.* 19, 1075–1079. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arn108>.
- Wills, B.D., Chong, C.D., Wilder, S.M., Eubanks, M.D., Holway, D.A., Suarez, A.V., 2015. Effect of carbohydrate supplementation on investment into offspring number, size, and condition in a social insect. *PLoS One* 10, e0132440. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132440>.
- Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Marc Rhoads, J., Satterfield, M.C., Smith, S.B., Spencer, T.E., Yin, Y., 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37, 153–168. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1320.017>.

Chapitre 2.

*Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase
constitutive immune activity.*

Dávila et al. 2015. *Journal of Insect Physiology* 78: 9-14



Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity



Francisco Dávila^{a,1,*}, Sarah Chérasse^{b,1}, Jacobus J. Boomsma^b, Serge Aron^a

^a Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium

^b Centre for Social Evolution, University of Copenhagen, 2100 Copenhagen, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 January 2015

Received in revised form 13 March 2015

Accepted 22 April 2015

Available online 23 April 2015

Keywords:

Prophenoloxidase

Phenoloxidase

Sperm storage organ

Spermatheca

Ant

ABSTRACT

The prophenoloxidase system (proPO-AS) is a primordial constituent of insect innate immunity. Its broad action spectrum, rapid response time, and cytotoxic by-products induced by phenoloxidase (PO) production contribute to the effective clearing of invading pathogens. However, such immune reactions may not be optimal for insect organs that evolved to have mutualistic interactions with non-self-cells. Ant queens are long-lived, but only mate early in adult life and store the sperm in a specialized organ, the spermatheca. They never re-mate so their life-time reproductive success is ultimately sperm-limited, which maintains strong selection for high sperm viability before and after storage. The proPO-AS may therefore be inappropriate for the selective clearing of sexually transmitted infections, as it might also target sperm cells that cannot be replaced.

We measured PO enzymatic activity in the sperm storage organs of three ant species before and after mating. Our data show that no PO is produced in the sperm storage organs, relative to other somatic tissues as controls, and that these negative results are not due to non-detection in small volumes as non-immune-relevant catalase activity in single spermatheca fluid samples of both virgin and mated queens was significant. The lack of PO activity in sperm storage organs across three different ant species may represent an evolutionarily conserved adaptation to life-long sperm storage by ant queens. We expect that PO activity will be similarly suppressed in queen spermathecae of other eusocial Hymenoptera (bees and wasps) and, more generally, of insect females that store sperm for long periods.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The prophenoloxidase system (proPO-AS) is a major component of the invertebrate innate immune system. It is a constitutive, non-specific and immediate response involved in wound healing and the immobilization and eradication of foreign agents (Sugumaran, 2002; Schmid-Hempel, 2005). The immune response is activated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns or cell injury (Schmid-Hempel, 2005), which triggers the conversion of zymogenic prophenoloxidase (proPO) into active phenoloxidase (PO) through enzymatic interactions (Söderhäll and Cerenius, 1998; Loughton and Siva-Jothy, 2010). PO catalyzes the oxidation of phenols into quinones, which results in melanin synthesis and deposition around wounds or pathogens (González-Santoyo and Córdoba-Aguilar, 2011). By-products of this reaction (such as dopamine derivatives and reactive oxygen

species (ROS)) are toxic for microbial pathogens, but also for the infected individuals themselves (Cerenius and Söderhäll, 2004; Wilson-Rich et al., 2009). For example, ROS are involved in the oxidation of various types of molecules, including proteins, RNA, DNA, and membrane lipids, and may contribute to aging, carcinogenesis or cell death (Heifetz and Rivlin, 2010). Such damages can be prevented thanks to the activity of antioxidative enzymes, such as catalase, superoxide dismutase or glutathione-S-transferase (Weirich et al., 2002; Collins et al., 2004; DeJong et al., 2007). To date, several studies of insect immune capacity have shown an increase in the hemolymph PO-level associated with the presence of 'non-self' elements such as lipopolysaccharides injections or nylon inserts (Castella et al., 2009; Baer et al., 2006; McNamara et al., 2013; Schwarzenbach and Ward, 2006).

Females of many insect species store sperm in specialized organs, spermathecae, before using it to fertilize eggs (Shuker and Simmons, 2014). Depending on species or lineage, sperm can be stored for days, weeks or even years making it logical to expect that spermathecae have been under selection to preserve sperm viability when that serves female fitness interests. Recent studies

* Corresponding author.

E-mail address: jdavilag@ulb.ac.be (F. Dávila).

¹ These authors contributed equally to this work.

have indeed shown that insect females interfere with the metabolic rate of stored sperm reducing the production of harmful ROS (Reinhardt and Ribou, 2013; Ribou and Reinhardt, 2012). Another factor that affects the preservation of stored sperm is the prevalence of sexually transmitted pathogens (Knell and Webberley, 2004; Fievet et al., 2006) that might cause sperm death (Otti et al., 2013). While the female immune system probably plays an important role in eliminating such pathogens, such defences might have collateral damage if they also recognize sperm as non-self elements to be eliminated. The proPO-AS is a generalist immune response that can therefore potentially induce sperm death. Mating has indeed been reported to trigger development of dark reaction masses in *Drosophila* female sexual tract (Patterson, 1946) and to induce melanization of the spermatheca in bumblebees (Ashida and Brey, 1995). Sperm cell melanization has further been observed in the shrimp *Penaeus vannamei* where it induced sperm degeneracy and reduced male fertility (Dougherty and Dougherty, 1989, 1990).

Queens of the eusocial Hymenoptera (ants, bees, wasps) are inseminated on a single day early in adult life, store the sperm for the rest of their lives, and never re-mate even though they may live for more than a decade (Boomsma et al., 2005). This extreme partner-commitment implies that lifetime reproductive success is ultimately dependent on the amount of sperm stored and the prudence of sperm use (den Boer et al., 2009). We therefore expect that the proPO-AS should be absent in the long-term sperm storage organs of eusocial queens and we evaluated that expectation using queens of three ant species representing the most abundant subfamilies (Formicinae and Myrmicinae) in terms of species richness (Hölldobler and Wilson, 1990). The ant species also differed in their mating system (Boomsma et al., 2009): queens of *Lasius niger* garden ants (Formicinae) are normally either singly or doubly inseminated (Boomsma and Van Der Have, 1998) whereas queens of *Acromyrmex echinator* and *Atta colombica* leaf-cutting ants (Myrmicinae) are always multiply inseminated (Villesen et al., 2002).

We measured the proPO and PO activity in the spermatheca (specialized organ for lifetime sperm storage) and the *Bursa copulatrix* (sperm deposition organ during copulation) of virgin and mated queens relative to control tissues (hemolymph or homogenized head and thorax), and we analyzed proPO/PO activity in male seminal vesicles where sperm is stored before copulation. Since most of the PO is stored as inactive proPO, we estimated the putative activity of proPO after its cleavage into PO by a non-specific protease (α -chymotrypsin). This allowed us to use “proPO activity” as a predictor of PO activity based on the transformation of stored proPO. To obtain an independent control for another enzyme in the sperm storage organs that is not expected to be absent, we also measured catalase activity in spermathecae and homogenized head and thorax controls of virgin and mated queens.

2. Materials and methods

Virgin queens and males of *L. niger* were collected from field colonies in Brussels (Belgium) in July 2011, 2 weeks before the mating flight. Mated queens were caught on the day of their flight, placed in laboratory nests with *ad libitum* water, and fed sugar water and mealworms. *A. colombica* males and virgin queens were collected in Gamboa (Panama) just before the mating flight in May 2013 and mated queens were collected after the mating flight. Males and virgin queens of *A. echinator* were taken from mature laboratory colonies in Copenhagen that were collected at the same Panamanian field sites in earlier years. Mated queens (ca. 4 months old) of *A. echinator* originated from incipient laboratory colonies kept in Copenhagen and collected in Panama in May 2014. Although the exact age of the harvested sexuals was unknown,

males and females of each species sampled at a given time came from the same brood cohort under laboratory or natural conditions.

2.1. ProPO/PO activity

Previous studies have shown that ant queen immune responses may vary considerably before and after mating (Baer et al., 2006), so we measured proPO/PO activity at a number of different times. PO activity and potential proPO activity in virgin queens and males of all three species were measured within 24 h after the ants were collected. ProPO/PO activity for newly mated *L. niger* queens was measured 1 day, 1 week, 2 weeks, and 4 months after mating. We also measured proPO/PO activity in queens of *A. colombica* 1 day after insemination and queens of *A. echinator* ca. 4 months after their mating flight. The timing of these samples does not fully correspond to the larger range of samples for *L. niger* because we could only collect in Panama in May, whereas sampling of *L. niger* in Brussels was not constrained.

For the three species sampled, male seminal vesicles and female spermathecae and *bursae copulatrix* were dissected in deionized water at room temperature, carefully opening them in a 1 μ l drop of sodium cacodylate buffer (0.01 M Na-Cac, 0.005 M CaCl₂, pH 6.5 (Laughton and Siva-Jothy, 2010)) and removing the envelope tissue afterwards. Each 1 μ l sample was diluted in 19 μ l of sodium cacodylate buffer after which 10 μ l was used to measure free PO activity and another 10 μ l to measure proPO activity. The spermatheca, *bursa copulatrix* and paired seminal vesicles contain tiny amounts of fluid (ca. 0.2 μ l), and a lack of proPO/PO activity in these organs may therefore be due to detection failure. To discard this possibility, we also analyzed proPO/PO activity in a pool of 10 spermathecae from *L. niger* queens 2 weeks after mating (the time at which PO activity is the highest in hemolymph, see Section 3).

Control tissue activities were obtained from the head/thorax tissues or, whenever available in sufficient volumes, hemolymph as we believe that its higher purity would produce clearer results. For *L. niger*, less than 0.5 μ l hemolymph per individual could be extracted from males and queens, which was insufficient for accurate testing of proPO/PO activity. To obtain control tissue activities for these samples, head and thorax were immersed in liquid nitrogen and homogenized to release PO and proPO. Then, 50 μ l sodium cacodylate buffer was added before centrifuging for 10 min at 13,000 rpm, and recovering 20 μ l of the supernatant. For *A. echinator* and *A. colombica* males and virgin queens, we sampled 3 μ l hemolymph in a microcapillary after decapitating the individuals, of which 1 μ l was diluted in 19 μ l of sodium cacodylate buffer; 10 μ l was then used to measure free PO activity and the other 10 μ l to measure proPO activity.

PO measurements were carried out following the protocol of Laughton and Siva-Jothy (2010). Ten microliters of each sample were distributed in wells of a 96-well microtiter plate on ice, after which 5 μ l dH₂O (for measurement of active PO) or α -chymotrypsin (to artificially activate the proPO) were added. Plates were incubated for 5 min at room temperature to allow α -chymotrypsin activity to be expressed. Standard quantities of 35 μ l L-dopa (4 mg/ml) were added to all the wells simultaneously by an injection spectrophotometer (MikroWin 2000 version 4 from Mikrotek Laborsysteme GmbH). Total PO levels were determined by photometrically measuring the dopachrome absorbance synthesized from L-dopa (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine) by PO catalysis. Dopachrome absorbance was measured at 492 nm every minute for 90 min at room temperature. PO and proPO activities were quantified from the linear phase of reaction curves using regression analysis. One unit of activity was then calculated as the increase in dopachrome (OD₄₉₂ + 1) absorbance per minute (Laughton and Siva-Jothy, 2010).

2.2. Catalase activity

Measurements of catalase activity in the spermatheca of virgin and mated queens (2 weeks after their nuptial flight) were used as control experiments to test whether it is possible to detect any enzymatic activity in very small amounts of fluid. Catalase activity was determined with the Catalase Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) using 4 μ l of sample solution, as recommended by the manufacturer. Queen spermathecae were dissected in deionized water, opened in 4 μ l dH₂O, after which the envelope was removed. For control tissues, the head and thorax of the same individuals were immersed in liquid nitrogen and homogenized to release the catalase, after which 50 μ l dH₂O was added before centrifuging for 10 min (13,000 rpm) and recovering 4 μ l of the supernatant.

The 4 μ l from each sample was diluted in 156 μ l catalase assay buffer (final volume). Two aliquots of 78 μ l were distributed in two wells of a 96-well microtiter plate on ice. A blank solution was prepared in the first well by adding 10 μ l of the stop solution provided in the kit, which contains proteases and inhibits the catalase activity; the content of the second well was used for testing the catalase activity. Twelve microliters H₂O₂ (1 mM) were added both to the blank and the test wells, after which they were incubated for 30 min at 25 °C (catalase consumes the H₂O₂ and produces water and oxygen). Then, 50 μ l of the developer mix (containing assay buffer, OxiRed probe and HRP solution) provided in the kit was added to each well. The H₂O₂ not transformed by catalase reacts with the OxiRed and forms a colored product that absorbs at 570 nm. This procedure was repeated for each sample. A standard curve was obtained by exposing different concentrations of H₂O₂ to the OxiRed (30 min at 25 °C) and used to determine the amount of H₂O₂ transformed by the catalase, serving as a measure of enzymatic activity in each sample. One catalase unit corresponded to the amount of catalase that decomposed 1 μ mol H₂O₂ per minute, at pH 4.5 at 25 °C.

2.3. Statistical analysis

Deviations from normality and homoscedasticity were tested with Shapiro–Wilk and Levene's tests, respectively. Parametric tests were used when enzymatic activity units were normally distributed and had homogeneous variances. Nonparametric tests were used when transformations did not suffice to normalize data or homogenize variances (Sokal and Rohlf, 1995).

First, in order to show that the enzymatic activity in the controls differs from zero, we compared proPO/PO and catalase activity with a hypothesized level of zero activity using one sample *t*-tests or Mann–Whitney *U* tests. Second, to test for a difference between PO and proPO activities in the controls, we used a one-way ANOVA (*L. niger*) or a Kruskal–Wallis test (*A. colombica* and *A. echinator*). Third, we compared PO activities between head/thorax homogenates of virgin and mated *L. niger* queens and between virgin queens and males, using a Kruskal–Wallis test or a one-way ANOVA. We performed the same tests to compare proPO levels between these samples.

In order to compare proPO and PO levels between multiple queen samples (virgin, 1 day, 1 week, 2 weeks and 4 months after insemination) the ANOVA or Kruskal–Wallis tests were followed by *post hoc* Tukey–Kramer HSD and Dunn tests, respectively. Finally, to compare hemolymph proPO/PO levels between virgin queens and males and between virgin and mated queens of *A. colombica* and *A. echinator*, we used either one-way ANOVAs or Kruskal–Wallis tests. When using Kruskal–Wallis tests, *P*-values were obtained from chi-square probability distributions at (*k* – 1) degrees of freedom. For all statistical tests, the significance levels were Bonferroni corrected to account for multiple comparisons.

All statistical analyses were carried out using JMP software (version 10, SAS Institute).

3. Results

No prophenoloxidase or phenoloxidase activity was detected in the queen spermathecae and *bursae copulatrix* or in the male seminal vesicles. In contrast, we detected significant proPO and PO activities in the control tissues (one sample *t*-tests or Mann–Whitney *U* tests against the zero activity alternative; *L. niger*: all *P* < 0.006; *A. echinator* virgin queens: proPO: *P* < 0.0001, PO: *P* = 0.002; *A. colombica* virgin queens: proPO: *P* < 0.0001, PO: *P* = 0.07; *A. colombica* 1 day old mated queen: proPO: *P* < 0.001; *A. colombica* males: proPO: *P* < 0.001, PO: *P* = 0.008) (Figs. 1 and 2). Substantial proPO/PO activity was also detected in control tissues of *A. echinator* males and queens ca. 4 months after their mating flight, but it was not significantly different from zero (Mann–Whitney *U* test) probably due to the small number of individuals in the sample (*n* = 2 and 3, respectively). No proPO/PO activity was found in the samples of ten pooled spermathecae dissected 2 weeks after the mating flight, *i.e.* when the proPO activity in the control tissues was maximal (Fig. 1), indicating that our inability to find proPO/PO activity in spermathecae of individual queens was not due to lack of detection efficiency. However, significant catalase activity (Fig. 3) was measured in the minute volumes (4 μ l) of fluid from single spermathecal samples of virgin and mated queens (one sample *t*-tests against the zero activity alternative; both *P* < 0.008). This activity was not significantly different from that found in the head/thorax homogenate controls (two sample *t*-test; *P* > 0.25 in both virgin and mated queens).

The proPO activities were always much higher than the PO activities (*L. niger*: one-way ANOVA; $F_{1,226} = 339.87$, *P* < 0.0001; *A. colombica*: Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 32.31$, d.f. = 1, *P* < 0.0001; *A. echinator*: Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 36.89$, d.f. = 1, *P* < 0.0001) (Figs. 1 and 2). For *L. niger* queens (Fig. 1), PO activity in tissue homogenates remained stable and low during the 4 months of the colony founding experiment (Kruskal–Wallis and *post hoc* Dunn test).

Overall, proPO activity in the control tissue homogenates of *L. niger* queens (Fig. 1) varied significantly between just before mating and 4 months afterwards (one-way ANOVA; $F_{4,84} = 19.99$, *P* < 0.0001). ProPO activity was somewhat reduced 1 day after mating (*post hoc* Tukey–Kramer HSD; *P* = 0.029), but increased during the next 2 weeks to become significantly higher than in virgin queens 2 weeks after colony founding (*post hoc* Tukey–Kramer HSD; *P* = 0.027). However, when the first workers had hatched after 4 months, proPO activity had become reduced again to levels lower than those in virgin queens (*post hoc* Tukey–Kramer HSD; *P* = 0.0004).

PO activity in *A. colombica* queens was reduced 1 day after mating (Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 4.80$, d.f. = 1, *P* = 0.028), whereas proPO activity had increased (one-way ANOVA; $F_{1,11} = 13.54$, *P* = 0.004). However, *A. echinator* queens showed no difference in PO levels between virgin and 4 months old queens (Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 0.84$, d.f. = 1, *P* = 0.36) and here proPO activity was lower in mated compared to virgin queens (Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 4.32$, d.f. = 1, *P* = 0.038).

