



# Exploration des patrons de sénescence chez un organisme à croissance indéterminée: le cloporte commun

Charlotte Depeux

## ► To cite this version:

Charlotte Depeux. Exploration des patrons de sénescence chez un organisme à croissance indéterminée: le cloporte commun. Evolution [q-bio.PE]. Université de Lyon, 2020. Français. NNT: 2020LYSE1232 . tel-03436335

HAL Id: tel-03436335

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-03436335>

Submitted on 19 Nov 2021

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

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



**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

Ecole Doctorale N° 341  
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Biologie  
Discipline : Biologie évolutive

Soutenue publiquement à Lyon le 01/12/2020, par :  
**Charlotte DEPEUX**

---

**Exploration des patrons de sénescence chez  
un organisme à croissance indéterminée : le  
cloporte commun**

---

Devant le jury composé de :

<b>Serge ARON</b> , DR., Université Libre de Bruxelles	- Rapporteur
<b>Thierry RIGAUD</b> , DR., UMR CNRS 6282, Université Bourgogne Franche-Comté	- Rapporteur
<b>Sylvie MASSEMIN-CHALLET</b> , MCU., UMR CNRS 7178, Université de Strasbourg	- Examinateuse
<b>Marlène GOUBAULT-BODY</b> , MCU., UMR CNRS 7261, IRBI Tours	- Examinateuse
<b>François-Xavier DECHAUME MONCHARMONT</b> , Pr., UMR CNRS 5023 LEHNA, Université Claude Bernard Lyon 1	- Examinateur
<b>Jean-Michel GAILLARD</b> , DR., UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard, Lyon 1	- Directeur de thèse
<b>Sophie BELTRAN-BECH</b> , MCU., UMR CNRS 7267, Université de Poitiers	- Directrice de thèse
<b>Jean-François LEMAITRE</b> , CR., UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard, Lyon 1	- Co-encadrant de thèse
<b>Jérôme MOREAU</b> , MCU., UMR CNRS 6282, Université Bourgogne Franche-Comté	- Co encadrant de thèse, Invité



## **Composantes de l'Université Université Claude Bernard – LYON 1**

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

### **COMPOSANTES SANTE**

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud –Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

### **COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE**

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAUT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLEUFR
Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

# Remerciements

---

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux. Merci à Mr Rigaud et Mr Aron pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit. Je remercie aussi Mr Dechaume-Moncharmont, Mme Massemín-Challet et Mme Goubauld-Rody d'avoir accepté d'être mes examinateurs lors de la soutenance.

Mes remerciements vont aussi à l'ensemble du laboratoire LBBE à Lyon et à l'école doctorale E2M2.

Je remercie mon équipe d'accueil à Poitiers, l'équipe EES, ainsi que l'ensemble du laboratoire EBI.

Mes remerciements vont ensuite à mes directeurs de thèse. Jean-Michel, j'aurais beaucoup appris grâce à toi, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Jean-François tu auras été un précieux co-encadrant de thèse, je te remercie pour tous tes conseils et ta bienveillance à mon égard.

Sophie, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir donné ma chance, de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. Merci pour tous les bons moments passés au travail, mais aussi en dehors, notamment lors des supers soirées que l'on a passées chez toi, avec les bons petits plats. Je garde aussi dans mon cœur notre virée boutique à Lyon et la fête des lumières !

Jérôme, merci pour ton soutien mais aussi pour m'avoir embrigadée dans le monde du sperme des cloportes ! Merci aussi d'avoir assuré mes arrières en m'envoyant au concours à Bordeaux pour un très joli sujet de thèse, qui je suis sûre m'aurait aussi beaucoup plu.

FX, qu'aurais-je fait sans toi et ta précieuse aide en stats, à nos skypes souvent très longs et très riches en enseignement. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance et tes encouragements. Le monde de la recherche manque de personnes comme toi.

Merci Christine pour m'avoir embarquée dans le monde des hémocytes, merci pour ton soutien tout au long de ma thèse.

Ascel, à toi aussi je souhaite adresser mes remerciements. Tu as été un super encadrant de M2, et bien que je n'aie pas pu aller plus loin dans nos recherches sur les amibes, celles-ci m'ont passionnée.

Nico, tu es une personne formidable et ton sourire quotidien est d'un grand réconfort. Merci aussi pour ce merveilleux stage de M1 et toute ta bienveillance.

Evidemment les filles je ne pourrais pas écrire de remerciements sans penser à vous, mes rayons de soleil du labo. Parce que tous les matins, j'adore venir vous faire mon petit coucou.

Christelle, tu assures ! Merci d'avoir toujours été au top et d'avoir géré toutes mes demandes aussi rapidement ! Merci aussi pour nos bons moments en salle de pause !

Maryline, j'ai adoré passer du temps à discuter avec toi, tu as toujours été de bon conseil. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la microscopie, je serais resté des heures avec toi à regarder tous ces échantillons magiques !!

Carine, bien que tu viennes des Deux-Sèvres... hum hum ☺, j'ai passé de super moments avec toi au labo, tu es un rayon de soleil !

Alex, une pensée pour toi et toutes nos conversations à l'élevage. Tu es une chouette personne.

Isa, merci beaucoup d'avoir été là pour moi pendant ces années ! Merci pour toutes ces jolies billes que j'ai reçues (même si je les ai méritées), et nos petites confidences à l'élevage ! Team « filles uniques » !

Ma Tiff, quelle belle rencontre, tu as été d'une aide précieuse en tant que collègue mais aussi en tant qu'amie. Tu as un peu joué le rôle de grande sœur quand j'avais besoin de me confier (oui, je dis grande sœur car je te le rappelle, non tu ne peux pas être ma mère nous n'avons que 10 ans d'écart). Je te remercie profondément de m'avoir aidée et soutenue dans les grands moments de bourse. J'ai adoré maniper avec toi et j'ai hâte de continuer. Je te remercie encore très fort !

Ma petite Anaïs j'ai été ravie de te rencontrer au cours de cette dernière année, et j'ai hâte de voir tes aventures dans l'Est avec cette nouvelle maison !

Je remercie aussi tous les EC, pour tous les moments échangés à la salle de pause ou en réunion, je pense notamment à Isabelle, Julia et Joanne.

Bouziane, tu as aussi été vraiment super avec moi pendant ces 4 années au labo ! Merci !

Vient le temps de remercier mes stagiaires Simon et Angèle qui ont effectué un précieux travail au cours de ma thèse et avec qui j'ai apprécié travailler !

Clémentine B. tu as été là au tout début, et tu es là jusqu'au bout. Merci pour toutes nos conversations, toutes les bières partagées ! Tu es une super nana et tu es super courageuse ! Hâte de partager des balades avec Prune et toi !

Une grosse pensée à mes collègues jeunes-chercheurs ! Vous avez été si importants !

Sylvine, je vais commencer par toi... J'ai tant de choses à dire... Du début à la fin j'ai pu compter sur ton soutien et ta gentillesse. Je trouve que tu es une fille formidable et notre séjour à Montpellier restera gravé dans mon cœur. J'espère toujours te garder à mes côtés, mais surtout, je te souhaite d'être heureuse et de t'épanouir.

Thomas, Toto, je pourrais pour toi aussi écrire un roman. Tu es quelqu'un de vrai et de sincère. Tu m'as ouvert les bras un jour où j'en avais vraiment besoin. Je serai toujours là pour toi, et surtout si c'est pour faire un barbecue !

Alex, j'ai passé de super moments à discuter avec toi ! Beaucoup de bonnes choses pour toi au fond de ta Bretagne, ainsi qu'à Cyril ! Même si, dans le Clain vous étiez super nuls au ballon !

Jeremy, à toi aussi, je voudrais dire merci ! Je crois qu'auparavant, jamais personne ne m'avait tant contredite ! Mais c'était que du bonheur ! Allez copain de galère, c'est bientôt fini !

Marius, mille merci pour ces trois années, tu as été un très chouette collègue-ami. J'ai passé des soirées à mourir de rire avec toi, j'espère que nous en aurons d'autres ! Beaucoup de bonnes choses pour la suite, surtout si tu persistes à étudier les cacas !

Benjamin, je voulais écrire japonais mais j'avais un peu trop de boulot pour apprendre la langue ! Merci d'avoir été là pour moi, on en a passé de chouettes moments ! Beaucoup de belles choses à toi aussi !

Elie, Thomas, Cécilia, éclatez-vous, la thèse ne dure que trois ans !

Mes copains de MDE, vous avez été vraiment accueillants avec moi et j'adorais venir bosser avec vous, je pense bien à vous et surtout à toi Stevens qui a été un encadrant de stage au top et qui fera, j'en suis sûre une très belle carrière. Bien que tu ais du mal à prévenir assez en avance pour que ce soit possible, j'ai hâte que tu reviennes passer quelques jours à la maison (et si jamais tu veux emmener des macarons) ...