ProPO control tissue activities in virgin queens of *A. echinator* (Fig. 2) were higher than in virgin males (one-way ANOVA; $F_{1,26} = 6.34$, *P* = 0.018). In *L. niger*, proPO activities did not differ between the sexes (Kruskal–Wallis; $\chi^2 = 3.34$, d.f. = 1, *P* = 0.07). Whereas, in *A. colombica*, male proPO activities were higher than in queens (one-way ANOVA; $F_{1,16} = 5.50$, *P* = 0.032) (Fig. 2).

As for PO, there were no differences between the sexes for *A. echinator* hemolymph controls (one-way ANOVA; $F_{1,26} = 0.21$, *P* = 0.652; but note the small sample size for males) (Fig. 2),

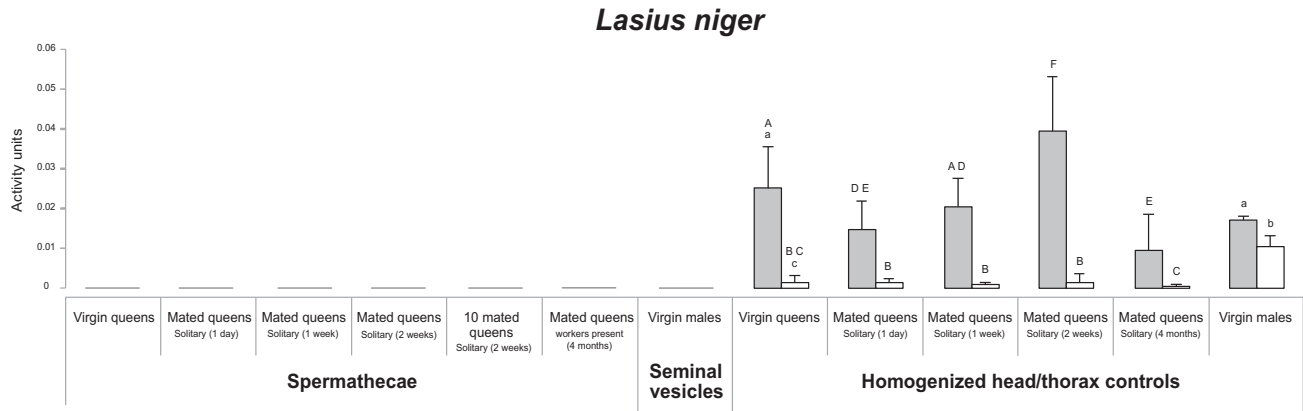


Fig. 1. Prophenoloxidase and phenoloxidase activity in the garden ant *Lasius niger*. Prophenoloxidase (proPO; gray bars) and phenoloxidase (PO; white bars) activity (mean \pm SD) in reproductive organs and homogenized head/thorax control tissues. Capital letters above error bars refer to significant differences (or not, when letters are the same) between proPO/PO activity for comparisons between virgin and mated queens while lower case letters refer to differences between virgin males and virgin queens. Sample sizes (always equal for spermathecae/seminal vesicles and homogenized head/thorax controls): virgin queens $n = 10$; mated queens (1 day) $n = 26$; mated queens (1 week) $n = 27$; mated queens (2 weeks) $n = 15$; 10 pooled spermathecae of mated queens (2 weeks) $n = 2$; mated queens (4 months) $n = 15$; virgin males $n = 25$.

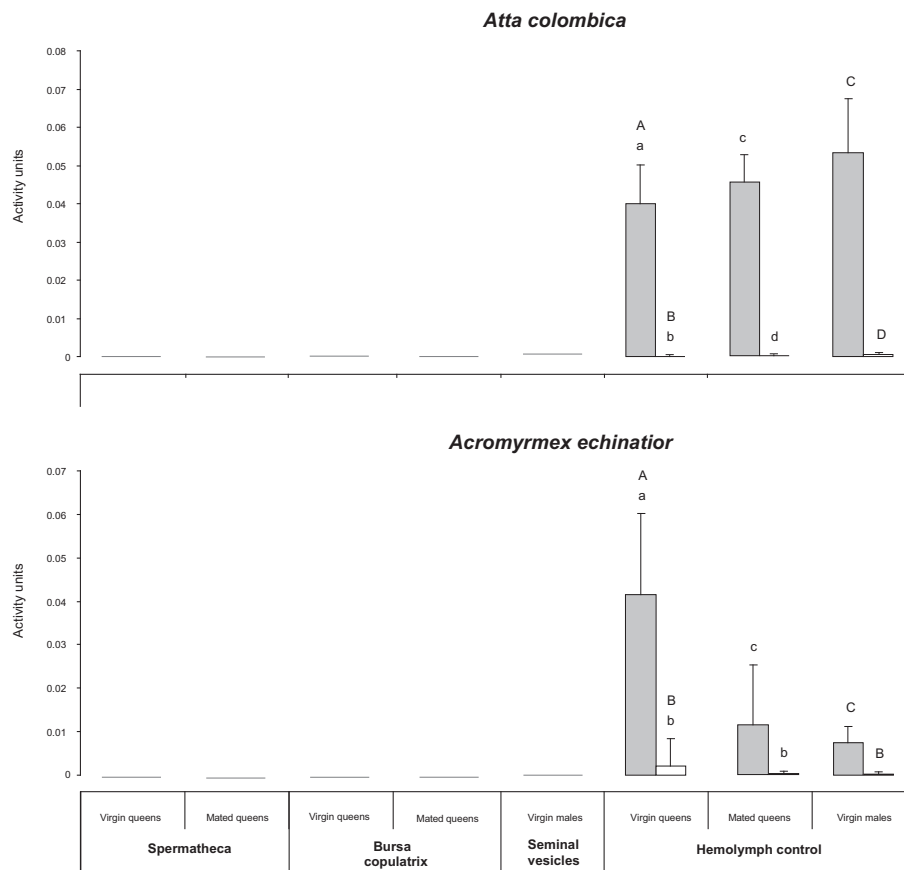


Fig. 2. Prophenoloxidase and phenoloxidase activity in the leaf-cutting ants *Acromyrmex echinator* and *Atta colombica*. Prophenoloxidase (proPO; gray bars) and phenoloxidase (PO; white bars) activity (mean \pm SD) in *Acromyrmex echinator* and *Atta colombica* virgin and mated queen spermathecae and *bursae copulatrix* and virgin male seminal vesicles, compared to control samples of hemolymph of virgin and mated queens and males. Letters above error bars indicate significances as in Fig. 1. Sample sizes for *Atta colombica*: $n = 9$ for all samples except for mated queen spermathecae and hemolymph controls 1 day after mating where $n = 4$; for *Acromyrmex echinator*: virgin queen spermathecae $n = 19$; virgin queen *bursae copulatrix* $n = 9$; 4 months old mated queen spermathecae $n = 3$; virgin male seminal vesicles $n = 4$; virgin queen hemolymph controls $n = 26$; 4 months old mated queen hemolymph controls $n = 3$; virgin male hemolymph controls $n = 2$.

whereas male PO activities were higher than those of queens for *A. colombica* (one-way ANOVA; $F_{1,15} = 9.14$, $P = 0.008$) (Fig. 2). The difference in adult PO level was even more pronounced for virgin males of *L. niger* relative to virgin queens (one-way ANOVA; $F_{1,33} = 99.33$, $P < 0.0001$) (Fig. 1).

4. Discussion

Our results show a complete absence of proPO/PO activity in ant sperm storage organs relative to control tissues across three different ant species. This lack of proPO/PO activity is unlikely to be due

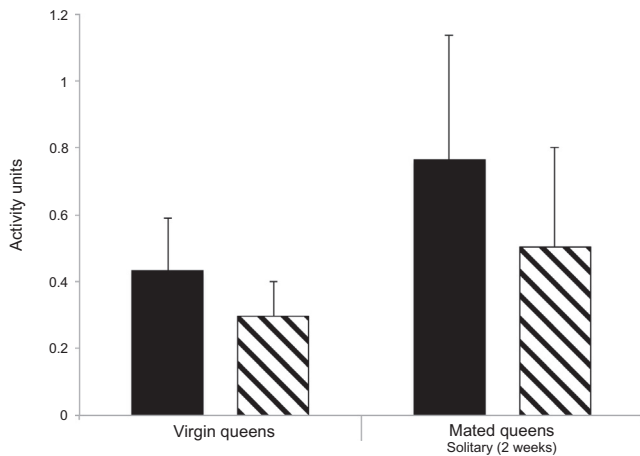


Fig. 3. Catalase activity in the garden ant *Lasius niger*. Catalase activity (mean \pm SD) in spermathecae (black bars) and homogenized head/thorax control tissues (hatched bars) of *Lasius niger* virgin queens and mated queens 2 weeks after the nuptial flight. Differences were not significant for either category of queens (see text for details). Sample sizes: virgin queen spermathecae and homogenized head/thorax controls $n = 9$; mated queens (2 weeks) spermathecae and homogenized head/thorax controls $n = 7$.

to detection failure: no proPO/PO activity was found, even when we pooled ten mated queen spermathecae; furthermore, we were able to detect significant catalase activity in the same minute volumes of spermatheca fluid of single virgin or mated queens. We hypothesize that the absence of proPO/PO activity in the spermathecae and *bursae copulatrix* represents an evolutionarily conserved adaptation to sperm storage by female insects, because the effects of the proPO/PO cascade may damage sperm thereby lowering both male and female reproductive success. Such an adaptation seems particularly crucial when females are inseminated during a unique mating event, as seen in social insects where queens are characterized by life-long sperm storage and complete absence of re-mating later in life (Boomsma et al., 2005).

The lack of proPO/PO activity in queen sperm storage organs does not exclude the possibility that other immune defences might be used to fight possible infections transmitted during mating. In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the seminal fluid of males was shown to contain antibacterial proteins from the accessory glands and ejaculatory duct (Lung et al., 2001). Given that the seminal fluid in fruit flies is delivered to females before the sperm, it has been suggested that these antibacterial proteins may also protect sperm from infections. Moreover, expression of several antimicrobial peptides was reported in the reproductive tract of *Drosophila* females (Tzou et al., 2000). A lysozyme-like immune activity involved in the degradation of bacteria and subsequent sperm protection against microbial damage was also documented in ejaculates of the common bedbug *Cimex lectularius* (Otti et al., 2009, 2013).

The control (head/thorax homogenates and hemolymph) measurements showed that PO levels in adult queens and males were always very low compared to proPO levels. At least two explanations may account for this result: negligible immune challenges during our experiments; or active PO enzyme being produced but rapidly degraded because its by-products are damaging (Cerenius and Söderhäll, 2004; Wilson-Rich et al., 2009). Such possible damage might be a particularly acute problem for queens that potentially have a long reproductive life ahead of them. Our data do not allow distinguishing between these two hypotheses.

Our comparisons between male and female proPO/PO activities across species showed no consistent trends. Based on previous studies in social Hymenoptera, we would have expected females to have a higher immune ability than males (Gerloff et al., 2007;

Vainio et al., 2004; Baer et al., 2005; Stürup et al., 2014). Because males die on the day of mating, there is no trade-off between present and future reproductive success, so one would not expect that males need much immune protection for the few hours of their lives that remain after leaving the largely aseptic environment of their natal nests (Cremer et al., 2007). On the other hand, queens are very long lived and face immune challenges particularly during the months of solitary colony founding (Baer et al., 2006).

The increase in proPO activity in *L. niger* queens in the weeks after mating when they founded colonies appears logical, with a slight decrease immediately after the immense efforts of completing the mating flight followed by a gradual increase over the following weeks when queens are still on their own to nurse their first brood. This is a very demanding time in terms of resource allocation, which will only be relieved when the first workers hatch and start their foraging and grooming services, explaining the decrease in proPO activity after 4 months (when their workers had hatched). These results are consistent with those previously reported in two other ant species where queen immune activity was shown to vary around the mating period. Virgin queens of *Formica paralugubris* had higher proPO levels than freshly mated queens (Castella et al., 2009) and *A. colombica* queens up-regulated their melanization immune response a few days after mating (Baer et al., 2006). Our limited sample availability did not allow us to corroborate this variation in proPO/PO activity over time in *A. colombica* and *A. echinator*, but it seems likely that the activation of the proPO system within a few days after mating is an adaptive response to pathogen exposure during colony founding.

5. Conclusions

The results that we obtained are consistent with our expectation of no proPO/PO activity in sperm storage organs combined with significant somatic proPO/PO activity in the same queens showing that their constitutive immune defences are otherwise of general importance. This implies that the protection of stored sperm against pathogens must be based on more specific and less destructive immune defences such as antimicrobial peptides (Baer et al., 2009), but more studies to test this are needed. The consistent lack of proPO/PO activity in the sperm storage organs of ant queens suggests that similar studies in other eusocial Hymenoptera can be expected to give similar results. These clear-cut expectations are based on the complete lack of remating later in life that characterizes all eusocial Hymenoptera. Whether spermathecae of insects where females do remate at specific intervals show similar, but possibly less extreme, reductions of proPO/PO activity in sperm storage organs remains to be seen, but deserves to be addressed.

Acknowledgements

We thank A. Allaoui, A. Botteaux and the Smithsonian Tropical Research Institute (Panama) for facilities and logistic support, and the Autoridad Nacional de Ambiente for issuing collection and export permits for the leaf-cutting ants used in this study. Funding was provided by a Danish National Research Foundation Grant (DNRF57) and an ERC Advanced Grant (323085) to JJB, and by a Belgian National Research Foundation Grant (2.4516.11) to SA.

References

- Ashida, M., Brey, P.T., 1995. Role of the integument in insect defense: prophenoloxidase cascade in the cuticular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 10698–10702. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.23.10698>.
- Baer, B., Armitage, S., Boomsma, J.J., 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. Nature 441, 872–875. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04698>.

- Baer, B., Heazlewood, J.L., Taylor, N.L., Eubel, H., Millar, A.H., 2009. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics* 9, 2085–2097. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200800708>.
- Baer, B., Krug, A., Boomsma, J.J., Hughes, W.H.O., 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insectes Soc.* 52, 298–303. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-005-0809-x>.
- Boomsma, J.J., Baer, B., Heinze, J.R., 2005. The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 395–420. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130416>.
- Boomsma, J.J., Kronauer, D.J.C., Pedersen, J.S., 2009. The evolution of social insect mating systems. In: Fewell, J., Gadau, J. (Eds.), *Organization of Insect Societies – Integrated Research Projects*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 3–25.
- Boomsma, J.J., Van Der Have, T.M., 1998. Queen mating and paternity variation in the ant *Lasius niger*. *Mol. Ecol.* 7, 1709–1718. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00504.x>.
- Castella, G., Christe, P., Chapuisat, M., 2009. Mating triggers dynamic immune regulations in wood ant queens. *J. Evol. Biol.* 22, 564–570. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01664.x>.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116–126. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>.
- Collins, A., Williams, V., Evans, J., 2004. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 13, 141–146. <http://dx.doi.org/10.1111/j.09621075.2004.00469.x>.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P., 2007. Social immunity. *Curr. Biol.* 17, 693–702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>.
- DeJong, R.J., Miller, L.M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., Barillas-Mury, C., 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 2121–2126. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608407104>.
- den Boer, S.P.A., Baer, B., Dreier, S., Aron, S., Nash, D.R., Boomsma, J.J., 2009. Prudent sperm use by leaf-cutter ant queens. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 276, 3945–3953. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2009.1184>.
- Dougherty, W.J., Dougherty, M.M., 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond cultured shrimp *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 331–343. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90117-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(89)90117-1).
- Dougherty, W.J., Dougherty, M.M., 1990. Ultrastructural observations on melanized sperm in developing and fully formed spermatophores of male shrimp, *Penaeus vannamei*. In: Cheng, F.O.P.C. (Ed.), *Pathology in Marine Science*. Academic Press, San Diego.
- Fievet, J., Tentcheva, D., Gauthier, L., de Miranda, J., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2006. Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology* 3, 16. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-3-16>.
- Gerloff, C.U., Ottmer, B.K., Schmid-Hempel, P., 2007. Effects of inbreeding on immune response and body size in a social insect, *Bombus terrestris*. *Funct. Ecol.* 17, 582–589. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2435.2003.00769.x>.
- González-Santoyo, I., Córdoba-Aguilar, A., 2011. Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomol. Exp. Appl.* 142, 1–16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>.
- Heifetz, Y., Rivlin, P.K., 2010. Beyond the mouse model: using *Drosophila* as a model for sperm interaction with the female reproductive tract. *Theriogenology* 73, 723–739. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.001>.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O., 1990. *The Ants*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Knell, R.J., Webberley, K.M., 2004. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behavior. *Biol. Rev.* 79, 557–581. <http://dx.doi.org/10.1017/S1464793103006365>.
- Laughton, A., Siva-Jothy, M., 2010. A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 42, 140–149. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010046>.
- Lung, O., Kuo, L., Wolfner, M.F., 2001. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. Insect Physiol.* 47, 617–622. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00151-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00151-7).
- McNamara, K.B., Wedell, N., Simmons, L.W., 2013. Experimental evolution reveals trade-offs between mating and immunity. *Biol. Lett.* 9, 20130262. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2013.0262>.
- Otti, O., McTighe, A.P., Reinhardt, K., 2013. In vitro antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Funct. Ecol.* 27, 219–226. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.12025>.
- Otti, O., Naylor, R.A., Siva-Jothy, M.T., Reinhardt, K., 2009. Bacteriolytic activity in the ejaculate of an insect. *Am. Nat.* 174, 292–295. <http://dx.doi.org/10.1086/600099>.
- Patterson, J.T., 1946. A new type of isolating mechanism in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 32, 202–208.
- Reinhardt, K., Ribou, A.C., 2013. Females become infertile as the stored sperm's oxygen radicals increase. *Sci. Rep.* 3, 2888. <http://dx.doi.org/10.1038/srep02888>.
- Ribou, A.-C., Reinhardt, K., 2012. Reduced metabolic rate and oxygen radicals production in stored insect sperm. *Proc. R. Soc. London B* 279, 2196–2203. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2011.2422>.
- Schmid-Hempel, P., 2005. Evolutionary ecology of insect immune defences. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 529–551. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>.
- Schwarzenbach, G.A., Ward, P.I., 2006. Responses to selection on phenoloxidase activity in yellow dung flies. *Evolution* 60, 1612–1621. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00506.x>.
- Shuker, D.M., Simmons, L.W., 2014. *The evolution of insect mating systems*. Oxford University Press, Oxford.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23–28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5).
- Sokal R.R., Rohlf, F.J., 1995. *The principles and practice of statistics in biological research*. In: *Biometry*, third ed., Freeman W.H., New York.
- Stürup, M., Baer, B., Boomsma, J.J., 2014. Short independent lives and selection for maximal sperm survival make investment in immune defences unprofitable for leaf-cutting ant males. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 947–955. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-014-1707-x>.
- Sugumaran, M., 2002. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15, 2–9. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x>.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.-M., Lemaître, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737–748. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00072-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00072-8).
- Vainio, L., Hakkaraine, H., Rantala, M.J., Sorvari, J., 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evol. Ecol.* 18, 75–84. <http://dx.doi.org/10.1023/B:EVEC.0000017726.73906.b2>.
- Villesen, P., Murakami, T., Schultz, T.R., Boomsma, J.J., 2002. Identifying the transition between single and multiple mating of queens in fungus-growing ants. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 269, 1541–1548. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2044>.
- Weirich, G.F., Collins, A.M., Williams, V.P., 2002. Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33, 3–14. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2001001>.
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T., 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 405–423. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>.

Chapitre 3.

*Antibacterial activity
of male and female sperm-storage organs
in ants.*

Dávila *et al.* 2018. *Journal of Experimental Biology* 221: jeb175158

RESEARCH ARTICLE

Antibacterial activity of male and female sperm-storage organs in ants

Francisco Dávila¹, Anne Botteaux², David Bauman³, Sarah Chérasse¹ and Serge Aron^{1,*}

ABSTRACT

Bacteria can damage sperm and thus reduce the reproductive success of both males and females; selection should therefore favour the evolution of antimicrobial protection. Eusocial hymenopterans might be particularly affected by such bacterial infections because of their mating ecology. In both sexes, mating is restricted to a short window early in the adult stage; there are no further chances to mate later in life. Males die shortly after mating, but queens use the acquired sperm to fertilise their eggs for years, sometimes decades. The reproductive success of both sexes is, thus, ultimately sperm-limited, which maintains strong selection for high sperm viability before and after storage. We tested the antibacterial activity of the contents of the male and female sperm-storage organs – the accessory testes and the spermatheca, respectively. As our study species, we used the bacterium *Escherichia coli* and the garden ant *Lasius niger*, whose queens can live for several decades. Our results provide the first empirical evidence that male and female sperm-storage organs display different antibacterial activity. While the contents of the accessory testes actually enhanced bacterial growth, the contents of the spermatheca strongly inhibited it. Furthermore, mating appears to activate the general immune system in queens. However, antimicrobial activity in both the spermatheca and the control tissue (head–thorax homogenate) declined rapidly post-mating, consistent with a trade-off between immunity and reproduction. Overall, this study suggests that ejaculates undergo an immune ‘flush’ at the time of mating, allowing storage of sperm cells free of bacteria.

KEY WORDS: Mating, Immunity, Sperm, Spermatheca, Accessory testes, Social insects, *Lasius niger*

INTRODUCTION

Microbes are environmentally ubiquitous and thus impose great selective pressure on organisms to protect themselves from infections. In sexually reproducing animals, sperm can be exposed to a variety of pathogens, including bacteria, fungi and viruses, via several pathways (reviewed in Knell and Webberley, 2004; Otti, 2015). First, male reproductive tissues may become infected by pathogens prior to copulation. Second, during copulation, pathogens may enter the reproductive tract through genital openings. Third, sperm may be exposed to pathogens in the female reproductive tract, which harbours diverse microbes (Otti,

2015). Infection can negatively affect sperm function (e.g. motility, viability; Otti et al., 2013; Otti, 2015) either directly by the action of pathogens on sperm cells or indirectly via the costs associated with activation of the immune system on reproduction (e.g. Losdat et al., 2011; Simmons, 2011; Radhakrishnan and Fedorka, 2012), thereby potentially jeopardizing reproductive success in both sexes (Lung et al., 2001; Poiani, 2006). However, ejaculates display antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, a phenomenon observed in several taxa, including mammals (Hankiewicz and Swierczek, 1974; Bourgeon et al., 2004), fish (Lahnsteiner and Radner, 2010), birds (Sotirov et al., 2002; Rowe et al., 2011, 2013) and insects (Samakovlis et al., 1991; Jothy et al., 2005; Avila et al., 2011; Otti et al., 2013).

In this context, the reproductive system of eusocial Hymenoptera (ants, bees and wasps) imposes unique selective pressures (reviewed in Hölldobler and Bartz, 1985; Boomsma and Ratnieks, 1996; Baer, 2003, 2005; Boomsma et al., 2005; Boomsma et al., 2009; Baer, 2011). Mating occurs during a brief period early in adult life for both sexes. Females (queens) mate with one or a few males and store a lifetime’s supply of semen in a specialised organ, the spermatheca. They never remate, even though they may live for more than a decade. Males have usually completed spermatogenesis by the time they reach sexual maturity. Their testes degenerate shortly after they emerge as adults. Sperm cells are stored in their accessory testes, the content of which is mixed with seminal fluid from the accessory glands during ejaculation. Males die shortly after copulation but persist posthumously as sperm stored in queens’ spermathecae. In such a system, it may be critical to keep sperm free of pathogens as sperm quality could directly affect the lifetime reproductive success of both sexes.

Although the advantages of antimicrobial defences against sperm-associated pathogens have been repeatedly mentioned in the literature, the mechanisms for protecting sperm from infections have received surprisingly little attention in ants, bees and wasps. Analyses of proteomes (Collins et al., 2006; Baer et al., 2009a,b; Poland et al., 2011; Malta et al., 2014) and gene expression (via RNA sequencing; Gotoh et al., 2017) in the honeybee and in ants have revealed that male ejaculates and female spermathecal fluid contain a number of antifungal and antibacterial peptides. However, thus far a single study has explored their actual efficiency in protecting sperm against pathogens; Peng et al. (2016) showed that the seminal fluid of honeybee drones kills spores of the fungus *Nosema apis* in two ways: the protein fraction disrupts the fungus’ life cycle by inducing extracellular spore germination, while the non-protein fraction reduces the viability of intact spores. Given the strong sperm-damaging effect of bacteria (Otti et al., 2013) and the irreplaceable nature of stored sperm in eusocial Hymenoptera, we predict that sperm storage organs should also exhibit antibacterial activity.

Here, we investigated the antibacterial activity (ABA) of the contents of male accessory testes and female spermathecae (hereafter referred to as the male and female sperm-storage

¹Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium. ²Laboratory of Molecular Bacteriology, Université Libre de Bruxelles, 1070 Brussels, Belgium. ³Laboratory of Plant Ecology and Biogeochemistry, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium.

*Author for correspondence (saron@ulb.ac.be)

 S.A., 0000-0002-1674-8828

organs, SSOs). Our study species was the garden ant *Lasius niger* (Linnaeus). Queens of this ant species can live up to 29 years (Kutter and Stumper, 1969) and are capable of laying fertilised eggs their entire lives. ABA of SSOs were tested against the bacterium *Escherichia coli*. This Gram-negative bacterium has been shown to damage sperm cells by negatively affecting the mitochondrial membrane potential, and reducing sperm motility, velocity and viability in various mammals (mice: Bhardwaj et al., 2015; rams: Yániz et al., 2010; boars: Maroto et al., 2010; humans: Fraczek et al., 2007; Tremellen, 2008; Diemer et al., 2000; Prabha et al., 2010; Barbonetti et al., 2013). Although *E. coli* was not reported to infect the reproductive organs of arthropods (Otti, 2015), it was shown to activate the insect immune system (e.g. Radhakrishnan and Fedorka, 2012), and to be susceptible to anti-bacterial activity of peptides from the haemolymph of termites and moths (Lockey and Ourth, 1996; Coutinho et al., 2009) and the male genital tract in *Drosophila* (Samakovlis et al., 1991; Lung et al., 2001).

We measured the ABA of sperm taken from the SSOs of males sampled prior to the mating flight and of fluid taken from the SSOs of both virgin and mated queens. As female immunity levels are known to increase within a few days of mating (Baer et al., 2006; Dávila et al., 2015), we also characterised antibacterial activity in female SSOs 1 day, 1 week, 2 weeks and 4 weeks post-mating.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Lasius niger virgin males and virgin queens were collected from field colonies in Brussels (Belgium) before they carried out their mating flights. Freshly mated queens were caught on the day of the flight by hand, when they started landing after mating. They were placed in laboratory nests with *ad libitum* water, and fed sugar water and mealworms.

We took samples from six types of individuals: virgin males ($n=39$) and virgin queens (1 day after collection; $n=18$) and 1 day-mated ($n=28$), 1 week-mated ($n=30$), 2 week-mated ($n=30$) and 4 week-mated ($n=30$) queens. Ants were dissected in a laminar flow cabinet using sterilised forceps (i.e. rinsed with 70% ethanol and flame sterilised between dissections). For each individual, we tested the ABA of two tissue types: (i) the contents of the SSO [i.e. sperm stored in the accessory testes of males (this product does not contain the seminal fluid from the accessory glands, which is added after the sperm leaves the accessory testes at ejaculation) or fluid in the spermathecae of virgin and mated queens] and (ii) a homogenate of head and thorax tissues, which served as a control. Although haemolymph would have been a better control, the amount of haemolymph that can be extracted from *L. niger* is insufficient for accurately testing ABA (Dávila et al., 2015).

First, the SSO were carefully dissected in lysogeny broth (LB; 10 g tryptone, 10 g NaCl and 5 g yeast extract; Sigma L3022, St Louis, MO, USA) to avoid hampering bacterial growth, and placed in a clean 5 μ l drop of the same broth. The SSO envelopes were ruptured and removed; the contents released were transferred to a vial and stored at 4°C for subsequent ABA analyses. Second, the head and thorax of each individual were separated from the abdomen, placed together in a 1.5 ml vial, and homogenised in liquid nitrogen. Then, 50 μ l of LB was added and the homogenate was vortexed for 30 s and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm; 5 μ l of the supernatant was sampled and stored at 4°C.

Antibacterial activity

The ABA of the SSO contents and of the head–thorax homogenates was tested using the *E. coli* K-12 strain D31 (CGSC 5165, Coli

Genetic Stock Center, Yale University, USA), which is lipopolysaccharide defective and thus sensitive to antimicrobial peptides (Monner et al., 1971; Papo and Shai, 2005). It also expresses resistance to ampicillin and streptomycin. The strain was cultured overnight in LB at 37°C in a shaker (180 rpm) in the presence of ampicillin (100 μ g ml⁻¹) and streptomycin (100 μ g ml⁻¹). The amount of bacteria present was then estimated by measuring absorbance at 600 nm using a spectrophotometer (TriStar LB941, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The bacterial culture was diluted in LB (OD₆₀₀=0.1), and the bacteria were grown until they reached the exponential growth phase (OD₆₀₀=0.4–0.6). The bacteria were then pelleted and resuspended to obtain a concentration of $\sim 10^6$ cells 100 l⁻¹ of LB. To test ABA, 5 μ l samples of the SSO contents or the head–thorax homogenates were added to 5 μ l of the *E. coli* suspension. To establish negative controls, 5 μ l of LB was added to 5 μ l of the *E. coli* suspension, which allowed free bacterial growth. All these mixtures were incubated for 2 h at 37°C, and ABA was quantified by determining the end quantity of bacteria. A colorimetric method was used to quantify the amount of bacteria in the samples and controls after incubation (see below). This method is based on the ability of bacteria to reduce water-soluble tetrazolium dye (MTT), a substrate that replaces succinate in the respiration reaction, and thus allows quantification of only living bacteria, thereby avoiding measure bias due to dead cells (Botsford, 1998).

Colorimetric assay

Bacteria were centrifuged for 10 min at 4000 rpm, rinsed twice with 100 μ l of PBS (pH 7.4) and resuspended in 100 μ l of PBS. The bacterial suspensions were loaded onto 96-well plates. Each well contained one sample or one control, and ABA was measured once. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 20 μ l of 5 mg ml⁻¹ MTT in PBS] was added to each well (including negative controls) and the plates were incubated for 20 min at 37°C. MTT is transformed into formazan (purple in colour; absorbance measured at 600 nm) by succinate dehydrogenase during cell respiration (Mosmann, 1983). Preliminary studies indicated that formazan absorbance was highly correlated with the amount of bacteria (linear regression: $r^2>0.96$). One 96-well plate was used for each sample type (i.e. virgin males, virgin queens and 1 day-mated, 1 week-mated, 2 week-mated and 4 week-mated queens). Each plate had its own negative control wells. A total of 342 samples and 34 controls were tested. To account for possible variation among plates, the absorbance values of the samples were divided by the mean absorbance of the negative controls from the same plate ($n=5$ –8 negative controls per plate).

The ABA index was calculated as per Rowe et al. (2011): $ABA=1-(\text{sample OD}/\text{negative control OD})$. ABA index values can vary from 1 to ∞ (see Table S1): values that are greater than zero indicate antibacterial activity is present; zero indicates there is no difference in activity between the samples and the negative controls; and values that are less than zero indicate that bacterial growth has been enhanced.

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using R v.3.4 (<http://www.R-project.org/>). Males and queens were analysed separately. Virgin queens and mated queens at different time points (1 day, 1 week, 2 weeks and 4 weeks after collection) were treated as different levels of the ‘time point’ variable. A second variable – ‘tissue’ – had three levels, corresponding to the SSO contents, the control tissue (head–thorax homogenates) and the negative control.

First, we verified that the ABA of the controls was not different from 0; a linear model was used to assess that none of the intercepts of the negative controls differed significantly from 0. Second, ABA data were analysed using a two-way crossed-factor analysis of variance (ANOVA) adapted to unbalanced designs to test for an interaction between the factors time point and tissue. A permutation approach was used (9999 permutations; function *anova.2way.unbalanced*; <http://adn.biol.umontreal.ca/~numericaecology/Rcode/>) that calculates type III sums of squares, as suggested for unbalanced designs (<http://adn.biol.umontreal.ca/~numericaecology/Rcode/>). Because the results of this global model were significant (see Results), we carried out multiple comparisons of means. As *P*-value corrections for multiple tests must be applied in such contexts to control for type I error rate (Bretz et al., 2011), we only performed the comparisons relevant to our hypotheses of interest to maintain our statistical power as high as possible. These comparisons were carried out using permutation *t*-tests (9999 permutations; function *t.perm*; <http://adn.biol.umontreal.ca/~numericaecology/Rcode/>), and the resulting *P*-values were corrected using the Šidák method (Šidák, 1967). Overall, 26 tests were performed: we compared the ABA (i) of each type of tissue versus the negative controls for males and versus the negative controls for females at each time point (12 tests); (ii) between the different types of tissue within each time point (6 tests); and (iii) between consecutive time points for each tissue type for females (8 tests) (Table 1). For these 26 tests, the Šidák-corrected significance threshold was 0.002. The R codes used in this study are provided in the supplementary information (Script 1).

RESULTS

The ABA index of negative controls ($n=34$) did not differ significantly from zero (linear model: $t=0$, $P=1$), indicating neither inhibition nor enhancement of bacterial growth. Consequently, the results below will be discussed in terms of significant differences from an ABA value of zero. For the queens, there was a significant time point by tissue interaction: the ABA index differed between tissues depending on the time point after mating (two-way ANOVA: time point $F=19.28$, $P=0.0001$; tissue $F=2.04$, $P=0.13$; interaction $F=7.03$, $P=0.0001$).

The ABA of the SSO contents, the control tissue (head–thorax homogenates) and the negative control are shown in Fig. 1. The statistical results are given in Table 1.

Antibacterial activity of SSO contents

The SSO contents of virgin males significantly enhanced bacterial growth (permutational *t*-tests: $t=-3.738$, $P=0.008$). In contrast, the SSO contents of virgin queens showed marked antibacterial activity ($P=0.028$). The ABA index for 1 day-mated queens was significantly lower than that for virgin queens ($P=0.005$) but remained significantly different from zero ($P=0.005$). It continued to decrease over time and the SSO contents of 1 week-mated queens favoured bacterial growth ($P=0.023$). Two weeks after mating, the SSO contents of queens showed no significant activity (ABA index statistically indistinguishable from zero; $P=1$); this pattern held for 4 week-mated queens.

Antibacterial activity of control tissue

The head–thorax homogenates displayed no significant antibacterial activity on bacterial growth in either virgin males or virgin queens. However, antibacterial activity increased significantly after mating ($P=0.003$). The ABA index then decreased and became negative in 1 week-mated queens ($P=0.021$) and, finally, increased significantly

Table 1. Results of the permutational *t*-tests comparing antibacterial activity

ABA comparison	Time point	<i>t</i>	<i>P</i> (corrected)	
Tissue type vs negative control				
SSO vs negative control	Virgin males	-3.738	0.008	
	Virgin queens	3.776	0.028	
	1 day-mated queens	3.601	0.005	
	1 week-mated queens	-3.87	0.023	
	2 week-mated queens	-0.422	1	
Control tissue vs negative control	4 week-mated queens	0.388	1	
	Virgin males	0.081	1	
	Virgin queens	1.906	0.941	
	1 day-mated queens	6.747	0.003	
	1 week-mated queens	-3.593	0.021	
Between tissue types	2 week-mated queens	1.151	1	
	4 week-mated queens	1.854	0.84	
	SSO versus control tissue	4.947	0.003	
	Virgin males	-3.498	0.048	
Between tissue types	Virgin queens	5.594	0.003	
	1 day-mated queens	1.146	1	
	1 week-mated queens	2.159	0.602	
	2 week-mated queens	1.142	1	
Tissue type at different time points	4 week-mated queens	1.142	1	
	SSO	4.386	0.005	
	Virgin queens vs 1 day-mated queens	11.859	0.003	
	1 day-mated queens vs 1 week-mated queens	-3.39	0.033	
	1 week-mated queens vs 2 week-mated queens	-1.251	0.998	
	2 week-mated queens vs 4 week-mated queens	-5.676	0.003	
	Tissue control	Virgin queens vs 1 day-mated queens	16.036	0.003
	1 day-mated queens vs 1 week-mated queens	-6.527	0.003	
	1 week-mated queens vs 2 week-mated queens	-0.253	1	
	2 week-mated queens vs 4 week-mated queens			

Comparison of antibacterial activity (ABA) index values (i) between each tissue type and the corresponding negative control at each time point; (ii) between tissue types at each time point; and (iii) between consecutive time points for each tissue type. The tissue control is the head–thorax homogenate. SSO, sperm-storage organ. *P*-values were corrected by the Šidák correction for multiple tests.