Clémentine P., merci, du fond du cœur d'être devenue mon amie. Ton départ a été un gros coup dur car je me suis énormément attachée à toi. Tu es une nana en or et une scientifique brillante, je n'ai aucune crainte concernant ton avenir ! (Et bisous à Gautier et Clemlvre).

Cybèle, on a commencé l'aventure ensemble et on ne se quittera plus jamais. Je t'aime tant pour ton esprit brillant que pour ton immense folie. Merci d'être toujours là pour moi !

Je remercie aussi tous mes amis, qui ont vécu cette thèse avec moi, Marion P. qui m'a lâché dès mon arrivée au labo pour s'excenter dans des contrées lointaines (Châteauroux quoi !), Fanny, Jimmy, Thibaut. Je pense aussi fort à mes deux bichettes Ophélie et Cathy, rencontrées toutes deux sur les bancs de la fac. Pierre, Adrien, Manon nous avons commencé cette aventure ensemble et Cindy, Gaëlle et Valérian sont venus rejoindre cette bande de joyeux fous ! Merci à vous !

Merci à Malo et Rougeon pour tous ces précieux moments ! A nos raclettes et nos apéros toutes saisons ! Pensée à ma Blot, Gueven, leur petite Rozenn et le p'tit chat à venir, toujours là pour moi ! Ma tatie Cathou et ses moules frites que je ne connais que de nom, et aussi à ma Nat' la seconde Gigi ! Les sirènes de VIA MARIS FOREVER !

Merci à mes amies Camille et Sophie, qui ont vécu la thèse en même temps que moi ! On s'est toujours serré les coudes et ça ne changera pas. Je vous aime très fort les filles ! Camille, loin des yeux mais toujours près du cœur, tu m'as toujours soutenue... et tu es la responsable du plus gros fou rire au cours de ma thèse ou de ma vie ? Lors de notre dîner au « verse toujours » ... Merci du fond du cœur pour ta précieuse amitié. Et merci aussi d'avoir pris le temps de lire et corriger ce manuscrit <3.

Je pense aussi à toutes les merveilleuses personnes que j'ai rencontrée lors des balades canines, Chloé, Kathy, Camille, Cindy... Et plus particulièrement à toi Odelys, qui est venue mettre du soleil dans ma vie. Tu es devenue une précieuse amie. Merci pour ces balades, ces soirées, nos petites vacances entre filles et les bons petits plats ! Pauline plus je te découvre et plus tu me fais rire, avec toi les balades sont toujours plus longues à la recherche des clefs ou des longes oubliées, mais toujours très agréables, une jolie amitié en perspective, merci !

Et non Hélène, je ne t'ai pas oublié. Si cette thèse m'a bien apporté quelque chose, c'est toi. Merci pour tout ! Et de tendres câlins à ton adorable petit garçon Tyméo et à ta jolie Illyna qui comptent tant pour moi (toi aussi Jojo ahahah).

Merci à vous Carole et Patrick, pour tout votre soutien depuis le début. Pour m'avoir reçue chez vous toutes les deux semaines depuis la L2. Pour tous les bons petits plats et les fous rires échangés. Vous êtes des beaux parents en or.

Merci aussi à vous Laura et Arnaud pour les super moments que nous avons passés ! Et même si on n'a pas obtenu le record à l'escape-game on forme une super équipe !

Merci à toi Juju, même s'il n'y a pas que des hauts dans notre relation tu sais que je t'aime.

Matthieu, tu as toujours été un frère pour moi, merci pour ton soutien pendant cette étape importante de ma vie. Je t'aime. Merci aussi à mon tonton Fifi, que j'adore.

Christine ma tata de cœur, merci d'être toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments !

Papa, maman, vous avez réalisé mon rêve en m'offrant la possibilité de faire ces études. Vous êtes des parents merveilleux ! Merci pour votre soutien et votre amour. J'espère que vous serez fiers de moi en lisant ces pages.

Damien, mon coéquipier depuis maintenant 7ans... Tu n'es pas un adepte des déclarations d'amour, alors je vais faire court. Tu sais combien je t'aime. Merci.

Evidemment, bien que les humains puissent prendre une grande part dans mon cœur, mes animaux en sont les rois. Tendres pensées à mon Toast qui a illuminé ma vie pendant presque 14 ans, ton départ a été une étape très difficile mais je te porte dans mon cœur pour toujours. Merci à ma petite Hermione, qui par ses bêtises et ses câlins, nous comble de bonheur chaque jour. Et mon Albus, tu es arrivé au milieu de cette thèse et tu n'as ajouté que du positif à ma vie, je t'aime de tout mon cœur même quand tu te barres en forêt ou que tu manges des cloportes !

*Je dédie cette thèse à mon Papy Jean-Paul dont le souhait était que j'aime la nature et qui m'a fait découvrir de merveilleuses choses avant de partir, bien trop tôt.*



# Sommaire

---

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>7</b>
<b>GLOSSAIRE.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMÉ .....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
I. THEORIES EVOLUTIVES DU VIEILLISSEMENT.....	13
I.1. Sénescence programmée et altruiste.....	13
I.2. Lignées somatique* et germinale* : la barrière de Weismann .....	14
I.3. Théorie de l'accumulation des mutations délétères.....	15
I.4. Théorie de la pléiotropie* antagoniste.....	16
I.5. Théorie du soma jetable.....	17
I.6. Conclusion .....	18
II. MECANISMES PHYSIOLOGIQUES ET CELLULAIRES DE LA SENESCENCE .....	19
II.1. Premières causes de dommages cellulaires .....	19
II.1.1. L'instabilité génomique .....	19
II.1.2. L'érosion des télomères .....	20
II.1.3. Causes épigénétiques.....	20
II.1.4. Altération de la protéostase.....	21
II.2. Réponses antagonistes aux premiers dommages cellulaires.....	22
II.2.1. Dérèglement des voies liées à la nutrition .....	22
II.2.2. Mitochondries et ROS .....	22
II.2.3. Sénescence cellulaire .....	23
II.3. Réponses intégratives.....	23
II.3.1. Epuisement des cellules souches .....	23
II.3.2. Altération de la communication cellulaire .....	24
II.4. Conclusion.....	24
III. MESURER LA SENESCENCE .....	25
III.1. Mesurer la survie .....	25
III.2. Mesurer la sénescence actuarielle .....	25
III.3. Mesurer la sénescence reproductive .....	26
III.4. Mesurer la sénescence physiologique.....	27

## SOMMAIRE

---

III.5. Vers une approche intégrative de la sénescence .....	28
IV. PATRONS DE SENESCENCE : LA DIVERSITE DES PATRONS DANS LE MONDE VIVANT .....	28
IV.1. Diversité dans le monde vivant : entre espèces .....	29
IV.2. Diversité dans le monde vivant : différences intra-espèces.....	29
V. DIVERSITE DES PATRONS DE SENESCENCE : LES CAUSES .....	31
V.1. Le sexe .....	31
V.2. Qualité génétique des individus .....	32
V.3. L'environnement.....	32
V.4. Manque d'information sur certains modèles .....	33
VI. ORGANISMES A CROISSANCE INDETERMINEE : SENESCENCE NEGLIGEABLE ?.....	34
VII. OBJECTIFS DE LA THESE ET DEMARCHE ADOPTEE .....	35
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
I. MATERIEL BIOLOGIQUE : LE CLOPORTE .....	38
I.1. Généralités.....	38
I.2. Anatomie .....	39
I.2.1. Appareils reproducteurs.....	39
I.2.1.1 Appareil reproducteur du mâle .....	39
I.2.1.2. Appareil reproducteur de la femelle .....	40
I.2.3. Croissance et mue.....	41
I.2.4. Reproduction .....	42
I.2.5. Elevage .....	45
I.2.6. Prélèvement d'hémolymphé et de tissus.....	46
I.2.6.1. Prélèvement de l'hémolymphé .....	46
I.2.6.2. Prélèvement de la chaîne nerveuse.....	46
I.2.6.3. Prélèvement des gonades.....	47
<b>CHAPITRE I : ETUDE DE LA SENESCENCE ACTUARIELLE CHEZ A. VULGARE .....</b>	<b>48</b>
I. INTRODUCTION .....	49
II. MATERIELS ET METHODES .....	50
II.1. Matériel biologique.....	50
II.2. Statistiques.....	51
III. RESULTATS.....	51
IV. DISCUSSION.....	54
<b>CHAPITRE II : ETUDE DE LA SENESCENCE REPRODUCTIVE CHEZ A. VULGARE .....</b>	<b>56</b>
I. INTRODUCTION .....	57
II. AGE ET SUCCES REPRODUCTEUR : ARTICLE « REPRODUCTIVE SENESCENCE AND PARENTAL EFFECTS IN AN INDETERMINATE GROWER» PUBLIE DANS LE JOURNAL OF EVOLUTIONNARY BIOLOGY. .....	59
II.1. Présentation de l'étude.....	59

## SOMMAIRE

---

II.2. Article scientifique.....	60
III. AGE DES MALES ET COMPETITION SPERMATIQUE : ARTICLE SCIENTIFIQUE EN PREPARATION « FERTILIZATION CHALLENGE: EFFECT OF AGE ON SPERM COMPETITION IN THE COMMON WOODLOUSE ».....	69
III.1. Introduction .....	69
III.2. Présentation de l'étude .....	69
Box technique 1: Dénombrement de « bundles » et spermatozoïdes .....	70
Prélèvement des spermatozoïdes .....	70
III.3. Article scientifique en préparation .....	72
IV. DISCUSSION .....	94
IV.1. Sénescence reproductive : mécanisme complexe et cocktail de traits à étudier .....	94
IV.2. Stratégies de reproduction en fonction de l'âge .....	95
VI.3. Pistes futures et propositions d'expérimentations.....	96
<b>CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE BIOMARQUEURS CELLULAIRES DE SENESCENCE CHEZ A. VULGARE.....</b>	<b>98</b>
I. INTRODUCTION.....	99
II. PRESENTATION DE L'ETUDE.....	100
<b>BOX TECHNIQUE 2 : PROTOCOLES DE MESURE DES BIOMARQUEURS DE SENESCENCE .....</b>	<b>100</b>
Profil des cellules immunitaires.....	100
Activité de la Bêta-galactosidase.....	100
Expression de la TERT.....	101
III. ARTICLE SCIENTIFIQUE PUBLIE DANS JOURNAL OF CRUSTACEAN BIOLOGY .....	102
<b>CHAPITRE IV : IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES PATRONS DE SENESCENCE CHEZ A. VULGARE.....</b>	<b>109</b>
I. INTRODUCTION .....	110
II. IMPACT DE LA TEMPERATURE : ARTICLE SCIENTIFIQUE EN PREPARATION « HIGH TEMPERATURE EFFECT ON ACTUARIAL, REPRODUCTIVE, AND CELLULAR SENESCENCE IN THE COMMON WOODLOUSE. ».....	113
II.1. Introduction .....	113
II.2. Présentation de l'étude sur l'effet du stress « haute température » sur la sénescence (en contrôlant l'humidité) .....	114
II.3. Article scientifique en préparation .....	115
III. IMPACT DE LA PHOTOPERIODE .....	136
III.1. Introduction .....	136
III.2. Matériel et Méthodes.....	136
III.2.1. Matériel biologique.....	136
III.2.2. Statistiques.....	137
III.3. Résultats.....	137

## SOMMAIRE

---

<b>III.4. Discussion.....</b>	<b>139</b>
<b>IV. IMPACT DE LA CARENCE ALIMENTAIRE .....</b>	<b>140</b>
<b>IV.1. Introduction .....</b>	<b>140</b>
<b>IV.2. Matériels et Méthodes .....</b>	<b>141</b>
<b>IV.2.1. Matériel biologique .....</b>	<b>141</b>
<b>IV.2.2. Statistiques .....</b>	<b>142</b>
<b>IV.3. Résultats.....</b>	<b>143</b>
<b>IV.4. Discussion.....</b>	<b>145</b>
<b>IV.4.1. Carence alimentaire : stress important chez le cloporte ?.....</b>	<b>145</b>
<b>IV.4.2. Un effet sexe très marqué .....</b>	<b>147</b>
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>147</b>
<b>V.I. Patrons de sénescence : variabilité des traits en fonction du stress .....</b>	<b>147</b>
<b>V.II. Sensibilité du cloporte à des stress environnementaux : impact sur les populations.....</b>	<b>149</b>
<b>V.III. Pistes futures et propositions d'expérimentation .....</b>	<b>150</b>
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>152</b>
<b>I. RESUME DES RESULTATS OBTENUS CHEZ A. VULGARE .....</b>	<b>153</b>
<b>I. DE LA SENESCENCE CHEZ UN ORGANISME A CROISSANCE INDETERMINEE : STRATEGIES EVOLUTIVES ET SENESCENCE .....</b>	<b>154</b>
<b>II. STRESS ET ENVIRONNEMENT .....</b>	<b>156</b>
<b>II.1. Effet des stress sur les patrons de sénescence .....</b>	<b>156</b>
<b>II.2. Population de laboratoire vs Population naturelle : vers une utilisation de l'étude de la sénescence en gestion des populations .....</b>	<b>156</b>
<b>II.3. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>157</b>
<b>III. SEXE ET PATRONS DE SENESCENCE .....</b>	<b>157</b>
<b>III.1. Sexe et stratégies de reproduction.....</b>	<b>158</b>
<b>III.2. Sénescence et chromosome sexuel.....</b>	<b>158</b>
<b>III.3. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>159</b>
<b>IV. THEORIES EVOLUTIVES : LES APPORTS DES ETUDES SUR A. VULGARE .....</b>	<b>159</b>
<b>IV.1. Allocation aux ressources et stress : théorie du soma jetable chez A. vulgare .....</b>	<b>159</b>
<b>IV.2. Théorie de la pléiotropie antagoniste : chez le cloporte A. vulgare ? .....</b>	<b>161</b>
<b>IV.3. Critiques et perspectives.....</b>	<b>162</b>
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>163</b>
<b>EPILOGUE .....</b>	<b>164</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>169</b>
<b>ANNEXE 1 : RESULTATS PRELIMINAIRES TESTS ENVIRONNEMENTAUX.....</b>	<b>198</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Théorie de l'accumulation des mutations .....	16
Figure 2 : Théorie de la pléiotropie antagoniste.....	17
Figure 3 : Théorie du soma jetable .....	18
Figure 4 : Principaux dommages accumulés dans les cellules sénescentes .....	21
Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes impliqués dans la sénescence d'un organisme .....	25
Figure 6 : Age au début de la sénescence et taux de sénescence .....	26
Figure 7 : Coloration des cellules sénescentes au SA-Bêta galactosidase .....	27
Figure 8 : Diversité des patrons de sénescence dans le monde vivant .....	30
Figure 9 : Courbe de croissance en fonction des stratégies de croissance des organismes .....	35
Figure 10 : Configuration du manuscrit et des travaux menés lors de la thèse .....	36
Figure 11 : Photo d'un cloporte mâle de l'espèce <i>Armadillidium vulgare</i> .....	38
Figure 12 : Morphologie générale du cloporte commun <i>Armadillidium vulgare</i> .....	39
Figure 13 : Organe génital mâle (A) et femelle (B) photographié au microscope électronique à balayage chez <i>Armadillidium vulgare</i> .....	40
Figure 14 : photographie (x10) des gonades mâles.....	40
Figure 15 : Photographie (x10) d'un ovaire de cloporte femelle .....	41
Figure 16 : Cycle de mue chez <i>A. vulgare</i> .....	42
Figure 17 : Etapes de la reproduction chez le cloporte commun <i>A. vulgare</i> .....	43
Figure 18 : Cycle de mue et de reproduction chez le cloporte commun <i>A. vulgare</i> .....	43
Figure 19 : Développement du cloporte de la fécondation à la naissance .....	44
Figure 20 : Aperçu des conditions d'élevage du cloporte : en (A), les conditions de maintenance des cloportes adultes sexés et séparés. En (B), boîte contenant des couples reproducteurs.....	45
Figure 21 : Emplacement du trou à effectuer pour prélever l'hémolymphé .....	46
Figure 22 : Photographie et schéma d'une vue ventrale de chaîne nerveuse (x15).....	47
Figure 23 : Probabilité de survie du cloporte <i>A. vulgare</i> .....	49