($P=0.003$) such that in 2 week- and 4 week-mated queens, head–thorax homogenates showed no significant activity (ABA index not different from zero; $P=1$).

Comparison of antibacterial activity between SSO contents and control tissue

The ABA index differed significantly between SSO contents and head–thorax homogenates for virgin males, virgin queens and 1 day-mated queens (all $P\leq 0.05$). In males, this difference stemmed from the fact that ABA in the accessory testes was negative, suggesting enhanced bacterial growth in the SSO (see above), but head–thorax homogenates displayed no activity. In contrast, in virgin queens, while head–thorax homogenates also displayed no activity, SSO contents had strong antibacterial effects. In 1 day-mated queens, head–thorax homogenates displayed much greater antibacterial activity than did SSO contents, suggesting that mating triggers an increase in general immune function. Finally, the ABA index did not differ between SSO contents and head–thorax

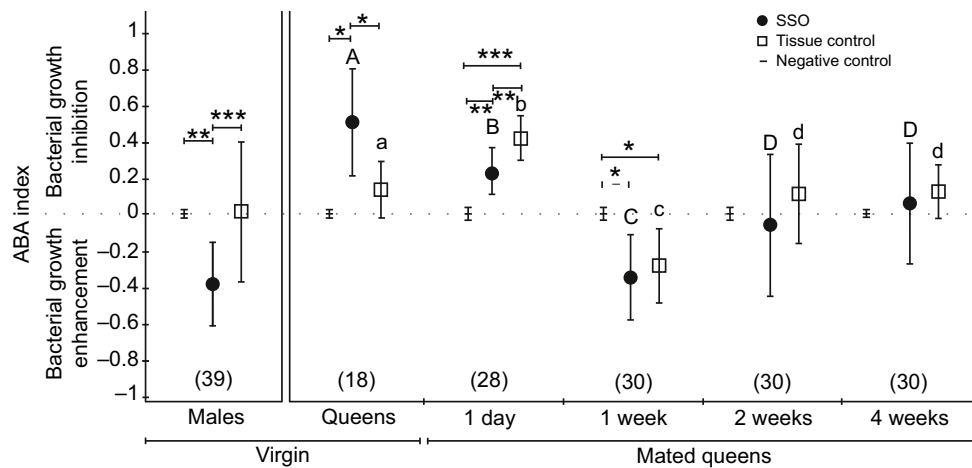


Fig. 1. Antibacterial activity index of the contents of sperm-storage organs. Data are given for the sperm-storage organs (SSOs; accessory testes of virgin males and the spermathecae of virgin and mated queens) and control tissues (i.e. head–thorax homogenates) in the ant *Lasius niger*. Values are mean (\pm s.d.) antibacterial activity (ABA) index values; they reflect ABA relative to that of the negative control (i.e. free growth; see Materials and methods). Values >0 indicate that ABA was present; values equal to 0 indicate there was no difference in ABA between the SSO sample and the negative control; and values <0 indicate that bacterial growth was enhanced in the SSOs. Significant differences in ABA index between the contents of SSOs and control tissues are shown for virgin males (single time point) and for queens (multiple time points). Differences in ABA index between consecutive time points were tested. Statistical differences in spermathecal content and control tissues are indicated by capital and lowercase letters, respectively. Sample size is indicated in parentheses. The level of significance is as follows: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.003$.

homogenates for 1 week-mated, 2 week-mated and 4 week-mated queens.

DISCUSSION

Our results show, to our knowledge for the first time in eusocial Hymenoptera, substantial differences in ABA among the SSO of *Lasius niger* virgin males, virgin queens and mated queens. Whereas the content of male accessory testes did not display ABA against the Gram-negative bacterium *E. coli*, queen spermathecal fluid showed high levels both before and shortly after copulation. From 1 week after mating, no ABA was detected in the spermatheca. Below, we discuss these variations of ABA in the SSO and in control tissues (head–thorax homogenates) in relation to the putatively high selective pressure for sperm protection that exists in ants.

Unexpectedly, we found that the contents of the males' accessory testes enhanced bacterial growth. The possibility that the negative value of ABA comes from the addition of bacteria naturally present in the SSO seems unlikely, as the amount of bacteria potentially present in the testes – if any – should be considerably lower than that added in our experiments. Enhanced bacterial growth suggests that bacteria utilise natural sperm-associated compounds (e.g. proteins, carbohydrates, lipids), and possibly even sperm themselves, as energy sources. However, we did not characterise the exact substances found in the accessory testes. Proteome analysis of ejaculates in *Apis mellifera* (Baer et al., 2009b) revealed the presence of 31 types of peptides that are involved in cell nutrition and metabolism. Some could potentially be produced in the accessory testes and help sustain the sperm, which are stored for days or weeks before copulation. These nutrients could allow the enhanced bacterial growth we observed. Antimicrobial peptides (AMPs) and other immune cells found in male ejaculate are typically contained in the seminal fluid produced by the accessory glands (Lung et al., 2001; Poiani, 2006; Baer et al., 2009a,b; Perry et al., 2013). Unfortunately, we were unable to induce ejaculation of *L. niger* males and could not therefore compare ABA between the contents of the accessory testes, the seminal fluid and whole

ejaculates. However, it has been shown that AMPs in the seminal fluid can have cytotoxic effects on sperm cells (Boman, 2003). Consequently, sperm may be stored separately from such peptides in the accessory testes to prevent any such degradation.

We also found that the SSO contents of virgin queens displayed strong ABA, which contrasts with the lack of activity in the head–thorax homogenates. This result indicates that such ABA is localised within the spermatheca and is not a by-product of the higher general immune function that arises post-mating. It could have been selected to preserve sperm from pathogens introduced during copulation. This 'hygienic' mechanism may be critical in eusocial Hymenoptera, as mating is restricted to a brief period early in life and queens do not later replenish their sperm stores. In the honeybee, the AMPs in male ejaculate are transferred to females during mating (Baer et al., 2009a,b), and it was recently shown that they have antifungal effects on *Nosema* spores (Peng et al., 2016). Collectively, these results support the argument that males and females of social hymenopterans both attempt to protect sperm from microorganisms.

In 1 day-mated queens, the SSO contents still showed marked ABA. At this point in time, the SSO may contain a mixture of AMPs from the female's spermathecal fluid and AMPs from the male's seminal fluid, transferred during copulation. In addition, ABA in 1 day-mated queens could also be heightened because the general immune system has been activated as a result of copulation and/or in response to pathogen exposure during mating. Up-regulation of immune function after mating could be an adaptive response to reduce the risk of sexually transmitted diseases and other microbial infections (McGraw et al., 2004; Valtonen et al., 2010; Fedorka et al., 2004, 2007; Shoemaker et al., 2006). Our results show that *L. niger* queens displayed a significant increase in ABA in head–thorax homogenates within 24 h of copulation, lending support to the idea that the general immune system is activated post-mating (Fig. 1). Thus far, two studies have investigated this idea in ants using zone of inhibition assays and phenoloxidase measurements. Castella et al. (2009) found no ABA in 1 day-mated queens of the wood ant *Formica paralugubris*. Likewise, Baer et al. (2006)

reported that the encapsulation response (a measure of immune defence that results from the phenoloxidase cascade) did not differ between virgin queens and 1 day-mated queens of the leaf-cutter ant *Atta colombica*. However, our data are not entirely comparable with these results for at least three reasons. First, different methods were used. We directly measured ABA by examining the inhibition of bacterial growth. Castella et al. (2009) used a different direct approach – inhibition zone assays – as well as an indirect approach – the quantification of phenoloxidase levels. Baer et al. (2006) used only an indirect approach – the measurement of the encapsulation response. Second, Castella et al. (2009) used queens mated under laboratory conditions, whereas we used queens that had mated in the field during the nuptial flight. In ants, mating under natural conditions may increase the risk of pathogen exposure, as pairs in copula can land, and their genitalia come into contact with the soil. Microbes may then enter the reproductive tract via genital openings, triggering the immune system. Finally, mating has been shown to differentially affect immunity in invertebrates, by inducing or suppressing different components of the immune response depending on the species (Lawniczak et al., 2007). Species may also suffer from post-mating immunosuppression in a pathogen-dependent manner (i.e. bacteria; Short and Lazzaro, 2010).

We found a dramatic decrease in general ABA in queens 1 week after mating: ABA in the SSO contents and the head–thorax homogenates was significantly lower than zero. This decrease might result from a trade-off between queen immunity and other physiological traits, particularly reproductive effort (Stearns, 1992; Schwenke et al., 2016). Indeed, the allocation of limited resources to reproduction has been shown to be coupled with a decrease in immune function in a variety of taxonomic groups (Sheldon and Verhulst, 1996; Rolff and Siva-Jothy, 2002; Fedorka et al., 2004; Gwynn et al., 2005), including ants (Pull et al., 2013; von Wyszczeki et al., 2016). Reproductive costs play a critical role in social hymenopteran species in which queens found their colonies alone (i.e. without the help of workers), as is the case in *L. niger*. Queens must rapidly produce a worker force to ensure nest construction, colony defence and food collection. After their nuptial flights, queens remain sealed within a chamber and rear their brood in isolation; they do not eat, but rather histolyse their wing muscles to feed their larvae until the first workers emerge, which may occur several weeks later (Hölldobler and Wilson, 1990). Under laboratory conditions, *L. niger* queens start to lay eggs 1–3 days after mating (Aron and Passera, 1999). The egg-laying rate then rapidly peaks and remains high for the next few weeks before drastically declining 20 days after mating (see Fig. S1). This enhanced investment in reproduction between 1 and 20 days after mating mirrors the strong decrease in queen immune defences 1 week after mating. Here again, our results diverge from those of Baer et al. (2006) and Castella et al. (2009), who found that immune function was up-regulated 1 week after mating in *A. colombica* and *F. paralugubris* queens, respectively. The reason for this discrepancy is unknown; it may arise from methodological differences (see above).

Finally, no ABA was detected in the SSO contents and head–thorax homogenates of 2 week-mated and 4 week-mated *L. niger* queens. This result is consistent with the high levels of prophenoloxidase previously found in head–thorax homogenates of 2 week-mated queens (Dávila et al., 2015), which indicated that reserves of the inactive precursor to phenoloxidase were full and that the immune system was inactive. In our study, mated queens were kept in clean, artificial laboratory nests and thus probably faced few to no pathogens.

In eusocial Hymenoptera, the protection of sperm cells against pathogens may be an essential component for the reproductive success of both sexes as mating is restricted to a single event early in life, after which males die and queens store a lifetime's supply of sperm. Our study shows that, in the ant *L. niger*, the contents of the male accessory testes favour bacterial growth. In contrast, there is high ABA in the spermatheca around the time of mating, showing that females play a key role in sperm preservation. ABA in the spermathecal fluid probably acts in concert with immune defences present in the seminal fluid of males that is transferred to females during copulation. In the weeks following mating, ABA disappears from the queens' spermathecae. Altogether, this suggests that ejaculates undergo an immune 'flush' at the time of mating, allowing long-term storage of sperm cells free of bacteria. Future research should focus on testing the activity of sperm storage organs against more prevalent pathogens of social Hymenoptera, as well as identifying the antibacterial compound(s) involved and their functional activity.

Acknowledgements

We thank Y. Cherradi for his assistance with data collection, two anonymous reviewers for their constructive comments, and J. Pearce-Duvel for her language editing services.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: F.D., A.B., S.A.; Methodology: F.D., A.B.; Formal analysis: F.D., D.B.; Data curation: D.B., S.C.; Writing - original draft: F.D., S.A.; Writing - review & editing: F.D., S.A.; Supervision: S.A.; Project administration: S.A.; Funding acquisition: S.A.

Funding

This work was supported by a Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA; F.D., S.C.), and Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS; scholarship, D.B.; grant no. 23602640, S.A.).

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.175158.supplemental>

References

- Aron, S. and Passera, L. (1999). Mode of colony foundation influences the primary sex ratio in ants. *Anim. Behav.* **57**, 325–329.
- Avila, F. W., Sirot, L. K., LaFlamme, B. A., Rubinstein, C. D. and Wolfner, M. F. (2011). Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu. Rev. Entomol.* **56**, 21–40.
- Baer, B. (2003). Bumblebees as model organisms to study male sexual selection in social insects. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **54**, 521–533.
- Baer, B. (2005). Sexual selection in Apis bees. *Apidologie* **36**, 187–200.
- Baer, B. (2011). The copulation biology of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News.* **14**, 55–68.
- Baer, B., Armitage, S. A. O. and Boomsma, J. J. (2006). Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature* **441**, 872–875.
- Baer, B., Eubel, H., Taylor, N. L., O'Toole, N. and Millar, A. H. (2009a). Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biol.* **10**, R67.
- Baer, B., Heazlewood, J. L., Taylor, N. L., Eubel, H. and Millar, A. H. (2009b). The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics* **9**, 2085–2097.
- Barbonetti, A., Vassallo, M. R. C., Cinque, B., Filipponi, S., Mastromarino, P., Cifone, M. G., Francavilla, S. and Francavilla, F. (2013). Soluble products of *Escherichia coli* induce mitochondrial dysfunction-related sperm membrane lipid peroxidation which is prevented by Lactobacilli. *Plos One* **8**, e83136.
- Bhardwaj, P., Rana, K., Vander, H., Bhandari, P. and Prabha, V. (2015). Sperm-impairing *Escherichia coli*, alcohol and male infertility: an *in vivo* study. *J. Med. Microb. Diagn.* **4**, 195. doi:
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* **254**, 197–215.
- Boomsma, J. J. and Ratnieks, F. L. W. (1996). Paternity in eusocial Hymenoptera. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **351**, 947–975.