## LISTE DES TABLEAUX

---

Figure 24 : Taux de mortalité des femelles cloportes entre (A) 200 et 400 jours et entre (B) 400 et 1400 jours .....	52
Figure 25 : Nombre de <i>mancae</i> produits par portée en fonction de la saison .....	53
Figure 26 : Nombre total de <i>mancae</i> produits par saison de reproduction.....	54
Figure 27 : Nombre de <i>pulli</i> comptés dans le <i>marsupium</i> en fonction de la taille de la femelle .....	58
Figure 28 : Résumé graphique de l'étude sur la sénescence reproductive du cloporte ....	60
Figure 29 : Ovaires et oviductes d'une femelle non inséminée (A) et d'une femelle inséminée (B). ....	71
<i>Figure 1: Experimental design</i> .....	77
<i>Figure 2: General sperm depletion experimental design</i> .....	79
Figure 30 : Schéma simplifié de l'effet de l'âge sur les traits affectant le succès reproducteur chez les mâles <i>A. vulgare</i> .....	95
Figure 31 : Design expérimental de l'expérience "effet de la température" .....	114
Figure 32 : Effet de la photopériode stimulante sur les paramètres immunitaires.....	138
Figure 33 : Effet de la photopériode stimulante sur l'activité de la Bêta-galactosidase ..	139
Figure 34 : Design expérimental de l'expérience "effet de la carence alimentaire".....	142
Figure 35 : Impact de la carence alimentaire sur l'activité de la Bêta-galactosidase .....	144
Figure 36 : Impact de la carence alimentaire sur le profil des cellules immunitaires.....	145
Figure 37 : Schéma théorique des différences d'allocations énergétiques entre mâles et femelles et réponse à la survenue d'un stress .....	161

*Les sources des figures sont renseignées en légende. Si aucune source n'est renseignée, les figures ou images sont issus de mon travail personnel.*

# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Systématique de l'espèce étudiée.....	38
Tableau 2 : Table de survie et reproduction chez <i>A. vulgare</i> .....	49
Tableau 3 : Caractéristiques des portées obtenues .....	52
Tableau 4 : Exemple des effets de variables environnementales sur les traits d'histoire de vie des invertébrés .....	111
Tableau 5 : Tableau de sélection de modèle pour l'effet de la carence alimentaire .....	142
Tableau 6 : Tableau synthétique des patrons de sénescence obtenus à la suite des stress en comparaison avec les patrons obtenus chez des individus âgés de 2 à 3 ans (Chapitre III) .....	149
Tableau 7 : Effets de stress abiotiques sur des modèles invertébrés.....	151

# Glossaire

---

*Les mots définis sont indiqués par un astérisque dans le texte.*

**Fitness** : Capacité d'un individu à survivre et à produire des descendants féconds.

**Génotype** : ensemble des caractères génétiques d'un individu.

**Hétérogamétie** : Présence de deux types de gamètes différents, un gamète mâle et un gamète femelle.

**Homéostasie** : Processus de régulation des constantes du milieu intérieur.

**Hormesis** : Stimulation des défenses biologiques suite à des facteurs de stress.

**Lignée germinale (ou german)** : Depuis les cellules souches jusqu'aux gamètes.

**Lignée somatique (ou soma)** : Toutes les cellules formant le corps d'un organisme (toutes celles n'appartenant pas à la lignée germinale).

**Mutation autosomique (dominante)** : Mutation située sur un chromosome qui n'est pas lié à la détermination du sexe.

**Phénotype** : Ensemble des caractères observables d'un individu.

**Pléiotropie** : Gène ou protéine responsable de plusieurs caractères phénotypiques.

**Protéostase** : Homéostasie des protéines.

**Radicaux libres** : Molécules chimiques instables produites par les organismes.

**Semelparité** : Stratégie qui implique une seule reproduction au cours de la vie de l'organisme.

**Trade-off** : Compromis évolutif dans l'allocation des ressources.

## RESUMÉ

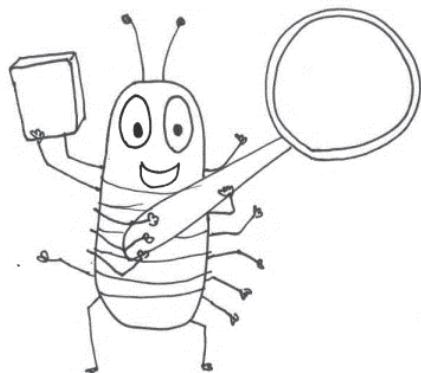
---

Avec l'âge, les performances physiologiques diminuent et la probabilité de mourir augmente dans un processus appelé « sénescence ». Ce processus est retrouvé chez la plupart des espèces et présente des patrons très diversifiés ; que ce soit entre les espèces, entre les populations mais aussi entre les sexes et les individus. Comprendre l'existence et le maintien d'un tel processus est un grand challenge dans le domaine de la Biologie Evolutive. Dans ce but, l'étude d'organismes très différents et des facteurs pouvant influencer la sénescence à l'échelle individuelle semble indispensable. Ainsi, au cours de ma thèse nous avons étudié la sénescence d'un organisme présentant une stratégie évolutive particulière. En effet, en tant qu'organisme à croissance indéterminée, le cloporte commun *Armadillidium vulgare* (*A. vulgare*), croît tout au long de sa vie et présente donc, à âge avancé, des capacités physiques pouvant favoriser son succès reproducteur. De plus, de par sa durée de vie de trois ans, ses adaptations à la vie terrestre et sa facilité d'élevage, le cloporte commun nous a permis d'étudier plusieurs facteurs environnementaux pouvant moduler, à l'échelle individuelle, les patrons de sénescence. Ainsi, nous avons pu, dans un premier temps, et pour la première fois, mettre en évidence les patrons de sénescence actuarielle, et, à l'inverse de ce qui était attendu, de sénescence reproductive, chez cette espèce. Lors de l'étude de la sénescence reproductive nous avons observé à la fois une diminution de l'allocation spermatique des mâles avec l'âge et un effet transgénérationnel de l'âge des parents sur les descendants. A l'aide de biomarqueurs cellulaires de sénescence que nous avons emprunté aux vertébrés et adapté au cloporte, nous avons aussi pu mettre en évidence les effets de la température, de la photopériode et de la carence alimentaire sur les patrons de sénescence des individus. Nos résultats ont aussi démontré un effet important du sexe sur ces patrons. Enfin, nous avons pu discuter de l'ensemble de ces résultats et de leurs apports sur les connaissances actuelles et les théories évolutives de la sénescence.

## ABSTRACT

---

With age, physiological performance decreases and the probability of dying increases in a process called "senescence". This process is found in most species and shows very diverse patterns; between species, between populations but also between sexes and individuals. Understanding the existence and maintenance of such a process is a great challenge in the field of Evolutionary Biology. To this end, the study of very different organisms and the factors that can influence senescence at the individual level seems indispensable. Thus, during my thesis we studied the senescence of an organism with a particular evolutionary strategy. Indeed, as an organism of indeterminate growth, the woodlouse *Armadillidium vulgare*, grows throughout its life and thus presents, at advanced age, physical capacities that can favour its reproductive success. Moreover, because of its three-year lifespan, its adaptations to terrestrial life and its ease of rearing, the woodlouse has allowed us to study several environmental factors that can modulate individual patterns of senescence. Thus, we were able, in a first step, and for the first time, to highlight the patterns of actuarial senescence and, contrary to what was expected, of reproductive senescence, in this species. During the study of reproductive senescence, we highlighted both a decrease in the sperm allocation of males with age and a transgenerational effect of the age of the parents on the offspring. Using cellular biomarkers of senescence that we borrowed from vertebrates and adapted to the woodlouse, we were also able to highlight the effect of temperature, photoperiod and dietary deficiency on the senescence patterns of individuals. Our results also showed an important effect of sex on these patterns. Finally, we were able to discuss all these results and their contributions to current knowledge and evolutionary theories of senescence.



## Introduction

---

«Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. »

Theodosius Dobzhansky (1900 – 1975)

Bien avant que les hommes n'aient connaissance de l'existence de l'ADN ou des gènes, le vieillissement intriguait et divisait déjà les scientifiques. Alors que pour Platon (428-348 av. J.-C.), la vieillesse est gage de sagesse, elle est pour Aristote (384-322 av. J.-C.) témoin de la décrépitude du corps et de l'esprit. De la Grèce antique au 21<sup>ème</sup> siècle en passant par le Moyen-Age et la renaissance, l'histoire de l'étude de la sénescence, a connu de nombreux rebondissements.

Tout d'abord, il faut préciser que bien que le mot « vieillissement » soit souvent utilisé au même titre que le mot « sénescence », les deux ne veulent pas dire exactement la même chose. La notion de « vieillissement » intègre forcément une notion de temps. Or, il est possible que deux individus du même âge chronologique ne présentent pas le même âge biologique.

Aujourd'hui, de nombreuses recherches ont permis de développer de façon importante les connaissances sur ce processus d'un point de vue génétique, cellulaire et démographique. Pourtant, selon les domaines de recherche, la définition de la sénescence reste très variable. En effet, une récente étude a recensé la définition de la sénescence selon plusieurs chercheurs, et c'est autant de définitions de la sénescence qu'ils ont obtenues (Cohen et al. 2020). Comment travailler sur un même processus déjà si complexe si l'on ne s'accorde pas sur une définition ?

Afin de trouver un consensus, il semble indispensable de développer les approches multidisciplinaires, afin que chaque élément de réponse puisse trouver sa place et permette enfin de comprendre de façon claire l'existence et le maintien de ce processus aussi présent que redouté. Et, en l'absence actuel de consensus et afin de fixer l'idée sur laquelle nous nous basons, nous adopterons, au cours de cette thèse la définition utilisée par des biologistes évolutionnistes. Celle-ci décrit le processus suivant : avec l'âge, les organismes voient leur succès de reproduction et leur probabilité de survie diminuer. Monaghan et al., 2008 ont défini le terme « sénescence » comme étant « *une inévitable, et irréversible accumulation des dommages avec l'âge qui conduisent à la perte de fonction(s) et éventuellement, la mort* » (Monaghan et al. 2008). La sénescence est donc un déclin de la contribution à la *fitness*\* (cf. Glossaire) avec l'âge.

La sénescence peut être observée à plusieurs échelles : la sénescence actuarielle correspond à l'augmentation de la probabilité de mourir avec l'âge, la sénescence reproductive illustre la diminution du succès de reproduction avec l'âge et la sénescence cellulaire est définie par un arrêt du cycle cellulaire conduisant à la mort cellulaire.

Au détour de cette thèse, je vous propose justement d'aborder la sénescence d'un point de vue démographique (*i.e.* par l'étude de la sénescence actuarielle et reproductive), mais aussi cellulaire, par une approche expérimentale, afin d'étudier son expression et son évolution chez un organisme aussi inattendu que fascinant : le cloporte commun.

### I. Théories évolutives du vieillissement

Selon Charles Darwin, chaque organisme est soumis à la sélection naturelle. Lorsqu'un individu présente un trait favorisant la reproduction, ce trait contribue davantage à la génération suivante et est donc sélectionné (Darwin 1859). Ainsi, la sélection naturelle pourrait s'imaginer comme étant un tribunal : si un trait présente un avantage dans le milieu et favorise la reproduction, il est conservé ; si un trait apporte un désavantage à la reproduction, alors, il est, au cours d'un processus plus ou moins long de l'évolution, éliminé par la sélection naturelle ; enfin, si un trait n'apporte aucun avantage mais ne présente aucun désavantage, il peut être conservé ou non (Kimura 1983).

D'un point de vue Darwinien, la sénescence, définie comme étant un processus entraînant la diminution de la *fitness* avec l'âge, devrait être éliminée par la sélection naturelle. Pour autant, elle semble être quasi-ubiquiste chez les mammifères et les oiseaux (Jones et al. 2013). Ce paradoxe a donc motivé de nombreux scientifiques à comprendre le comment et le pourquoi de l'existence et le maintien de ce processus. Les théories suivantes, présentées dans cette partie du manuscrit dans l'ordre chronologique de leur proposition, sont importantes car elles ont permis, en s'additionnant et en se complétant, d'arriver à la compréhension actuelle que nous avons de la sénescence.

#### I.1. Sénescence programmée et altruiste

La première théorie du vieillissement a été proposée au milieu du XIXème siècle par Alfred Russel Wallace : il supposait que la sénescence avait pu être sélectionnée au cours

de l'évolution car elle conférait des avantages d'un point de vue de la population (Wallace 1889). La mort des vieux individus était ainsi programmée pour laisser place aux jeunes individus, évitant ainsi la compétition pour les ressources limitées et permettant, par des processus de mutations, de laisser la place à des individus pouvant potentiellement mieux s'adapter à un nouvel environnement.

Cette théorie, est reprise en 1997 par Vladimir P. Skulachev (Skulachev 1997). Selon lui : « La mort causée par le vieillissement libère la population des ancêtres et libère de l'espace pour une progéniture portant de nouveaux traits utiles » (Skulachev 1997). Par cette phrase, il propose ainsi que l'évolution des espèces est garantie par le sacrifice des plus vieux, pourtant en bonne santé, à la faveur des plus jeunes, portant de nouveaux gènes et permettant ainsi l'évolution de l'espèce. Cependant, et d'un point de vue critique, il semblerait plutôt que ce processus n'entraînerait pas une évolution plus rapide des espèces, mais à l'inverse, et en retirant des populations les individus ayant une meilleure valeur sélective (puisque leur survie à un âge élevé est signe d'un génotype\* avantageux), ce processus entraînerait un retard dans l'évolution des espèces par l'évincement programmé des individus les plus aptes (Kowald and Kirkwood 2016).

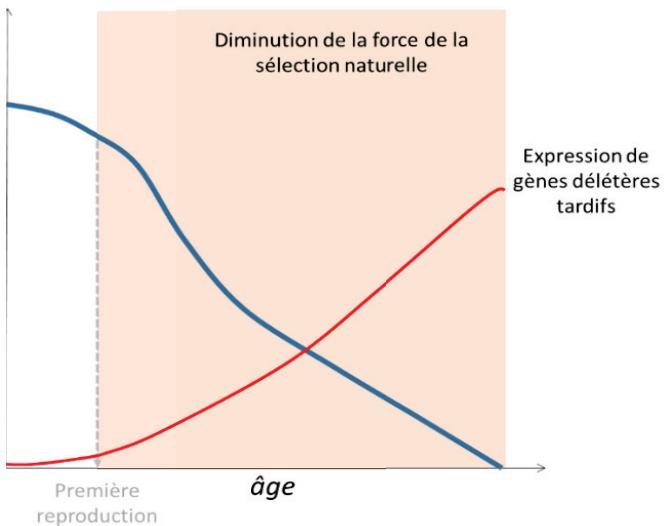
### I.2. Lignées somatique\* et germinale\* : la barrière de Weismann

Au 19<sup>ème</sup> siècle, August Weismann suggère que les organismes sont divisés en deux lignées cellulaires : le soma, qui compose le corps de l'organisme, et le germen, composé de la lignée germinale permettant la transmission des informations génétiques à la génération suivante (Weismann 1982). La lignée somatique est en interaction avec l'environnement et subit donc des dégradations moléculaires avec le temps, comme l'usure d'un objet. La lignée germinale, elle, serait « immortelle » puisqu'elle perdurerait au travers des générations et ne subirait pas de dégât au cours du temps. Une barrière existerait donc entre la lignée somatique et la lignée germinale permettant la protection de cette dernière, ce qui a donné naissance au terme « barrière de Weismann ». Cependant, selon cette vision, les organismes ne possédant pas de lignée somatique, comme les organismes unicellulaires, microbes, plantes ou encore coraux ne seraient pas concernés par le processus de sénescence. Cette théorie a été vivement critiquée par Alex Comfort. En effet, pour A. Comfort, bien qu'elle apporte des éléments d'explications

intéressants, cette théorie n'élucide pas les mystères de l'évolution de la sénescence et en particulier la présence de sénescence chez des organismes sans soma (Comfort 1964). De plus, la barrière de Weismann, comme on l'entendait à l'époque, n'existe plus. Nous savons aujourd'hui que les lignées somatiques et germinales peuvent communiquer entre elles (Maklakov and Immler 2016) .

### I.3. Théorie de l'accumulation des mutations délétères

Le vrai tournant dans l'étude de l'évolution de la sénescence arrive en 1930, avec le biologiste Ronald Fisher. Il propose une hypothèse selon laquelle la force de la sélection naturelle serait différente selon l'âge des individus. La force de la sélection naturelle a été définie en 1983 par Russel Lande et Stevan J. Arnold comme étant « la pente de régression entre un trait d'intérêt quantitatif et les mesures d'aptitudes » (Lande and Arnold 1983). Plus simplement : lorsque la force de sélection naturelle est élevée, seuls les traits à forts bénéfices seront sélectionnés ; si elle est faible les traits à bénéfices moyens ou faibles pourront aussi être sélectionnés. Cette idée est reprise dix ans plus tard par John Burdon Sanderson Haldane à la suite de ses travaux sur la maladie de Huntington (Haldane 1941). Cette maladie, neurodégénérative du système nerveux central, est due à une mutation autosomique dominante\*. Elle touche un individu sur 100 000 et apparaît tardivement (entre 30 ans et 50 ans). Si la maladie est toujours présente dans la population, c'est, selon Haldane, parce que son expression se manifeste après la reproduction et a ainsi pu être transmise aux descendants. Ces résultats suggèrent que la sélection naturelle n'est pas capable d'éliminer les gènes s'exprimant tardivement, notamment après la reproduction. Il faudra attendre Peter Medawar, qui, inspiré par les travaux de R. Fisher et J.B.S. Haldane, propose la première théorie évolutive du vieillissement de façon explicite : la théorie de l'accumulation des mutations délétères. Selon lui, la force de la sélection naturelle décroît avec l'âge. Ainsi, si un gène est délétère mais qu'il intervient tard dans la vie de l'organisme, la sélection naturelle n'agit pas sur celui-ci et ce gène est maintenu au sein de la population ([Figure 1](#)). L'organisme accumule donc ces gènes délétères en fin de vie conduisant au processus de sénescence (Medawar 1952).