- Boomsma, J. J., Baer, B. and Heinze, J. (2005). The evolution of male traits in social insects. *Annu. Rev. Entomol.* **50**, 395-420.
- Boomsma, J. J., Kronauer, D. J. C. and Pedersen, J. S. (2009). The evolution of social insect mating systems. In *Organization of Insect Societies* (ed. J. Gadau, J. Fewelle and E.O. Wilson), pp. 1-25. Cambridge, USA: Harvard University Press.
- Botsford, J. L. (1998). A simple assay for toxic chemicals using a bacterial indicator. *World J. Microbiol. Biotech.* **14**, 369-376.
- Bourgeon, F., Evrard, B., Brillard-Bourdet, M., Colleu, D., Jégou, B. and Pineau, C. (2004). Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biol. Reprod.* **70**, 768-774.
- Bretz, F., Hothorn, T. and Westfall, P. (2011). *Multiple Comparisons Using R*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Castella, G., Christe, P. and Chapuisat, M. (2009). Mating triggers dynamic immune regulations in wood ant queens. *J. Evol. Biol.* **22**, 564-570.
- Collins, A. M., Caperna, T. J., Williams, V., Garrett, W. M. and Evans, J. D. (2006). Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* **15**, 541-549.
- Coutinho, H. D. M., Vasconcelos, A., Lima, M. A., Almeida-Filho, G. G. and Alves, R. R. N. (2009). Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycoside antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky 1855). *BMC Complement Altern. Med.* **9**, 35.
- Dávila, F., Chérasse, S., Boomsma, J. J. and Aron, S. (2015). Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity. *J. Insect Physiol.* **78**, 9-14.
- Diemer, T., Huwe, P., Michelmann, H. W., Mayer, F., Schiefer, H. G. and Weidner, W. (2000). *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int. J. Androl.* **23**, 178-186.
- Fedorka, K. M., Zuk, M. and Mousseau, T. A. (2004). Immune suppression and the cost of reproduction in the ground cricket, *Allonemobius socius*. *Evolution* **58**, 2478-2485.
- Fedorka, K. M., Linder, J. E., Winterhalter, W. and Promislow, D. (2007). Post-mating disparity between potential and realized immune response in *Drosophila melanogaster*. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **274**, 1211-1217.
- Fraczek, M., Szumala-Kakol, A., Jedrzejczak, P., Kamieniczna, M. and Kurpisz, M. (2007). Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in *in vitro* model of semen inflammation. *Fertil. Steril.* **88**, 1076-1085.
- Gotoh, A., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ito, F. and Tsuji, K. (2017). Transcriptome profiling of the spermatheca identifies genes potentially involved in the long-term sperm storage of ant queens. *Sci. Rep.* **7**, 5972.
- Gwynn, D. M., Callaghan, A., Gorham, J., Walters, K. F. A. and Fellowes, M. D. E. (2005). Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **272**, 1803-1808.
- Hankiewicz, J. and Swierczek, E. (1974). Lysozyme in human body fluids. *Clin. Chim. Acta.* **57**, 205-209.
- Hölldobler, B. and Bartz, S. (1985). Sociobiology of reproduction in ants. In *Experimental Behavioral Ecology and Sociobiology* (ed. B. Hölldobler and M. Lindauer), pp. 237-257. Stuttgart, Germany: G Fischer Verlag.
- Hölldobler, B. and Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Cambridge, USA: Harvard University Press.
- Jothy, M. T., Moret, Y. and Rolff, J. (2005). Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Adv. Insect Physiol.* **32**, 1-48.
- Knell, R. J. and Webberley, K. M. (2004). Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biol. Rev.* **79**, 557-581.
- Kutter, H. and Stumper, R. (1969). Hermann Appel, ein leidgedeltes Entomologe (1892-1966). Proceedings of the VIth Congress of the International Union for the Study of Social Insects, Bern, 15-20 September, 1969 (ed. E. Ernst, L. Frauchiger, E. Hauschteck-Jungen, H. Jungen, R. Leuthold, A. Maurizio, E. Ruppli and P. Tschumi), pp. 275-279.
- Lahnsteiner, F. and Radner, M. (2010). Lysozyme activities and immunoglobulin concentrations in seminal plasma and spermatozoa of different teleost species and indications on its significance for sperm function. *Theriogenology* **74**, 246-254.
- Lawnczak, M., Barnes, A. I., Linklater, J. R., Boone, J. M., Wigby, S. and Chapman, T. (2007). Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 48-55.
- Lockey, T. D. and Ourth, D. D. (1996). Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by a cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* **236**, 263-271.
- Losdat, S., Richner, H., Blount, J. D. and Helfenstein, F. (2011). Immune activation reduces sperm quality in the great tit. *PLoS One* **6**, e22221.
- Lung, O., Kuo, L. and Wolfner, M. F. (2001). *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates. *J. Insect Physiol.* **47**, 617-622.
- Malta, J., Martins, G. F., Ermelinda Marques, A., Dias Games, P., Zanuncio, J. C., Baracat-Pereira, M. C. and Fernandes Salomão, T. M. (2014). Insights into the proteome of the spermatheca of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Florida. Entomol.* **97**, 1856-1861.
- Maroto, L. O., Cruz Muños, M. E., De Cupère, F., Van Driessche, E., Echemendia-Blanco, D., Machado Rodríguez, J. M. and Beeckmans, S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim. Reprod. Sci.* **120**, 95-104.
- McGraw, L. A., Gibson, G., Clark, A. G. and Wolfner, M. F. (2004). Genes regulated by mating, sperm, or seminal proteins in mated female *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **14**, 1509-1514.
- Monner, D. A., Jonsson, S. and Boman, H. G. (1971). Ampicillin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12 with lipopolysaccharide alterations affecting mating ability and susceptibility to sex-specific bacteriophages. *J. Bacteriol.* **107**, 420-432.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* **65**, 55-63.
- Otti, O. (2015). Genitalia-associated microbes in insects. *Insect. Sci.* **22**, 325-339.
- Otti, O., McTighe, A. P. and Reinhardt, K. (2013). *In vitro* antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Funct. Ecol.* **27**, 219-226.
- Papo, N. and Shai, Y. (2005). A molecular mechanism for lipopolysaccharide protection of Gram-negative bacteria from antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **280**, 10378-10387.
- Peng, Y., Grassl, J., Millar, A. H. and Baer, B. (2016). Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **283**, 20151785.
- Perry, J. C., Sirot, L. and Wigby, S. (2013). The seminal symphony: how to compose an ejaculate. *Trends Ecol. Evol.* **28**, 414-422.
- Poiani, A. (2006). Complexity of seminal fluid: a review. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **60**, 289-310.
- Poland, V., Eubel, H., King, M., Solheim, C., Millar, A. H. and Baer, B. (2011). Stored sperm differs from ejaculated sperm by proteome alterations associated with energy metabolism in the honeybee *Apis mellifera*. *Mol. Ecol.* **20**, 2643-2654.
- Prabha, V., Sandhu, R., Kaur, S., Kaur, K., Sarwal, A., Mavuduru, R. S. and Singh, S. K. (2010). Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. *Adv. Urol.* **2010**, 1-6.
- Pull, C. D., Hughes, W. O. H. and Brown, M. J. F. (2013). Tolerating an infection: an indirect benefit of co-founding queen associations in the ant *Lasius niger*. *Naturwissenschaften* **100**, 1125-1136.
- Radhakrishnan, P. and Fedorka, K. M. (2012). Immune activation decreases sperm viability in both sexes and influences female sperm storage. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **279**, 3577-3583.
- Rolff, J. and Siva-Jothy, M. T. (2002). Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *P. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9916-9918.
- Rowe, M., Czirik, G. A., McGraw, K. J. and Giraudeau, M. (2011). Sexual ornamentation reflects antibacterial activity of ejaculates in mallards. *Biol. Letters.* **7**, 740-742.
- Rowe, M., Czirik, G. A., Liffield, J. T. and Giraudeau, M. (2013). Lysozyme-associated bactericidal activity in the ejaculate of a wild passerine. *Biol. J. Linn. Soc.* **109**, 92-100.
- Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engstrom, A. and Hultmark, D. (1991). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **10**, 163-169.
- Schwenke, R. A., Lazzaro, B. P. and Wolfner, M. F. (2016). Reproduction-immunity trade-offs in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **61**, 239-256.
- Sheldon, B. C. and Verhulst, S. (1996). Ecological immunity: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 317-321.
- Shoemaker, K. L., Parsons, N. M. and Adamo, S. A. (2006). Mating enhances parasite resistance in the cricket *Gryllus texensis*. *Anim. Behav.* **71**, 371-380.
- Short, S. M. and Lazzaro, B. P. (2010). Female and male genetic contributions to post-mating immune defence in female *Drosophila melanogaster*. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **277**, 3649-3657.
- Šidák, Z. (1967). Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J. Amer. Stat. Assoc.* **62**, 626.
- Simmons, L. W. (2011). Resource allocation trade-off between sperm quality and immunity in the field cricket, *Teleogryllus oceanicus*. *Behav. Ecol.* **23**, 168-173.
- Sotirov, L., Dimitrov, S. and Jeliazkov, E. (2002). Semen lysozyme levels and semen quality in turkeys (*Meleagris gallopavo*) fed with various dietary protein levels. *Rev. Méd. Vet.-Toulouse* **12**, 815-818.
- Stearns, S. C. (1992). *The Evolution of Life Histories*. New York, USA: Oxford University Press.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Human Reproduction* **14**, 243-258.
- Valtonen, T. M., Viitaniemi, H. and Rantala, M. J. (2010). Copulation enhances resistance against an entomopathogenic fungus in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Parasitology* **137**, 985-989.
- von Wyschetzki, K., Lowack, H. and Heinze, J. (2016). Transcriptomic response to injury sheds light on the physiological costs of reproduction in ant queens. *Mol. Ecol.* **25**, 1972-1985.
- Yañiz, J. L., Marco-Aguado, M. A., Mateos, A. and Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.* **122**, 142-149.

Chapitre 4.

Immune activation at the time of mating affects bacterial abundance and communities in a social Hymenoptera.

Article en préparation

Immune activation at the time of mating affects bacterial abundance and communities in a social Hymenoptera

Francisco Dávila^{1*}, David Bauman^{2*}, Joël White³, Serge Aron¹

1. Evolutionary Biology and Ecology, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium.
 2. Laboratory of Plant Ecology and Biogeochemistry, Université Libre de Bruxelles, 1050 Brussels, Belgium.
 3. Laboratoire Evolution & Diversité Biologique, UMR 5174 CNRS-Université Paul Sabatier-IRD-ENSFEA, F-31062 Toulouse, France.
- * These authors contributed equally to this work.

Abstract

Microorganisms occur in sexual organs and are inevitably shared between partners during mating. Transmitted pathogens can reduce individuals' survival and damage gametes, hampering strongly the reproductive success of both sexes. In social Hymenoptera, males have typically completed their lifetime spermatogenesis when they reach sexual maturity and sperm is transferred to female spermatheca during a unique mating episode, at the beginning of adult life for both sexes. Males die shortly after copulation, whereas queens never remate later in life even though they may survive and reproduce for decades. Thus, the quality and quantity of sperm transferred at mating and stored in the female spermatheca cannot be restored if spermatozoa have been compromised.

Using ARISA, we determined the bacteria phlotypes (or 'operational taxonomic units' - OTU) and their abundances in the sexual organs of virgin males (accessory testes and accessory glands) and queens (spermatheca), and in somatic tissues (head-thorax homogenates), before and after mating. We show that (i) both the number and abundance of OTU varied between the sexes, and (ii) immune activation alters bacterial communities at the time of mating in both the spermatheca and somatic tissues of females: the number of OTU and bacterial abundance dropped in 1 day-mated queens, then increased in 24 days-mated queens. These results show, to our knowledge for the first time in a eusocial Hymenoptera, that copulation elicits a drastic immune flush in the sperm storage organ and somatic tissues of females, thereby affecting bacterial communities and abundance.

Introduction

Sexual reproduction is recognized as an important mode of horizontal transfer of microorganisms among partners (Smith & Dobson 1992; Lockhart *et al.* 1996). Viruses, bacteria, fungi and protists associated with the male and female sexual organs have been reported in a large variety of animals (reviewed in Lombardo 1998; Smith & Dobson 1992; Sheldon 1993; Lockhart *et al.* 1996; Knell & Webberley 2004; Otti 2015). Among these, both non-infectious and infectious agents can be passed on to the partner during mating. Such transmission represents a chance to receive beneficial symbiotic bacteria (Hupton *et al.* 2003), but also a risk of pathogen spread during copulation (Oriol & Hayward 1974; Smith & Dobson 1992). Sexual pathogens can reduce longevity of partners and, if vertical transmission occurs, offspring development and survival. They may also decrease fertility and fecundity by damaging sexual organs and gametes (Thrall *et al.* 2000; Kokko *et al.* 2002; Otti 2015). For example, bacterial infections can reduce spermatozoa motility (Eley *et al.* 2005) and survival (Galdiero *et al.* 1988; Otti *et al.* 2013). Sperm protection against infectious agents is therefore critical for the reproductive success of both sexes. The risk of pathogen transmission during copulation likely led to the early evolutionary appearance of an immune response involving the production of antibacterial substances that allow partners to overcome the threat (Lawniczak & Begun 2004; McGraw *et al.* 2008; Peng *et al.* 2005; Mack *et al.* 2006; Domanitskaya *et al.* 2007; Innocenti & Morrow 2009; Schwenke *et al.* 2016).

Owing to their particular reproductive biology, social Hymenoptera (all the ants, as well as the social bees and wasps) offer a unique opportunity to examine the effects of immune response on bacterial communities at the time of mating. Copulation occurs in a single day, early in life for both sexes; males and females never mate later again (Boomsma 2009). Males typically produce gametes during the nymphal stage and reach adulthood with a finite amount of spermatozoa. Testes atrophy shortly before or after emergence, so that males cannot subsequently increase their supply of sperm. Spermatozoa are stored in the accessory testes until mating. At ejaculation, the content of the accessory testes is mixed with the fluid produced by the accessory glands (Hölldobler & Bartz 1985; Baer 2005). The semen is deposited by the male into the *bursa copulatrix* of the queen, then migrates to her spermatheca where it will be stored for the rest of the queen's life (Tschinkel & Porter 1988; den Boer *et al.* 2009). Males die shortly after mating, while queens use the acquired sperm to fertilise their eggs for years, sometimes decades. The consequences of an infection during mating can therefore be dramatic for the partners' reproductive success, as the quality and quantity of sperm cannot be restored if spermatozoa are compromised.

Consistent with sexual intercourse triggering the immune system in social Hymenoptera, measurements of phenoloxydase activity and encapsulation response (two estimates of the non-specific immune response in arthropods) in the haemolymph and somatic tissues (head-thorax homogenates) showed an increase of the immune function within a few days after copulation in queens of the leaf-cutting ant *Atta colombica* (Baer *et al.* 2006), the wood ant *Formica paralugubris* (Castella *et al.* 2009) and the garden ant *Lasius niger* (Davila *et al.* 2015). Studies also documented an activation of the immune response in the sexual organs. Gene expression analyses showed the expression of two antibacterial peptides, abaecin and defensin, in the males' accessory testes and accessory glands, as well as in the *bursa copulatrix* and spermatheca of both virgin queens and artificially inseminated queens, in the leaf-cutting ants *A. colombica* and *Acromyrmex echinator* (Chérasse *et al.* 2018). And proteomic analyses of honeybee *Apis mellifera* drones seminal fluid revealed the presence of antifungal and antibacterial substances that are transferred to females during mating (Collins *et al.* 2006; Baer *et al.* 2009a, 2009b; Peng *et al.* 2016).

In a recent study, we documented marked variations in the antibacterial activity of the queen spermathecal fluid at the mating period, in the garden ant *L. niger* (Davila *et al.* 2018). We

showed that the fluid of the spermatheca from virgin queens had a strong antibacterial activity, which may be selected to eliminate the bacteria potentially carried by ejaculates. Notably, no such antibacterial activity was found in the somatic tissues of females. The antibacterial activity of the spermathecal fluid remained significant for 24 hours after mating; afterwards, however, it dropped rapidly and the spermatheca of 1 week-mated queens had lost its activity. A similar fluctuation over time in antibacterial activity was observed in somatic tissues. In males, antimicrobial substances involved in sperm protection originate from the accessory glands (Baer *et al.* 2009b, Chérasse *et al.* 2018); they are mixed to the content of the accessory testes at ejaculation (Hölldobler & Bartz 1985; Baer 2005). No antibacterial activity was found in the accessory testes and in the somatic tissues of males.

Whereas the production of antibacterial substances associated with sexual organs, their source of synthesis, their composition and their activity on bacterial growth have received considerable attention in social Hymenoptera, particularly ants and the honeybee, their actual effect on bacterial communities at the time of mating remains completely unstudied. Using Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analyses (ARISA - Ranjard *et al.* 2000), we determined the bacteria phylotypes (or 'operational taxonomic units' - OTU) and their abundances in the males' accessory testes and accessory glands and in the female spermatheca (hereafter referred to as the male and female sexual organs, SO). Our study species was the black garden ant *Lasius niger* (Linnaeus). Queens of this species mate with a single or a few males during large nuptial flights, then lay fertilised eggs their entire live which can last for decades (Kutter & Stumper 1969). The total number of OTU and their respective abundance were quantified in the SO of males and females before the mating flight, and in the SO of queens 1 day and 24 days post-mating. We also compared changes in bacterial community structure between sexes and among females across time.

Methods

Sampling

Virgin queens and males of *L. niger* were collected from field colonies in Brussels (Belgium) a few days before the mating flights. They were reared in laboratory nests with *ad libitum* water, and fed sugar water and mealworms. Freshly mated queens were caught on the day of the flight, and were placed individually in laboratory nests containing water only (young queens do not eat during the founding phase).

The different OTU, their number and the abundance of bacteria (*i.e.*, the sum of bacterial abundances of all OTU from a sample) were investigated in two types of biological tissues. First, we studied the sexual organs (SO) of males and female sexuals. For males, we analysed the accessory testes and the accessory glands; for females, we analysed the spermatheca. We sampled virgin males, as well as females at different time points: before mating (gynes), and mated queens 1 day and 24 days after the nuptial flight. Second, we determine the number of OTU and the abundance of bacteria in the somatic tissues by analysing head-thorax homogenates (HTH) of each individual sampled.

Dissections

Individuals were dissected under a laminar flow cabinet sterilised with ethanol 90%, then with liquid bleach 70%. Individuals were dissected in autoclaved milliQ water with sterilised forceps (rinsed with ethanol 90% followed by exposition to a flame between each tissue removal). The head and thorax were removed and placed in a micro-tube containing 10 μ L of sterilized water. The abdomen was dissected and the SO were removed, rinsed 3 times in sterilized water, and placed in a 10 μ L drop of clean water. To control for any possible contamination during dissection, we also sampled 10 μ L of the autoclaved milliQ water (*i*) before dissection and (*ii*) used for the third rinsing of the SO (see below). All samples were immediately frozen and maintained at -20°C till DNA analysis.

ARISA

This method is based on the amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region located in the ribosomal operon (Ranjard *et al.* 2000). This is a non-coding region. Both the sequence and the length of the ITS region are highly variable between prokaryotic species, allowing to discriminate between OTU and establish a bacterial fingerprint of each sample. Furthermore, the amplification and sequencing generate an ARISA profile in which the intensity of the signal detected corresponds to the abundance of each OTU (Yannarell & Triplett 2005).

SO containing tiny amounts of fluid (ca. 0.2 μ l), a lack of bacterial presence in these organs may stem from detection failure. To discard this possibility, we pooled by three samples of a same tissue and time point; this method increased detection power but divided consequently the number of samples. The same procedure was used for HTH. DNA extraction, amplification and genotyping were performed following White *et al.* (2010). DNA extractions were performed with the Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit and the standard protocol designed for the purification of total DNA from gram-positive bacteria (Qiagen, Venlo, Netherlands). ITS was amplified using the FAM (6-carboxyfluorescein)-labelled primers S-D-Bact-1522-b-S-20 (5'-[6FAM]TGCGGCTGGATCCCCCTCCTT-3') and L-D-Bact-132-a-A-18 (5'-CCGGGTTTCCCCATTTCGG-3') (Ranjard *et al.* 2000). Amplification was performed in 20 μ L solution containing 200 μ M dNTPs, 5% (v:v) Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 0.5 μ M of each primer, and 0.25 units GoTaq DNA-polymerase with the corresponding 5x PCR buffer (Promega, Fitchburg, WI, USA), as follows: initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturizing at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min, and a final elongation at 72°C for 10 min. PCR products of 2 μ L were then mixed with 8 μ L of ionized formamide and 0.1 μ L GeneScan-2500 Rhodamine X-labelled size standard (Applied

Biosystem, Carlsbad, CA, USA). The mixtures were denaturated at 95°C for 5 min before separation on a capillary sequencer ABI 3730 (Applied Biosystem). To control for any possible contamination during extraction, amplification or genotyping, the procedure described above was repeated without biological samples that is, on autoclaved miliQ water solely.

Across all samples, DNA fragments ranged from 261 to 815 bp in size and corresponded to a total of 73 OTU. Among these, 22 OTU occurred in both biological tissues (SO and HTH) and control samples (dissection or ARISA controls). To avoid any bias due to possible contamination, these OTU were removed from the analyses, leaving us with 51 OTU. This conservative approach allowed us to take into account data from non-contaminated biological tissues only.

Analyses

The total number of OTU found in the SO and HTH of males and females, as well as the number of OTU common to two biological tissues were counted (Table 1). For bacterial abundance, data were analysed separately for males and females due to the difference in the nature of the sexual organs. Virgin queens and mated queens at two time points (1 and 24 days after mating) were treated as different levels of the ‘time point’ factor. A second variable – ‘tissue’ – had three levels in males (accessory testes, accessory glands, and HTH), and two levels in females (spermatheca and HTH). For females, we analysed bacterial abundances using a two-way crossed-factor ANOVA adapted to unbalanced designs to test for an interaction between the factors time point and tissue. The analysis was tested by 999 permutations. Since the global test was significant (see Results section), a multiple comparison approach was used to test for differences in the bacterial abundance. For males, a multiple comparison was also used to compare the bacterial abundances in SO. Because a *P*-value correction for multiple tests had to be applied to avoid a risk of type I error rate inflation (Bretz *et al.* 2011), we only conducted the tests for the relevant comparisons to maintain a high statistical power. These pairwise comparisons were performed with one-tailed permutational *t*-tests on the median of the distributions, in the lower or upper tail depending on the expectations. The latter were related to the activation of the immune system triggered by the copulation for females (Davila *et al.* 2018) and to the antibacterial activity of accessory glands in males (Baer *et al.* 2009b, Chérasse *et al.* 2018). Accordingly, our assumptions were (i) a decrease of bacterial abundance from gyne to queen after 1 day, and subsequent increase between 1 and 24 days, and (ii) a lower bacterial abundance in accessory glands compared with accessory testes. The resulting *P*-values were adjusted with the Šidák method (Šidák 1967). Statistical analyses were performed in the R environment (v.3.4; R Development Core Team 2014).