**Figure 1 : Théorie de l'accumulation des mutations**

Selon la théorie de l'accumulation des mutations, l'expression des gènes délétères (représentée par la courbe rouge), accumulés au cours de la vie et donc plus importants en fin de vie, entraînerait une diminution de la survie (courbe bleue).

#### I.4. Théorie de la pléiotropie\* antagoniste

A la théorie de l'accumulation des mutations, Georges C. Williams ajoute, en 1957, qu'un gène pourrait même être avantageux en début de vie et délétère en fin de vie, ce qui favoriserait son maintien dans la population ([Figure 2](#)). De ces arguments naît la théorie de la pléiotropie antagoniste (Williams 1957). En 1966, William Hamilton reprend à son tour ces idées sous la forme mathématique, et conclut que la sénescence est l'inévitable résultat de l'évolution (Hamilton 1966).

Certaines études en laboratoire ont rapporté des effets antagonistes de certains gènes, soutenant ainsi la théorie de la pléiotropie proposée par Williams (Leroi et al. 2005; Nussey et al. 2013). Ces résultats sont renforcés par d'autres études mettant en évidence le compromis entre l'allocation aux ressources et à la reproduction tôt dans la vie à défaut de la forme physique en fin de vie (Lemaître et al. 2015) et l'effet des gènes sur ce phénomène (Maklakov et al. 2015). Bien que certains critères énumérés par Williams dans sa théorie n'aient encore pas été vérifiés, cette théorie reste l'une des principales proposées pour expliquer la sénescence et son évolution, et, est de ce fait, dans le domaine, l'une des théories la plus citée dans la littérature (Gaillard and Lemaître 2017).

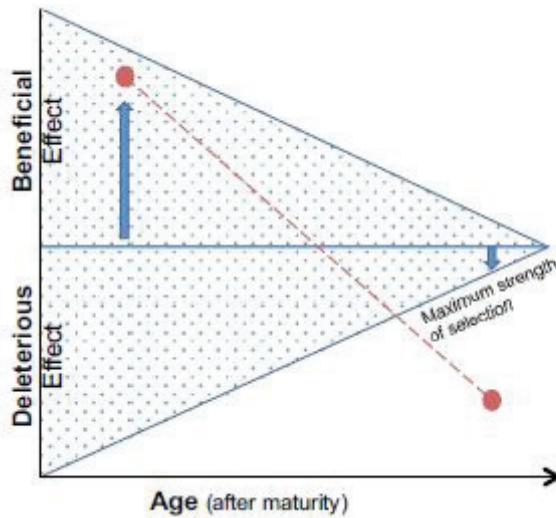


Figure 2 : Théorie de la pléiotropie antagoniste

D'après (Robins and Conneely 2014). En bleu, la force de la sélection diminue avec l'âge, ce qui entraîne un effet bénéfique de certains gènes avec l'âge, associé à des coûts plus tard dans la vie, notamment par l'accumulation des coûts dans la lignée germinale.

### I.5. Théorie du soma jetable

Depuis, une autre théorie en lien avec celle de August Weismann (cf. I.2.) a été proposée par Thomas Kirkwood en 1977. Cette théorie, n'excluant pas celles présentées jusqu'alors, est celle du soma jetable.

La théorie du soma jetable se base sur le principe d'allocation aux ressources décrit auparavant par Cody, en 1966. Les organismes posséderaient une quantité finie de ressources qu'ils alloueraient dans les différentes fonctions : maintenance somatique (survie), reproduction et croissance par exemple. Lorsqu'un organisme investit de l'énergie dans une fonction, il le fait au détriment d'une autre fonction (Cody 1966; Stearns 1992). Selon T. Kirkwood, la sénescence serait alors caractérisée par un compromis entre l'énergie allouée à la maintenance du soma et l'énergie allouée à la reproduction (Kirkwood 1977, [Figure 3](#)). La lignée somatique serait ainsi un simple véhicule-bouclier permettant à la lignée germinale d'arriver à sa destination (*i.e.* la reproduction) dans les meilleures conditions possibles.

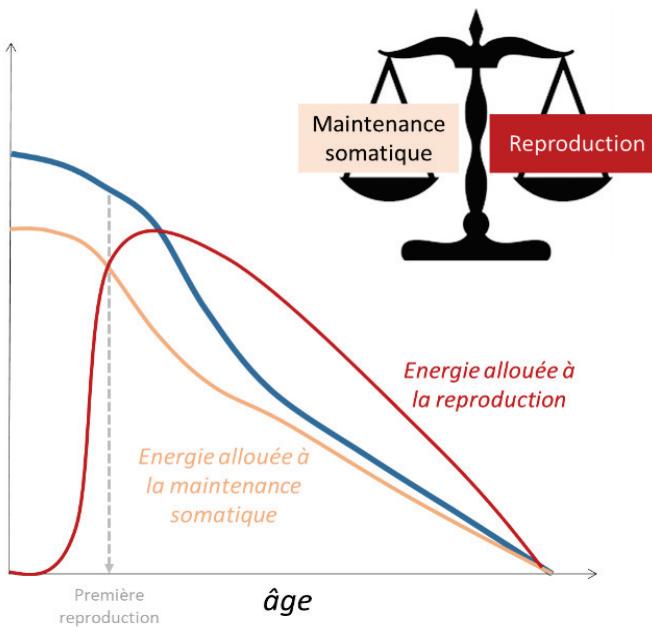


Figure 3 : Théorie du soma jetable

*Selon la théorie du soma jetable, l'énergie disponible est limitée. Des compromis entre l'énergie allouée à la reproduction (en rouge) et à la survie (en bleu) mènent à une diminution de la survie (en bleu).*

Cette théorie, bien que très souvent plébiscitée, ne permet pas d'expliquer la sénescence chez des organismes ne présentant pas de lignée somatique. Pourtant, de nombreuses études sont venues la renforcer. En effet, il semblerait qu'un investissement important à la reproduction ou à la croissance tôt dans la vie chez les mammifères entraîne une sénescence plus rapide et forte (Metcalfe 2003; Lemaître et al. 2015). Concernant les invertébrés, une étude a été réalisée sur une espèce d'orthoptère, et rapporte une absence de ces compromis d'allocation aux ressources chez cette espèce (Rodríguez-Muñoz et al. 2019). Cependant, les invertébrés sont encore peu étudiés pour tester les théories évolutives du vieillissement (Rodríguez-Muñoz et al. 2019).

#### I.6. Conclusion

L'ensemble des théories présentées précédemment, bien que non exhaustives, ont été proposées pour expliquer l'existence et le maintien de la sénescence dans le monde vivant, c'est-à-dire les causes ultimes de la sénescence. Cependant, ces théories évolutives n'expliquent pas les mécanismes physiologiques et moléculaires qui agissent

au sein de l'organisme et entraînent sa mort. D'ailleurs, de nombreux processus physiologiques semblent être liés au processus de sénescence.

Ma thèse s'inscrit dans le cadre conceptuel de ces théories et plus particulièrement celles de la pléiotropie antagoniste et du soma jetable, qui ont permis de mieux comprendre évolutivement les patrons de sénescence que nous pouvons observer (Chapitres I et II).

## II. Mécanismes physiologiques et cellulaires de la sénescence

La diminution des performances physiologiques avec l'âge est la définition même de la sénescence. Ce processus est complexe et semble être régit par l'intervention de plusieurs acteurs (Kennedy et al. 2014; Ogrodnik et al. 2019, [Figure 4](#), [Figure 5](#)). Ainsi, neufs candidats semblent intervenir dans ce processus : l'instabilité génomique, les altérations épigénétiques, le raccourcissement des télomères, le dérèglement des voies liées à la nutrition, le dysfonctionnement des voies mitochondrielles, l'altération de la communication cellulaire, la perte de la protéostase et la sénescence cellulaire (López-Otín et al. 2013). Le nombre important de dommages pouvant être impliqués dans le processus physiologique est très important (Ogrodnik et al. 2019), ainsi nous ne pourrons en citer que quelques-uns et notamment les plus connus.

### II.1. Premières causes de dommages cellulaires

#### II.1.1. L'instabilité génomique

Tout au long de la vie, les dommages génétiques s'accumulent (Moskalev et al. 2014). En effet, la stabilité et l'intégrité de l'ADN est constamment attaqué par des agents exogènes (agents physiques, chimiques et biologiques) et endogènes (erreurs de réPLICATION, espèces réactives de l'oxygène (ROS)) qui peuvent alors entraîner des mutations, des translocations, des pertes et gains de chromosomes, le raccourcissement des télomères, etc. Or, il a été mis en évidence qu'une déficience dans la réPLICATION de l'ADN pouvait entraîner un vieillissement prématûRE chez l'Homme et la souris (Hoeijmakers 2009; Gregg et al. 2012).

### II.1.2. L'érosion des télomères

Chez les eucaryotes, les télomères sont des séquences nucléiques répétées à l'extrémité des chromosomes. Ils ont pour fonction la protection des chromosomes contre l'érosion et contre des réappariements accidentels et délétères. A chaque division cellulaire, une petite partie de ces télomères est perdue (Shay and Wright 2005). En effet, lors de la mitose, l'enzyme ADN polymérase procède à la réPLICATION de l'ADN. Cependant, elle réPLIQUE cette ADN dans le sens 3'-5' et des amores ARN, sur lesquelles elle se positionne pour synthétiser les brins complémentaires, lui sont nécessaires. Etant incapable de synthétiser *de novo* l'ADN et par la propriété unidirectionnelle de la réPLICATION, l'ADN polymérase ne réPLIQUE pas la dernière amorce ARN, conduisant à une perte des extrémités au fil des réPLICATIONS (Milewski 2010). Lorsqu'une taille critique est atteinte, les facteurs entraînant l'arrêt du cycle cellulaire sont mis en place et la cellule entre en sénescence. Ainsi, il a été montré, chez l'Homme comme chez d'autres espèces, un raccourcissement significatif des télomères avec l'âge (Moyzis et al. 1988; Bernadotte et al. 2016).

Afin de pouvoir pallier la perte de ces télomères, une enzyme, appelée télomérase, permet de prolonger les extrémités des télomères (Grimes & Chandra, 2009 ; Milewski, 2010). Chez la souris, la réactivation du gène de la télomérase (TERT-ER), a permis d'augmenter la taille des télomères, de réduire des dommages liés à l'ADN et d'éliminer les phénotypes dégénéréscents (Jaskelioff et al. 2011).

### II.1.3. Causes épigénétiques

L'épigénétique correspond aux mécanismes modifiant l'ADN sans toucher au code génétique lui-même, elle participe à la régulation des gènes en touchant de façon réversible l'expression de ceux-ci. Les patrons de méthylation de l'ADN et des modifications et remodelages des histones et de la chromatine sont soupçonnés d'être impactés par l'âge (López-Otín et al. 2013). Certaines modifications des histones ont d'ailleurs été identifiées comme étant associées à l'âge : la suppression de ces histones, H3K4 chez les nématodes et H3K27 chez les mouches, ont entraîné une augmentation de la longévité (Greer et al. 2010; Siebold et al. 2010). Certains changements dans l'architecture de la chromatine sont aussi liés à l'âge (Oberdoerffer and Sinclair 2007).

### II.1.4. Altération de la protéostase

La protéostase\* correspond à l'homéostasie\* des protéines, plus précisément c'est la dynamique de régulation permettant le bon fonctionnement des protéines. La protéostase est altérée avec l'âge et peut entraîner des maladies connues pour être liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Powers et al. 2009 ; Koga et al. 2011 ; Kaushik and Cuervo 2015). Favoriser la protéostase retarde le vieillissement chez certains mammifères (Zhang and Cuervo 2008).

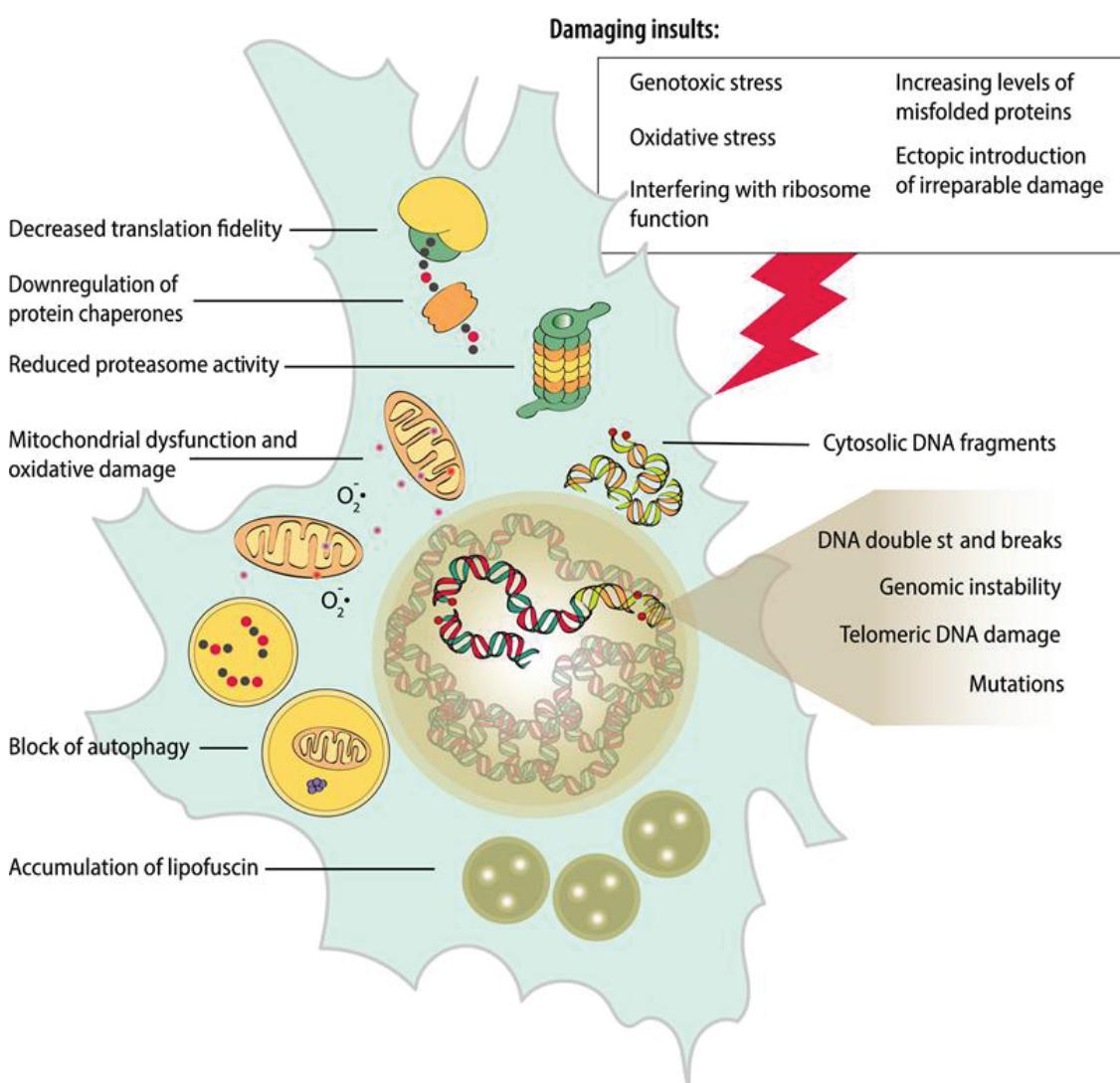


Figure 4 : Principaux dommages accumulés dans les cellules sénescentes

D'après (Ogrodnik et al. 2019)

### II.2. Réponses antagonistes aux premiers dommages cellulaires

#### II.2.1. Dérèglement des voies liées à la nutrition

La voie « Insuline and IGF-1 signaling » (IIS), est connue pour participer à la reconnaissance des nutriments, elle a été très conservée au cours de l'évolution (Fontana et al. 2010). La manipulation des voies IIS entraîne une augmentation de la longévité chez les vers, les mouches et les souris (Fontana et al. 2010).

Lorsque l'apport en nourriture est restreint (restriction diététique (DR)), certains organismes voient leur longévité augmenter (Weindruch et al. 1986 ; Austad 1989 ; Kapahi et al. 2017). Ce bénéfice est soupçonné d'être lié à cette voie IIS (Fontana et al. 2010). D'autres mécanismes et acteurs comme la kinase mTOR, l'AMPK et les sirtuines sont aussi soupçonnés d'être liés à l'âge (López-Otín et al. 2013).

#### II.2.2. Mitochondries et ROS

L'un des mécanismes le plus souvent évoqué dans le processus de sénescence est le stress oxydatif. D'ailleurs Denham Harman a proposé en 1965 la théorie des radicaux libres, désignant la dysfonction progressive des mitochondries comme cause principale de l'augmentation des radicaux libres, espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables des principaux dommages cellulaires (Harman 1956). Leur accumulation au sein des cellules est connue pour causer des dommages aux biomolécules et est soupçonnée de participer au développement de pathologies chez l'Homme telles que l'hypertension, le diabète, le cancer ou encore diverses inflammations (Afanas'ev 2010).