Results

Bacterial abundances

As predicted (see *Analyses*), the bacterial abundances of all OTU were significantly higher in the males' accessory testes than in the accessory glands where antimicrobial substances are produced (permutation *t*-test: $t = 1.48$, $P = 0.005$) (Figure Aa).

Concerning females, bacterial abundances varied significantly between time points and the tissue, and those two factors presented a significant interaction (permutation two-way crossed-factor ANOVA: $F = 52.5$, $P = 0.001$). The abundances of bacteria in the spermatheca decreased between gynes and 1 day-mated queens ($t = 4.1$, $P = 0.016$), then increased from 1 to 24 days after mating ($t = -3.1$, $P = 0.018$) (Figure 1b). A comparable fluctuation over time occurred for the HTH; bacterial abundances dropped between gynes and 1-day mated queens ($t = 6.3$, $P = 0.016$), then increased between 1 and 24 days-mated queens ($t = -7.0$, $P = 0.017$) (Figure 1d).

Total number of OTU and occurrence in biological samples

The total number of OTU per biological tissue and the number of OTU common to SO and HTH pairs are given in Table S1. HTH bore much more OTU than SO. From the 51 OTU revealed by the ARISA, 22 occurred in the male and female SO (see Supplementary Material, Table S1). Thirteen were found in virgin males: 11 in the accessory testes and 3 in the accessory glands, with one OTU common to both tissues (Figure 2). All the OTU found in the SO but one (OTU 851, which is present in the accessory testes only) were also detected in the males' HTH. In females, the total number of OTU in the SO (*i.e.*, the spermatheca) varied from 3 to 4 in virgin and 1 day-mated queens, respectively, to 10 OTU in 24 days-mated queens (Figure 2). None of the OTU present in the female spermatheca at a given time point (gynes, queens 1 or 24 days) occurred at the other time points (Figure 2 and S1), indicating that bacterial communities in the SO varied over time. Large fluctuations in the total number of OTU in HTH were also observed; it decreased from 35 OTU in gynes to 9 OTU in 1 day-mated queens, then increased to 20 OTU in 24 days-mated queens (Table S1).

From the 13 OTU detected in the males' SO, none was found in the spermatheca of 1 day-mated queens. By contrast, 6 were found in the spermatheca of queens 24 days after mating (OTU 346, 380, 454, 482, 851 from the male accessory testes and OTU 433 from the male accessory glands; Table S1). A large proportion of the OTU found in the HTH of females were also present in the HTH of males; several of these OTU were similar across time points for females.

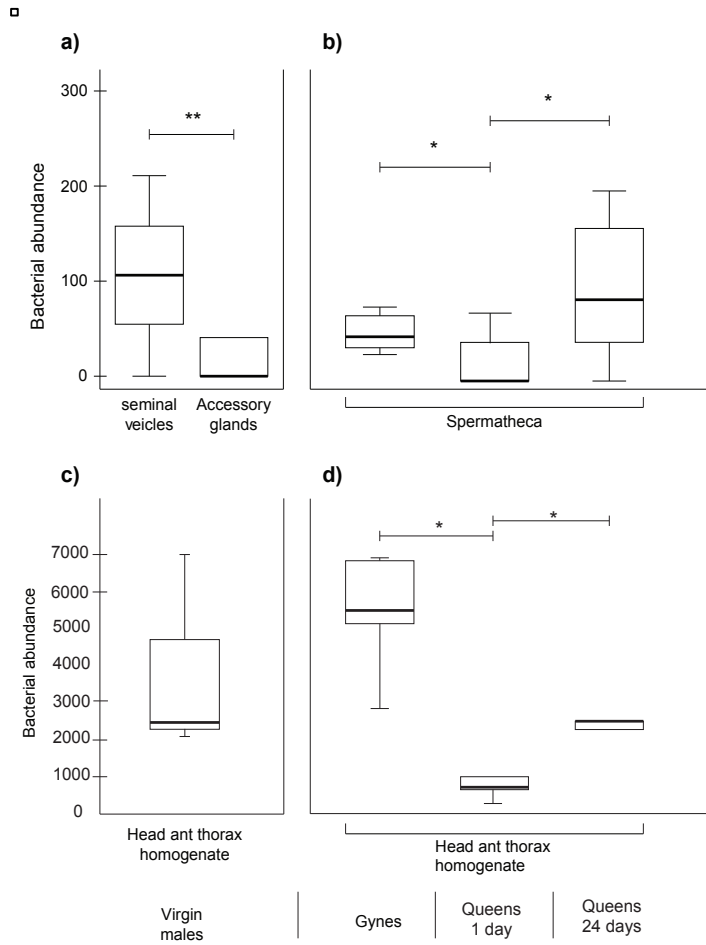
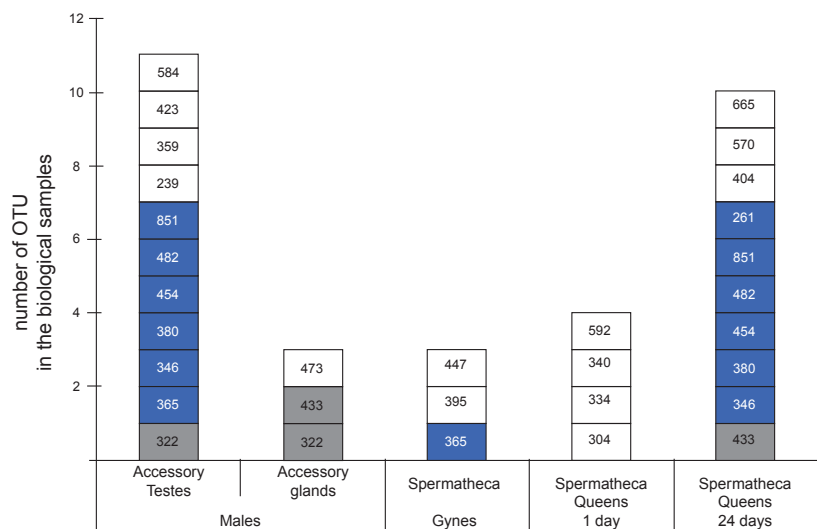


Figure 1. Bacterial abundance of a) virgin males sexual organs; b) females spermatheca; c) virgin males head and thorax homogenate; c) females head and thorax homogenate. The stars above horizontal bars indicate the significant pairs detected by the permutation t-tests. The lower and upper limits of the boxes represent the first and third quartiles of the distribution, and comprise the median value (thick horizontal bar). The lower and upper whiskers cover the range of the two remaining 25% of the distribution. The level of significance is as follows: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Figure 2. OTU present in the different biological samples. The identification number of each OTU is given in the boxes. Coloured boxes correspond to OTU present in several samples. OTU present only in the biological sampled that contains them are given in white.



Discussion

Our results show that an immune ‘flush’ at the time of mating affects bacterial abundances and communities in the spermatheca and somatic tissues of *L. niger* females. Bacterial abundances decreased immediately after copulation then increased in 24 days-mated queens. In males, bacterial abundance was relatively high in the males’ accessory testes but largely reduced in the accessory glands. These results mirror the antibacterial activity (ABA) previously reported by Davila *et al.* (2018) in the same species, showing that ABA in the SO and HTH increases at the period of mating, then decreases in the following days/weeks.

The relative abundance of bacteria in the spermatheca of virgin queens was unexpected, since this organ is characterized by a strong ABA before mating (Davila *et al.* 2018). These bacteria belonged, however, to 3 OTU only. This suggests that the antibacterial substances contained in the spermatheca of virgin queens do not specifically target these bacterial phylotypes and/or that the latter do not represent a threat for the females. These 3 OTU also occurred in HTH, suggesting that bacteria encounter no great barrier between somatic and sexual tissues. One day after mating, bacterial abundance in both the spermatheca and HTH of queens decreased dramatically, consistent with a strong immune flush. Antibacterial substances eliminated all the bacteria present in the spermathecae of virgin queens, as not a single OTU initially present in the gyne’s sperm storage organ was recovered in this tissue in 1 day- and 24 days-mated queens – the latter being characterized by very low levels of ABA. These antibacterial substances may originate from (i) the male accessory glands, (ii) the *bursa copulatrix* of virgin or freshly mated queens, (iii) the spermatheca of virgin or freshly mated queens, or (iv) the activation of the general immune system of females following mating (Baer *et al.* 2009b, Chérasse *et al.* 2018; Mack *et al.* 2006; McGraw *et al.* 2008; Davila *et al.* 2018). Twenty-four days after mating, bacterial abundance significantly increased in both the SO and somatic tissue, consistent with relaxed ABA four weeks after mating. The OTU found in the queen spermatheca differed from those present in virgin and 1 day-mated queens. One may not completely exclude, however, that these bacteria phylotypes were present in very small amount due to intense ABA in virgin and 1 day-mated queens, hence remained undetected. Notably, 6 OTU present in the males’ sexual organs, but absent in virgin queens, were found in the queen spermatheca 24 days after mating. Whether these bacteria phylotypes were horizontally transferred from the males to the females during copulation, or remained undetected in the spermatheca of virgin and 1 day-mated queens cannot be ascertained.

For males, the low abundance of bacteria in the accessory glands is in line with these tissues producing peptides involved in sperm protection against microorganisms (Baer *et al.* 2009b, Chérasse *et al.* 2018). On the other hand, the presence of bacteria in the accessory testes is consistent with the lack of ABA detected in this tissue. Given their abundance and diversity, one may reasonably assume that these bacteria are not harmful to spermatozoa. This hypothesis is also supported by the fact that 6 OTU out of 13 found in the male SO also occurred in the spermatheca of queens 24 days after mating. This suggests a long-term sperm-bacteria association rather than punctual parasitism or opportunism. Beneficial bacteria producing bacteriocins lethal to resident pathogenic strains or helping in the synthesis and absorption of nutrients were indeed reported in a number of vertebrates (Stevens & Hume 1998; Lombardo *et al.* 1999). Whether the OTU shared by virgin males and 24 days-mated queens in the ant *L. niger* contribute to spermatozoa protection, nutrition or maintenance certainly awaits further studies.

To conclude, our study provides the first evidence of the effect of immune activation triggered by copulation on actual bacterial abundance and communities in a social Hymenoptera. It shows that both the abundance of bacteria and the number of OTU in the female sperm storage organ and somatic tissues experience a drastic immune flush at the time of mating, and that this flush alters bacterial communities. Overall, these findings may shed light

on our understanding of the processes involved in sperm protection around mating, and stimulate further research on the identification and the role of sperm associated bacteria in sperm conservation by long-lived females of social insects.

Acknowledgements

This work was supported by a Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA; F.D.), and Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS; scholarship, D.B.; grant no. 23602640, S.A.).

Références

- Baer B, Krug A, Boomsma JJ, Hughes WHO. 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. *Insect Soc.* 52: 298–303
- Baer B, Armitage SAO, Boomsma JJ. 2006. Sperm storage induces an immunity cost in ants. *Nature.* 441: 872–75
- Baer B, Eubel H, Taylor NL, O'Toole N, Millar AH. 2009a. Insights into female sperm storage from the spermathecal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Genome Biol.* 10:R67
- Baer B, Heazlewood JL, Taylor NL, Eubel H, Millar AH. 2009b. The seminal fluid proteome of the honeybee *Apis mellifera*. *Proteomics.* 9:2085–97
- Benhalima K, Moriyasu M. 2001. Prevalence of bacteria in the spermathecae of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). *Hydrobiologia.* 449: 261-266
- Boomsma JJ. 2009. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos T R Soc B.* 364: 3191-3207
- Bretz F, Hothorn T, Westfall P. 2011. Multiple comparisons using R. Boca Raton, USA: CRC Press
- Castella G, Christe P, Chapuisat M. 2009. Mating triggers dynamic immune regulations in wood ant queens. *J Evol Biol.* 22, 564-570
- Chérasse S, Baer B, Schiøtt M, Boomsma JJ. 2018. Differential immune gene expression in sperm storage organs of leaf-cutting ants. *J Exp Biol.* 221: jeb173435
- Collins AM, Caperna TJ, Williams V, Garrett WM, Evans JD. 2006. Proteomic analyses of male contributions to honey bee sperm storage and mating. *Insect Mol. Biol.* 15: 541–49
- Dávila F, Chérasse S, Boomsma JJ, Aron S. 2015. Ant sperm storage organs do not have phenoloxidase constitutive immune activity. *J Insect Physiol.* 78: 9-14
- den Boer SPA, Baer B, Dreier S, Aron S, Nash DR, Boomsma JJ. 2009. Prudent sperm use by leafcutter ant queens. *Proc R Soc London B Biol Sci.* 276: 3945-3953
- Domanitskaya EV, Liu H, Chen S, Kubli E. 2007. The hydroxyproline motif of male sex peptide elicits the innate immune response in *Drosophila* females. *FEBS J.* 274: 5659–68
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Geary I, Pacey AA. 2005. Apoptosis of ejaculated human spermis induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Human Reprod.* 20: 2601-2607
- Galdiero F, Gorga F, Bentivoglio C, Mancuso R, Galdiero E, Tufano MA. 1988. The action of LPS porins and peptidoglycan fragments on human spermatozoa. *Infection.* 16: 349–353
- Innocenti P, Morrow EH. 2009. Immunogenic males: a genome-wide analysis of reproduction and the cost of mating in *Drosophila melanogaster* females. *J Evol Biol.* 22: 964–73
- Hirsh DC. 1999. The genital tract as a Microbial habitat. *Veterinary Microbiology.* Hirsh DC & Zee YC, Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp. 190-191
- Hölldobler B, Wilson EO. 2009. The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies. WWNorton & Co. New York - USA. pp 544

- Hupton G, Portocarrero S, Newman M, Westneat DE. 2003. Bacteria in the reproductive tracts of red-winged blackbirds. *Condor*. 105: 453–464
- Knell RJ, Webberley KM. 2004. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biol Rev*. 79:557–581
- Kokko H, Ranta E, Ruxton G, Lundberg P. 2002. Sexually transmitted disease and the evolution of mating systems. *Evolution* 56: 1091–1100
- Kutter H, Stumper R. 1969. Hermann Appel, ein leidgedelter Entomologe (1892-1966). Proceedings of the VIth Congress of the International Union for the Study of Social Insects, Berne, 15-20 September, 1969 (ed. E. Ernst, L. Frauchiger, E. Hauschteck-Jungen, H. Jungen, R. Leuthold, A. Maurizio, E. Ruppli and P. Tschumi), pp. 275-279
- Lawniczak M, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T. 2007. Mating and immunity in invertebrates. *Trends Ecol Evol*. 22, 48-55
- Lockhart AB, Thrall PH, Antonovics J. 1996. Sexually transmitted diseases in animals: ecological and evolutionary implications. *Biol Rev* 71: 415-471
- Lombardo MP. 1998. On the evolution of sexually transmitted diseases in birds. *J Avian Biol*. 29: 314-321
- Mack PD, Kapelnikov A, Heifetz Y, Bender M. 2006. Mating-responsive genes in reproductive tissues of female *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:10358–63
- McGraw LA, Clark AG, Wolfner MF. 2008. Post-mating gene expression profiles of female *Drosophila melanogaster* in response to time and to four male accessory gland proteins. *Genetics* 179:1395–408
- Nimrat S, Bart AN, Keatsaksit A, Vuthiphandchai V. 2008. Microbial flora of spermatophores from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) declines over long-term cryostorage. *Aquaculture*. 274: 247-253
- Oriel JD, Hayward AHS. 1974. Sexually transmitted diseases in animals. *Br J Vener Dis*. 50: 412-420
- Otti O, McTighe AP, Reinhardt K. 2013. In vitro antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Funct Ecol*. 27: 219-226
- Otti O. 2015. Genitalia-associated microbes in insects. *Insect Sci*. 22: 325-339. doi: 10.1111/1744-7917.12183
- Peng Y, Grassl J, Millar AH, Baer B. 2016. Seminal fluid of honeybees contains multiple mechanisms to combat infections of the sexually transmitted pathogen *Nosema apis*. *Proc R Soc B-Biol Sci* 283: 20151785
- R Development Core Team. 2014. R: A language and environment for statistical computing. - R Foundation for Statistical Computing
- Raina A, Murphy C, Florane C, Williams K, Park YI, Ingber B. 2009. Structure of spermatheca, sperm dynamics, and associated bacteria in Formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am*. 100: 418–424
- Ranjard L, Brothier E, Nazaret S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Appl Environ Microbiol*. 66: 5334–5339
- Reinhardt K, Naylor R, Siva-Jothy MT. 2005. Potential sexual transmission of environmental microbes in a traumatically inseminating insect. *Ecol Entomol*. 30: 607-611
- Sheldon BC. 1993. Sexually transmitted diseases in birds : occurrence and evolutionary significance. *Philos T R Soc Lon B*. 339: 491-497
- Smith G, Dobson AP. 1992. Sexually transmitted diseases in animals. *Parasitol Today*. 8: 159-166
- Šidák Z. 1967. Rectangular confidence regions for the means of multivariate normal distributions. *J Amer Stat Assoc*. 62: 626
- Schwenke RA, Lazzaro BP, Wolfner MF. 2016. Reproduction immunity trade-offs in insects. *Annu Rev Entomol*. 61: 239-256

- Stevens CE, Hume ID. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol Rev.* 78: 393-427
- Thrall PH, Antonovics J, Dobson AP. 2000. Sexually transmitted diseases in polygynous mating systems: prevalence and impact on reproductive success. *P Roy Soc Lond B Bio.* 267: 1555–1563
- Tschinkel WR, Porter SD. 1988. Efficiency of sperm use in queens of the fire ant, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Ann Entomol Soc Am.* 81: 7777-7781

Discussion

Discussion

Les fourmis disposent de plusieurs mécanismes permettant d'optimiser le maintien et la survie des spermatozoïdes, depuis leur production par les mâles jusqu'à leur stockage final par les reines. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse apportent de nouvelles perspectives quant à l'investissement des individus dans les processus de reproduction, et soulignent des compromis possibles avec la fonction du développement, la fonction immunitaire et l'association à long terme entre le sperme et des bactéries. Premièrement, nous avons montré chez la fourmi d'Argentine *L. humile* qu'en situation de carence alimentaire un compromis s'installe entre le développement somatique et la production de spermatozoïdes. Ni le développement des mâles ni la qualité des spermatozoïdes ne sont affectés par la carence mais le nombre de cellules spermatiques produites par les mâles carencés est inférieur à celui produit par les mâles contrôles (Chapitre 1). Deuxièmement, nous avons testé - pour la première fois - la présence et l'activité de deux composantes principales du système immunitaire dans les organes sexuels de fourmis vierges et accouplés (PO et ABA). Nous montrons, chez *Lasius niger*, que la protection des spermatozoïdes fait appel à des systèmes spécifiques et variables dans le temps. De plus, nous amenons une étude plus approfondie sur les variations temporelles de ces réponses immunitaires dans le système général des insectes avant et après l'accouplement (Chapitres 2 et 3). Finalement, notre étude des abondances et communautés bactériennes présentes dans les tissus sexuels et somatiques analyse ces microorganismes comme une composante inhérente à la reproduction et décrit l'impact des défenses immunitaires déclenchées par l'accouplement sur leurs communautés (Chapitre 4).

1. Trajet du sperme et réactions immunitaires liées à l'accouplement

Les besoins énergétiques pour la production des spermatozoïdes entrent en compétition pour les ressources avec le développement et/ou le maintien d'autres systèmes et organes. Le développement des organes liés au vol et à l'accouplement est essentiel pour le succès reproducteur des mâles. Une forte sélection, optimisant les caractères somatiques liés à la reproduction, favorise le développement du corps des mâles face à la production de spermatozoïdes. Cet avantage au développement somatique dans le compromis énergétique qui l'oppose à la reproduction semble cohérent : l'impossibilité de trouver un partenaire rend tout investissement dans la production du sperme vain. Cependant, la viabilité des spermatozoïdes n'est pas affectée par ce compromis (Chapitre 1), ce qui met en évidence l'importance de ce caractère dans le succès reproducteur des mâles.

Une fois le sperme produit, il migre dans les vésicules séminales du mâle où il est stocké pendant plusieurs jours - voire quelques semaines en attendant l'accouplement. Le système non-spécifique de la prophénoloxydase (proPO) est absent de ces organes ainsi que des organes sexuels femelles (Chapitre 2), évitant ainsi l'exposition des spermatozoïdes à des dérivés potentiellement toxiques produits par les chaînes de réactions de ce système (Dougherty and Dougherty 1989, 1990). De même, dans les vésicules séminales nous n'avons trouvé aucune trace d'activités antibactériennes (ABA)(Chapitre 3). Les peptides antimicrobiens peuvent également avoir des effets toxiques pour les cellules spermatiques (Boman 2003), et leur absence dans les vésicules séminales est cohérente avec cet effet, compte tenu du rôle de stockage du sperme joué par ces organes. Au contraire, le liquide

des vésicules séminales favorise la croissance bactérienne, ce qui lui permet d'accueillir une relativement grande abondance et diversité de groupes bactériens (Chapitre 3 et 4). Nous postulons que ces bactéries, vu leur abondance et leur diversité, ne sont pas des pathogènes, mais jouent un rôle bénéfique pour la survie des spermatozoïdes, par exemple, en les préservant d'infections extérieures, ne fût-ce que par l'occupation de la niche. Par ailleurs, chez les mâles vierges, les défenses immunes détectées dans le broyat de la tête-thorax sont relativement faibles (Chapitres 2 et 3). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés chez *Acromyrmex echinator*, *Atta colombica* et *Formica exsecta* (Baer *et al.* 2005 ; Stürup *et al.* 2014 et Vainio *et al.* 2004) évoqués dans le chapitre d'introduction (page 20). Une hypothèse supplémentaire à leur faible immunité pourrait être que les mâles bénéficient de l'immunité sociale de la colonie et n'ont plus besoin d'investir dans leur propre immunité. En déléguant ainsi leurs défenses immunes, ils peuvent investir leur énergie dans le développement et la reproduction.

Au moment de l'accouplement, le contenu des vésicules séminales (spermatozoïdes + substances nutritives et métaboliques + bactéries, ...)(Collins *et al.* 2006 ; Baert *et al.* 2009b ; Otti 2015) est mélangé à celui des glandes annexes avant d'être éjaculé. Nos travaux de détection de PO ou d'ABA n'ont pas porté sur les glandes annexes pour des raisons d'échantillonnage : ces organes étant très spongieux, il était impossible de prélever un liquide permettant de suivre le protocole de détection de PO ou d'ABA. Cependant, nous savons par le biais d'autres travaux (Collins *et al.* 2006 ; Baer *et al.* 2009b ; Chérasse *et al.* 2018) que des peptides antifongiques et antibactériens sont produits dans les glandes annexes des mâles. L'abondance bactérienne et le nombre de phylotypes bactériens étant très faibles dans les glandes annexes (Chapitre 4), nos mesures confirment l'action des peptides antibactériens dans ces organes et laissent supposer que les bactéries qui proviennent des vésicules séminales sont exposées à- et en grande partie éliminées par l'apport des substances antibactériennes provenant des glandes annexes.

Le sperme est ensuite éjaculé dans la *bursa copulatrix* des femelles (Baer 2011). L'activité antibactérienne dans cet organe n'a pas été testée dans notre étude, cependant des analyses d'expression génétique montrent l'activité d'au moins deux gènes codant pour des peptides antibactériens : abaécine et défensine (Chérasse *et al.* 2018). Des tests préliminaires réalisés chez des gynés et des reines de *L. niger* un jour après l'accouplement montrent que l'abondance bactérienne et le nombre de phylotypes bactériens dans la *bursa copulatrix* sont très faibles, ce qui concorde avec la présence de substances antibactériennes, et laisse présager que cet organe joue un rôle déterminant contre les bactéries qui pourraient être transmises lors de l'accouplement. Ces résultats ne sont pas publiés à ce stade à cause d'un trop faible échantillonnage. Les spermatozoïdes migrent ensuite vers la spermathèque où ils sont stockés de manière définitive. Chez les gynés, cet organe présente une forte activité antibactérienne (Chapitre 3) ce qui suggère que la spermathèque s'apprête à recevoir un liquide possiblement « contaminé ». Malgré cette forte ABA, quelques phylotypes bactériens s'y développent en abondance (Chapitre 4). Ces phylotypes ne semblent donc pas ciblés par le système immunitaire des femelles. Ils disparaissent chez les reines accouplées. Leur possible rôle dans la reproduction des fourmis reste à déterminer.

Suite au vol nuptial, le système immunitaire général, jusqu'alors au repos, active la cascade de la phénoloxydase (Chapitre 2) et déclenche la production de substances antibactériennes (Chapitre 3) qui éliminent une grande partie des bactéries présentes sur et dans la reine (Chapitre 4). Cet effet se répercute également dans la spermathèque de la reine où nous constatons une chute drastique de l'abondance bactérienne et du nombre de

phylotypes bactériens présents (Chapitre 4). L'activité antibactérienne dans la spermathèque de la reine est pourtant inférieure à celle de la gyne (Chapitre 3), mais les bactéries potentiellement apportées par le sperme ont dû faire face aux peptides antimicrobiens produits par (i) les glandes accessoires des mâles, (ii) la *bursa copulatrix* de la gyne, (iii) la spermathèque et (iv) l'activation du système immunitaire général suite à l'accouplement. Face à ces barrières immunitaires, il est compréhensible que très peu de bactéries puissent persister au sein de la spermathèque. Les groupes bactériens qui étaient présents chez la gyne s'éteignent, mais étonnamment certains groupes qui étaient présents dans les vésicules séminales des mâles ainsi que sur des organes externes non-sexuels des deux partenaires s'y développent quelques semaines après l'accouplement (Chapitre 4). Ce développement est permis par une dépression du système immunitaire général dans les semaines qui suivent l'accouplement (Chapitres 2 et 3). Les réserves de PO se reconstituent et l'activité antibactérienne chute puis se stabilise à de très faibles niveaux. Cette période concorde avec les premières pontes, où la reine, qui a trouvé un lieu pour fonder sa colonie, commence à investir dans la reproduction et n'aura plus ou très peu recours à son système immunitaire. Les bactéries présentes dans la spermathèque 24 jours après l'accouplement n'en seront probablement plus délogées, suggérant une association à long terme, et une possible implication de celles-ci dans le maintien et la protection des spermatozoïdes dans la spermathèque des reines.

2. Considérations méthodologiques

Ce travail présente un fort caractère exploratoire en ce qui concerne tant les problématiques envisagées (compromis entre le développement somatique et la reproduction en conditions de carence alimentaire, mécanismes immunitaires actifs lors de l'accouplement (PO, ABA), caractérisation des communautés bactériennes présentes dans les organes sexuels) que les techniques utilisées pour y répondre. Ainsi, l'étude de chacun des chapitres a fait l'objet de mises au point méthodologiques souvent longues et complexes. Par ailleurs, nos résultats soulèvent plusieurs questions qui méritent d'être abordées dans le futur.

Le dosage de la phénoloxydase est-il une mesure directe de l'activité immunitaire ?

Les différents travaux ayant traité de l'activation du système immunitaire par des dosages de phénoloxydase, de prophénoloxydase (sa forme zymogène), d'encapsulation ou de mélanisation (voir par exemple. Barnes et Siva-Jothy 2000 ; Baer *et al.* 2006 ; Castella *et al.* 2009) traitent ces mesures comme des indicateurs directs de l'activité immunitaire : plus il y a de proPO (ou un de ses dérivés), plus forte est l'activité immunitaire. Cette interprétation de la réponse immunitaire peut être fortement biaisée. En effet, la phénoloxydase est une enzyme très réactive qui n'est libérée qu'en cas d'activation du système immunitaire et qui est rapidement dégradée. La détection d'une faible teneur en PO indique donc que le système n'est pas soumis à un stress au moment précis de la mesure ; il ne donne par contre aucune indication quant à son activation préalable. La mesure de la proPO renseigne, elle, sur les réserves de PO dont dispose l'individu : une faible teneur en proPO reflétant une activation du système dans les heures qui précèdent l'analyse. Ainsi, une haute teneur en proPO implique que les réserves sont pleines et donc que le système immunitaire est inactif, au contraire une faible teneur en proPO signifie que le système a été activé ou est actif puisque les réserves ont été utilisées. Ce mécanisme peut changer fondamentalement l'interprétation d'un résultat, amenant à des compréhensions radicalement différentes d'un

phénomène biologique. Par exemple, dans son analyse de la réponse immunitaire avant et après l'accouplement chez *Atta colombica*, l'équipe de Baer (2006) interprète le faible taux d'encapsulation d'un morceau de nylon introduit sous la cuticule de la reine le lendemain de l'accouplement comme étant une mesure d'une faible activité du système immunitaire, et le haut taux d'encapsulation mesuré 9 jours après comme une activation du système immunitaire. Or, pour déclencher l'encapsulation il est nécessaire d'avoir des réserves de PO. Si l'encapsulation est faible cela signifie que les réserves de PO étaient vides et, partant, que le système immunitaire a été activé peu de temps avant l'infection. De même, si l'encapsulation est forte cela reflète que les réserves en pro-PO étaient pleines et, donc, que le système immunitaire était inactif à ce moment précis. Notre interprétation (forte activité immunitaire le lendemain de l'accouplement, puis faible activité 9 jours après) dit l'exact contraire que ce qui est soutenu par Baer *et al.* (2006), selon qui l'activité du système immunitaire est faible le lendemain de l'accouplement et forte 9 jours après.

Quelles alternatives au protocole de mesure de l'activité antibactériennes ?

Les résultats du Chapitre 3 consacrés à la mesure de l'activité antibactérienne dans les organes sexuels des mâles et des femelles de *L. niger* sont robustes. Ils ont été obtenus par une méthode fiable reconnue d'autres domaines de la biologie (Mosmann 1983 ; Cory *et al.* 1991 ; Berrige *et al.* 2005). Dans le protocole utilisé, les échantillons à tester sont incubés avec une quantité connue de bactéries. Celles-ci sont ensuite mises en présence d'un substrat (le MTT) qui sera pris en charge par la chaîne respiratoire des bactéries et transformé en un produit coloré (le formazan) dont on mesure l'absorbance pour extrapoler une quantité relative de bactéries. Ce n'est donc pas une mesure directe de la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon, ce qui peut sembler critiquable. De plus, le substrat (MTT) peut également être pris en charge et transformé en formazan par la chaîne de respiration des spermatozoïdes, ce qui biaise la mesure tirant les résultats vers des valeurs d'ABA plus faibles. Dans le cas présent, la production de formazan par les spermatozoïdes est négligeable, par rapport à la production de ce composé par les bactéries, en raison du grand nombre de bactéries utilisées pour le test. L'activité antibactérienne significative trouvée le lendemain de l'accouplement, et l'ABA nulle trouvée 2 et 4 semaines après l'accouplement montrent que la présence des spermatozoïdes ne tirent pas les résultats vers des valeurs négatives d'ABA malgré la présence de spermatozoïdes. Dans l'étude présente, ce biais ne porte pas de conséquences mais pour des mesures plus sensibles des quantités de bactéries en présence d'autres cellules vivantes, d'autres tests seraient plus adaptés. Une alternative s'est présentée à nous bien après la réalisation des expériences: la mesure de la quantité de bactéries peut se faire par cytométrie en flux suite à la coloration de ces dernières avec un kit LIVE/DEAD™ (*BacLight™* Bacterial Viability and Counting Kit, ThermoFisher), lequel permet en outre de discriminer les bactéries mortes des bactéries vivantes. Cette méthode de quantification directe permet de mesurer la proportion de bactéries qui ont été tuées par l'échantillon (Gasol *et al.* 1999). De plus, cette donnée peut apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes antibactériens utilisés par l'hôte : les substances antibactériennes pouvant soit tuer les bactéries soit simplement ralentir leur développement.

Un second point d'intérêt est le choix de la bactérie utilisée. Nous avons choisi de travailler avec *Escherichia coli* car il s'agit d'une bactérie de référence qui a prouvé avoir des effets négatifs sur les spermatozoïdes (Otti *et al.* 2013). Bien qu'elle ne soit pas une bactérie inféodée au sol ni un pathogène naturel des fourmis, son utilisation répandue dans différents domaines d'expérimentation permet une comparaison pertinente, ce qui nous a amené à la

choisir comme modèle biologique. Les caractéristiques d'une souche particulière de cette espèce ont déterminé son choix : *E. coli* D31 est une souche LPS déficiente. Elle présente une première paroi relativement fine de peptidoglycanes typiques bactéries Gram (-), mais ne présente pas de seconde paroi en lipopolysaccharides (LPS), la rendant plus sensible aux peptides antimicrobiens. L'utilisation d'une telle bactérie augmente la puissance de nos tests, dont le seuil de détection doit être très bas compte tenu des quantités extrêmement faibles de liquide spermatique collectables par individu.

Quelles autres opportunités d'analyse des données collectées par la méthode ARISA ?

L'analyse des communautés bactériennes réalisée au Chapitre 4 par la méthode ARISA se limite au dénombrement des OTU par type d'échantillon biologique, à la mesure de l'abondance bactérienne au sein des échantillons, et à la comparaison de la présence des différents OTU entre les échantillons biologiques. D'autres analyses univariées ou multivariées pourraient apporter des informations plus complètes et plus robustes aux résultats présentés. Cependant, l'utilisation de ces outils ne convient pas dans les circonstances présentes car le nombre d'échantillons reste trop limité. Comme pour les expériences des autres chapitres, les mesures ont été effectuées à des moments précis tenant compte de différents épisodes de la reproduction, et les dissections des individus d'un même lot ont été réalisées le même jour. Cette étude requiert une attention soutenue quant à la stérilité des conditions de travail et, pour chaque individu, la dissection de chaque partie du corps est extrêmement chronophage. Nous n'avons pu disséquer que 15 individus/jour (à raison d'1 heure/individu). Par conséquent, pour chacun des tissus disséqués, nous possédons une taille d'échantillon de $n = 15$, mais les premières analyses ARISA ont montré que les quantités collectées par individu étaient trop faibles pour être détectées sans ambiguïté. Nous avons dû *pooler* les échantillons d'un même type par 3 ce qui a réduit la taille des échantillons à $n = 5$. Clairement, des résultats plus pointus pourraient être obtenus avec un échantillonnage supplémentaire. Par exemple, une analyse univariée calculant l'indice de Shannon nous renseigne sur la diversité bactérienne au sein d'un échantillon. Cette mesure complète celle de l'abondance et est plus robuste que le dénombrement des OTU effectué. Des analyses multivariées des communautés bactériennes peuvent apporter des informations plus robustes et précises sur les similitudes entre les communautés des différents échantillons, mais ont besoin d'un échantillonnage plus important. Des calculs préliminaires effectués sur nos données ont été réalisés à titre indicatif. Une analyse en

PCA - scaling 2

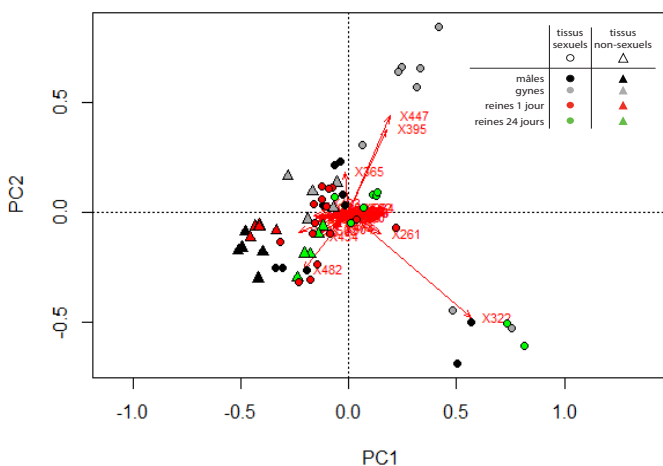


Figure 8. Transformation-based Principal Component Analysis (Tb-PCA) des communautés bactériennes présentes dans les vésicules séminales des mâles (points noirs), les spermathèques des gynes (points gris), des reines un jour après l'accouplement (points rouges), 24 jours après l'accouplement (points verts) et du broyat de leur tête-thorax des mêmes individus (triangles noirs, gris, rouges et verts respectivement). Les deux axes représentés décrivent 19% de la variabilité totale des communautés de bactéries.

composantes principales (transformation-based PCA, avec transformation de Hellinger) suivi d'un clustering de Ward montrent des résultats équivalents à ceux présentés au Chapitre 4 : les communautés bactériennes des différents échantillons biologiques sont bien différenciées les unes des autres, les communautés présentes dans les vésicules séminales des mâles et celles de la spermathèque des reines montrent cependant des similitudes (Figures 8 et 9).

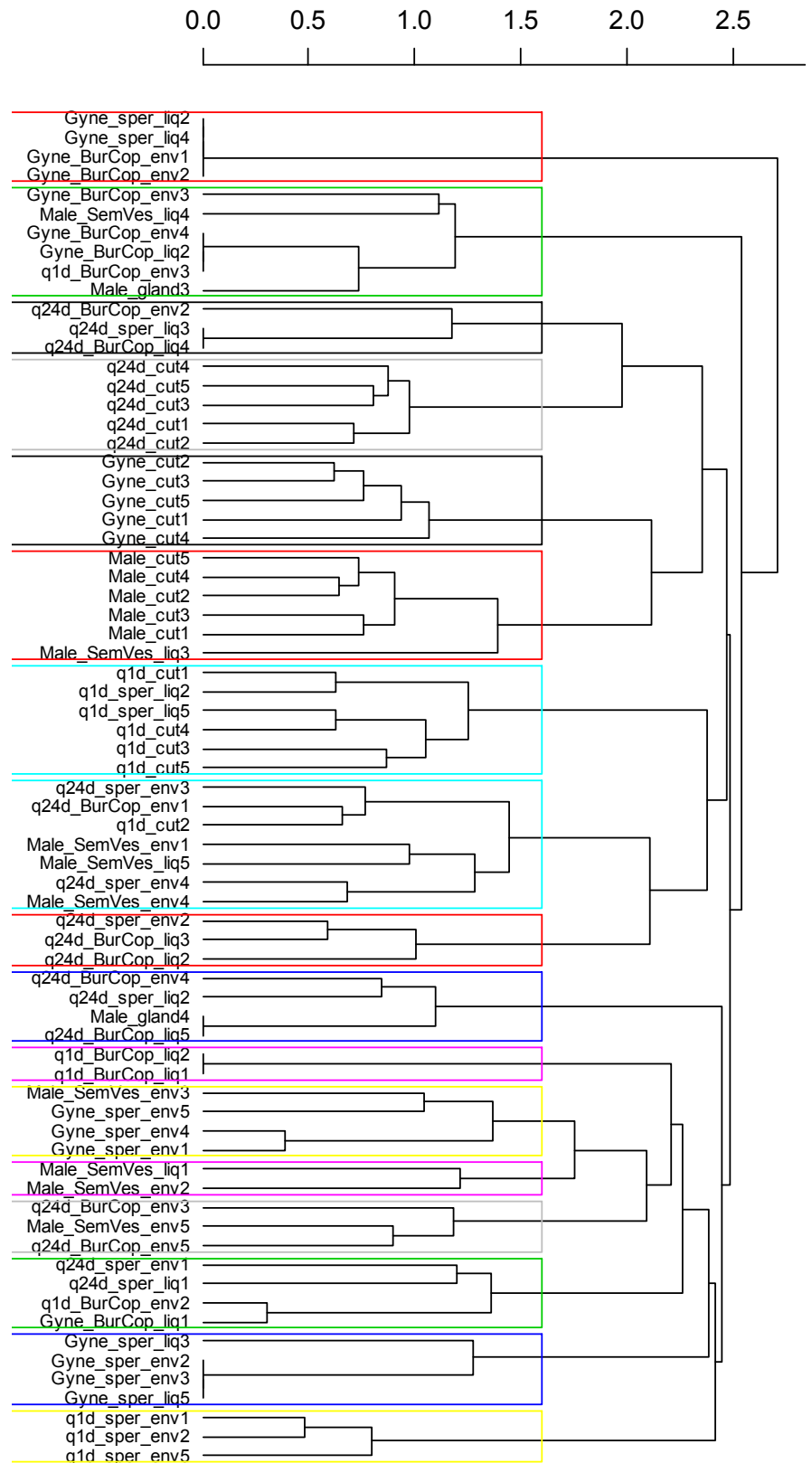


Figure 9. Ward Clustering des communautés bactériennes présentes dans les différents échantillons analysés (vésicules séminales des mâles, spermathèque des gyne, reines un jour et 24 jours après l'accouplement, et broyat des têtes-thorax des mêmes individus). Le clustering porte sur les 15 premières composantes de la Tb-PCA et réalise 17 regroupements.

3. Perspectives

Etude de l'effet d'un challenge immunitaire lors du développement des mâles sur le nombre et la viabilité des spermatozoïdes

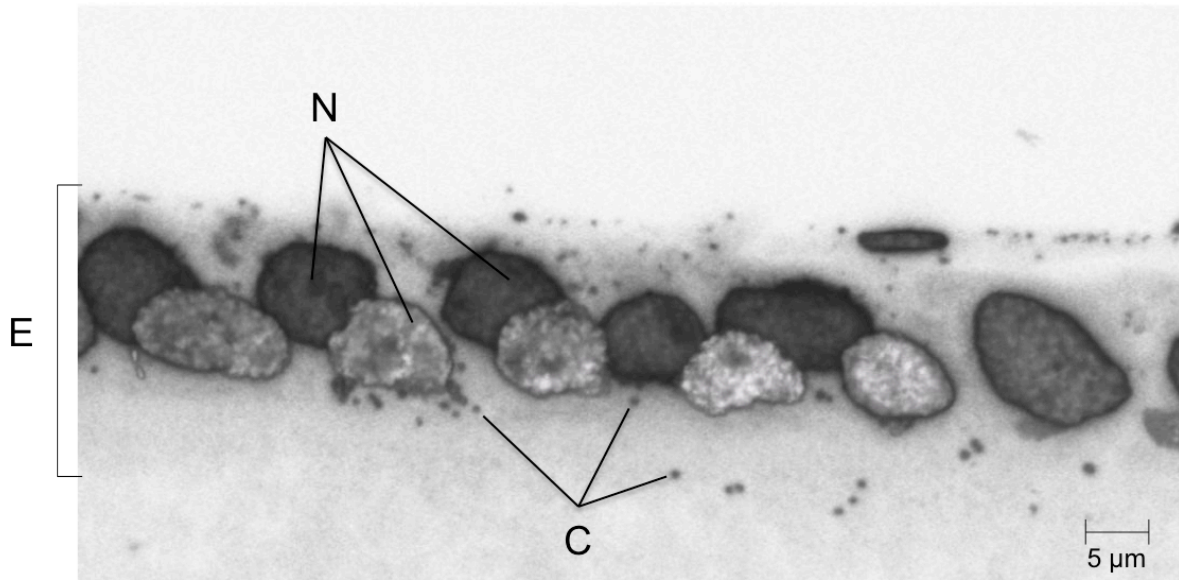
Tout comme nous avons testé l'impact d'une carence en protéines sur la production du sperme (Chapitre 1), il serait intéressant d'étudier l'effet d'un challenge immunitaire lors du développement du mâle sur la quantité et la qualité des ses spermatozoïdes, ainsi que l'effet combiné carence alimentaire/challenge immunitaire. Chez l'abeille *Apis mellifera* il a été montré qu'une activation du système immunitaire chez des mâles adultes encore vierges réduit la viabilité des spermatozoïdes dans les 24h qui suivent la blessure (Stürup *et al.* 2013). Les auteurs suggèrent que la diminution de la viabilité serait due à un compromis entre l'investissement dans le système immunitaire et l'investissement dans le maintien de la viabilité du sperme. Cependant, ces travaux, réalisés sur les mâles adultes, témoignent plus du coût du maintien des spermatozoïdes que de l'investissement dans leur production. Il serait intéressant de réaliser des expériences de compromis entre immunité et reproduction au cours du développement, par exemple en inoculant à des mâles au stade larvaire des quantités faibles de parasite (le champignon pathogène d'insectes *Metarhizium anisopliae*) ou en activant leur système immunitaire à l'aide de PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

Analyses des communautés bactériennes liées au sperme des fourmis

Les résultats présentés au Chapitre 4 et dans la section précédente sont prometteurs, et méritent d'être approfondis. Premièrement, comme nous l'avons suggéré ci-dessus, un plus ample échantillonnage permettra de réaliser des tests statistiques plus robustes, confirmant – ou non - les résultats obtenus dans notre étude (forte abondance bactérienne dans les vésicules séminales des mâles, presque absence de bactéries dans les glandes accessoires des mâles, forte abondance bactérienne dans la spermathèque des gynés, forte chute de cette abondance le lendemain de l'accouplement et augmentation 24 jours après l'accouplement). Deuxièmement, une analyse qui distingue les enveloppes de chaque organe des liquides qui y sont contenus permettra une analyse plus fine des communautés bactériennes qui leur sont propres et leur variation temporelle. Nous postulons que, dans les organes sexuels, les communautés bactériennes présentes dans le tissu de l'enveloppe d'un organe peuvent être différentes de celles présentes dans le liquide. Cela pourrait expliquer, par exemple, la présence de bactéries dans la spermathèque de la gyne malgré sa forte activité antibactérienne : des bactéries endosymbiotiques, présentes dans le cytoplasme des cellules de l'enveloppe de la spermathèque, sont moins sujettes aux activités antibactériennes présentes dans le liquide de cet organe. Un indice allant dans ce sens a été obtenu par l'observation en microscopie confocale de l'épithélium de la spermathèque d'une gyne d'*Acromyrmex echinator* colorée à l'iodure de propidium (substance fluorescente qui se fixe à l'ADN)(Figure 10). Nous observons la présence de corpuscules d'ADN à l'intérieur des cellules épithéliales de la spermathèque. Ces corpuscules correspondent ont la taille et la forme de cellules bactériennes, leur présence suggère une association symbiotique entre ces bactéries et les cellules de la spermathèque. Troisièmement, l'identification de tous ces phylotypes bactériens pourrait nous apporter des réponses sur leur possible rôle et permettra de dresser une carte des communautés bactériennes associées au sperme chez les fourmis. Finalement, prouver ou infirmer l'origine masculine des bactéries présentes dans les spermathèques des reines 24 jours après l'accouplement reste un défi de taille.

Une possibilité serait de démontrer génétiquement que les souches présentes chez la reine sont les mêmes que celles de son partenaire. A cette fin, il conviendrait de collecter les deux partenaires, sachant que lors du vol nuptial, il n'est pas rare qu'ils atterrissent ensemble, le mâle toujours attaché à la reine.

□



© Jean-Marie Vanderwinden

Figure 10. Coupe de l'épithélium de la spermathèque d'une gyne d'*Acromyrmex echinator* observée en Microscopie confocale suite à une coloration à l'iodure de propidium. Les gros corpuscules clairs et foncés correspondent aux noyaux des cellules épithéliales, la zone grisâtre claire autour des noyaux correspond au cytoplasme de ces cellules, les petits corpuscules gris correspondent probablement à des bactéries endosymbiotiques. E : épithélium de la spermathèque ; N noyau des cellules épithéliales ; C : corpuscules d'ADN.

Pérennité des spermatozoïdes : comparaison entre espèces à longue et courte durée de vie

Un thème qui n'a pas été abordé dans cette thèse de doctorat est la survie à long terme des spermatozoïdes chez la reine. Il est clair que chez les reines à longue durée de vie (par exemple *Lasius niger*), la très grande majorité des spermatozoïdes sont maintenus vivants pendant des années (nous avons mené des expériences pilotes qui montrent un taux de viabilité des spermatozoïdes supérieur à 98% chez les reines vieilles de plus d'un an). Mais quid des reines à courte durée de vie ? Est-ce que les mêmes mécanismes de maintien sont à l'oeuvre ? Assiste-t-on à un déclin des cellules spermatiques avec l'âge de la reine ? Chez la fourmi d'Argentine, *L. humile*, les ouvrières tuent près de 90% des reines de la colonie alors que celles-ci n'ont qu'un an (Passera et Aron 2005). Une chute dans la viabilité des spermatozoïdes contenus dans la spermathèque de ces reines pourrait-elle expliquer un tel phénomène ?

Conclusion

Les fourmis possèdent un mode de reproduction unique qui leur impose une protection et un maintien particulièrement efficace de leurs spermatozoïdes. Plusieurs mécanismes entrent en jeu avant, pendant et après l'accouplement, et permettent de préserver la quantité et la qualité des cellules spermatiques. Dans ce travail, nous avons abordé quatre d'entre eux : (1) l'investissement au moment du développement du mâle dans la qualité des spermatozoïdes produits, (2) l'activation du système immunitaire général lors de l'accouplement, ce qui réduit les risques de transmission de maladies, (3) la production de substances antibactériennes par les organes sexuels avant et lors de l'accouplement, induisant une purge des bactéries présentes dans ces organes, et (4) la présence de certains groupes bactériens dans les organes de stockage du sperme qui pourraient jouer un rôle dans le maintien à long terme des spermatozoïdes. Ces mécanismes participent à l'optimisation du succès reproducteur des mâles comme des femelles chez les fourmis.

Références

- Avila FW, Sirot LK, La Flamme BA, Rubinstein CD, Wolfner MF. 2011. Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu Rev Entomol.* 56: 21-40
- Baer B, Krug A, Boomsma JJ, Hughes WHO. 2005. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinatior* and the effect of infection. *Insect Soc.* 52:298–303
- Baer B. 2011. The copulation biology of ants. *Myrmecol Nexs.* 24: 55-68
- Barnes AI, Siva-Jothy MT. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanisation is an indicator of investment in immunity. *Proc R Soc Lond B.* 267: 177–182
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 11: 127-152
- Boman HG. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254: 197-215
- Boomsma JJ. 2009. Lifetime monogamy and the evolution of eusociality. *Philos T R Soc B.* 364: 3191-3207
- Bourgeon F, Evrard B, Brillard-Bourdet M, Colleu D, Jégou B, Pineau C. 2004. Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma¹. *Biol. Reprod.* 70: 768-774
- Czekońska K, Chuda-Mickiewicz, B, Samboeski J. 2015. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie* 46: 1–9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0296-z>
- Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications.* 3: 207–212
- Dougherty WJ, Dougherty MM. 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond cultured shrimp *Penaeus vannamei*. *J Invertebr Pathol.* 54: 331–343. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90117-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2011(89)90117-1)
- Dougherty WJ, Dougherty MM. 1990. Ultrastructural observations on melanized sperm in developing and fully formed spermatophores of male shrimp, *Penaeus vannamei*. In: Cheng, F.O.P.C. (Ed.), *Pathology in Marine Science.* Academic Press, San Diego
- Gasol JM, Zweifel UL, Peters F, Fuhrman JA, Hagstrom A. 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4475–4483
- Hankiewicz J, Swierczek E. 1974. Lysozyme in human body fluids. *Clin. Chim. Acta.* 57: 205-209.
- Jothy MT, Moret Y, Rolff J. 2005. Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. *Adv. Insect Physiol.* 32: 1-48
- Lahnsteiner F, Radner M. 2010. Lysozyme activities and immunoglobulin concentrations in seminal plasma and spermatozoa of different teleost species and indications on its significance for sperm function. *Theriogenology* 74: 246-254
- Mosmann Tim 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Otti O. 2015. Genitalia-associated microbes in insects. *Insect Science.* 22: 325-339. doi: 10.1111/1744-7917.12183
- Otti, O, McTighe AP, Reinhardt K. 2013. In vitro antimicrobial sperm protection by an ejaculate-like substance. *Funct Ecol.* 27: 219-226
- Pech-May F, Medina-Medina L, May-Itzá de JW, Paxton RJ, Quezada-Euán JJG. 2012. Colony pollen reserves affect body size, sperm production and sexual development in males of the stingless bee *Melipona beecheii*. *Insect Soc.* 59: 417–424. <http://dx.doi.org/10.1007/s00040-012-0236-8>
- Rowe M, Cziriák GA, Lifjeld JT, Giraudeau M. 2013. Lysozyme-associated bactericidal activity in the ejaculate of a wild passerine. *Biol. J. Linn. Soc.* 109: 92-100.

- Rowe M, Czirik GA, McGraw KJ, Giraudeau M. 2011. Sexual ornamentation reflects antibacterial activity of ejaculates in mallards. *Biol. Letters*. 7: 740-742.
- Samakovlis, C, Kylsten P, Kimbrell DA, Engstrom A, Hultmark D. 1991. The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J*. 10: 163-169.
- Shik JZ, Flatt D, Kay A, Kaspari M. 2012. A life history continuum in the males of a Neotropical ant assemblage: refuting the sperm vessel hypothesis. *Naturwissenschaften* 99: 191–197.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00114-012-0884-6>
- Sotirov L, Dimitrov S, Jeliakov E. 2002. Semen lysozyme levels and semen quality in turkeys (*Meleagris gallopavo*) fed with various dietary protein levels. *Rev. Méd. Vet.-Toulouse* 12: 815-818
- Stürup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. 2013. When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behav Ecol*. 24: 1192-1198. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/art049>
- Stürup M, Boomsma JJ. 2014. Short independent lives and selection for maximal sperm survival make investment in immune defences unprofitable for leaf-cutting ant males. *Behav Ecol Sociobiol*. 68:947-955. doi: 10.1007/s00265-014-1707-x
- Vainio L, Hakkarainen H, Rantala MJ, Sorvari J. 2004. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. *Evol Ecol*. 18:75–84