En effet, au sein des cellules, les ROS et les espèces réactives du nitrogène (RNS) sont synthétisées par plusieurs compartiments cellulaires et majoritairement par la mitochondrie (90%) (Hughes & Reynolds, 2005 ; Lagouge & Larsson, 2013). Elles sont présentes en temps normal et participent à d'importantes réactions enzymatiques pour la communication entre les cellules et représentent un danger lorsqu'elles se retrouvent en excès dans celles-ci. Leur présence est contrôlée par le principe d'hormesis\* : des mécanismes de réparation et de maintien permettent leur régulation au sein de la cellule (Afanas'ev, 2010 ; Thorin-Trescases et al., 2010) et impliquent des enzymes connues sous le nom d'antioxydants (Hughes and Reynolds 2005).

### *II.2.3. Sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire est définie comme étant un arrêt du cycle cellulaire (Campisi and Fagagna 2007). Ce processus est décrit pour la première fois en 1965 par Léonard Hayflick : sur des cellules somatiques humaines en culture, il observe que le nombre de divisions est défini et appelle cela « l'horloge mitotique » (Hayflick 1965). Après un nombre précis de divisions, des signaux sont envoyés et bloquent la division mitotique, ce processus est alors irréversible (Hayflick 1965). L. Hayflick propose aussi que l'accumulation du nombre de cellules sénescentes contribue considérablement à la sénescence de l'organisme (Hayflick 1965). Depuis, d'autres études ont montré que ces cellules sénescentes pouvaient avoir un rôle important dans le développement, la réparation des tissus et les maladies liées à l'âge (Storer et al. 2013 ; van Deursen 2014). La sénescence cellulaire a un rôle très important puisqu'elle permet, par l'arrêt du cycle cellulaire, de protéger la cellule contre la perte de son intégrité génétique, et notamment contre le développement des tumeurs et d'autres pathologies (Sager 1991 ; Grimes and Chandra 2009 ; Freitas and De Magalhaes 2011).

Au cours de la vie cellulaire, des dommages sont causés à l'ADN. Ceux-ci peuvent être réparés par des mécanismes spécialisés représentés principalement par trois voies : les cascades « BER » (Base excision repair), « NER » (Nucleotide excision repair) et « NHEJ » (Non homologous end joining) (Freitas and De Magalhaes 2011). En cas de dysfonctionnement de ces voies, d'autres acteurs, comme la protéine p53, permettent de bloquer la prolifération cellulaire en arrêtant le cycle cellulaire et ainsi éviter le développement de tumeurs.

## **II.3. Réponses intégratives**

### *II.3.1. Epuisement des cellules souches*

Les cellules souches sont les cellules indifférenciées capables de se diviser et différencier en cellules spécialisées. Or, de nombreuses études ont rapporté leur affaiblissement avec l'âge. Par exemple, l'hématopoïèse peut être impactée par l'âge ce qui induit une diminution de la production en cellules immunitaires spécialisées (Shaw et al. 2010). Ce phénomène est aussi observé dans le cerveau antérieur de la souris, dans les os ou encore dans les fibres musculaires (Gruber et al. 2006 ; Mostoslavsky et al. 2006 ; Conboy and Rando 2012). Chez la drosophile il a été mis en évidence que la vitesse de

## INTRODUCTION

---

prolifération de ces cellules, lorsqu'elle était très importante, entraînait un vieillissement précoce de l'organisme (Rera et al. 2011). L'épuisement de ces précieuses cellules est le résultat de multiples dommages causés par l'âge, et notamment ceux qu'on a pu décrire précédemment (López-Otín et al. 2013). L'étude des cellules souches et de leur régénération est un vrai challenge en gérontologie, en effet, des résultats prometteurs suggèrent que leur régénération pourrait inverser le processus de vieillissement (Rando and Chang 2012).

### *II.3.2. Altération de la communication cellulaire*

Avec l'âge des changements concernant la communication intercellulaire ont été rapportés, ils peuvent concerter la communication des cellules endocrines, neurocrines ou neuronales (Russell and Kahn 2007 ; Laplante and Sabatini 2012 ; Rando and Chang 2012 ; Zhang et al. 2013). La plupart de ces changements sont dus à une augmentation des réactions inflammatoires avec l'âge (Salminen et al. 2012). De plus, un « effet domino » a pu être observé : certaines cellules sénescantes vont contaminer leurs voisins et les rendre sénescantes à leur tour (Nelson et al. 2012). A l'inverse le retardement du vieillissement d'un tissu peut entraîner celui d'autres tissus avoisinants (Durieux et al. 2011 ; Lavasani et al. 2012).

## II.4. Conclusion

Au sein d'un organisme, de nombreux éléments sont impactés par l'âge ([Figure 5](#)). Tout d'abord au niveau cellulaire des modifications génétiques, épigénétiques ou protéiques peuvent intervenir. Ces modifications vont entraîner des dérégulations et des dysfonctions au niveau des voies liées à la nutrition et aux mitochondries. Ainsi, une sénescence cellulaire, consistant en l'arrêt du cycle cellulaire pourra être observée. Enfin ce processus mène à un épuisement des cellules souches et à l'altération des communications intercellulaires conduisant finalement au déclin des performances physiologiques de l'organisme et donc à sa sénescence.

## INTRODUCTION

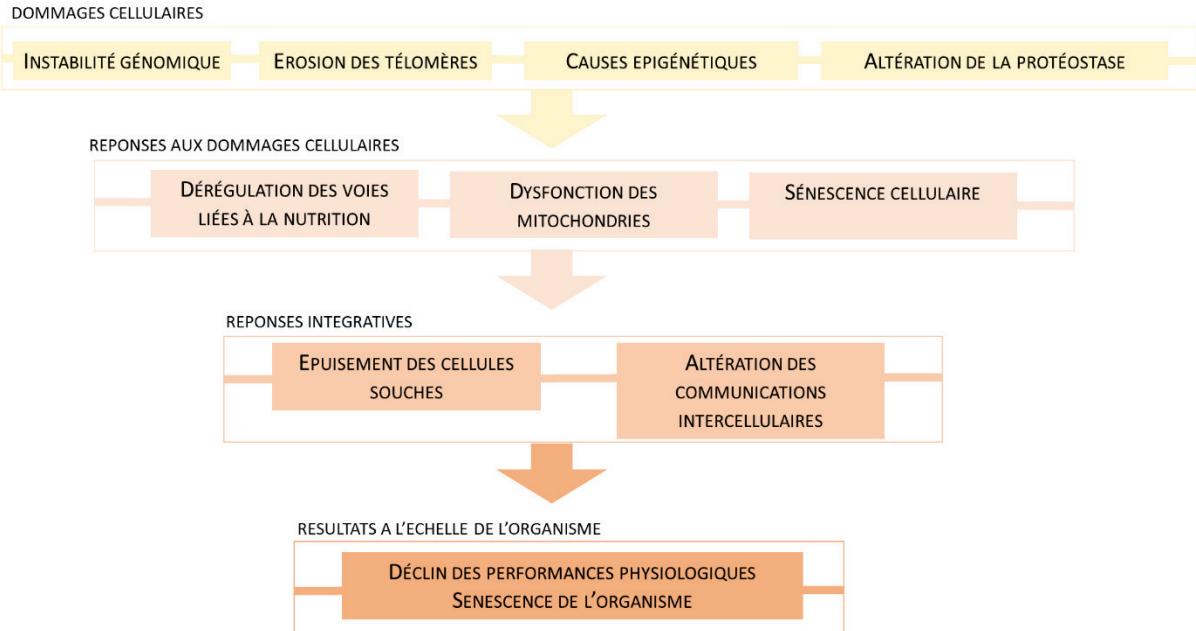


Figure 5 : Schéma récapitulatif des principaux mécanismes impliqués dans la sénescence d'un organisme

## III. Mesurer la sénescence

### III.1. Mesurer la survie

L'espérance de vie (*i.e.* survie moyenne en nombre d'années d'une catégorie particulière d'individus) et la longévité (*lifespan* en anglais) (*i.e.* durée de vie)) sont les paramètres couramment utilisés pour décrire la survie/mortalité des organismes.

### III.2. Mesurer la sénescence actuarielle

La sénescence, quant-à-elle est le déclin des performances physiologiques en fonction de l'âge. Il est possible de modéliser la mortalité en fonction de l'âge par des modèles comme ceux de Gompertz et de Weibull (Promislow and Harvey 1990a ; Ricklefs and Scheuerlein 2001). Le modèle de Gompertz permet notamment de renseigner deux métriques importantes : l'âge au début de la sénescence (appelé « *onset* » en anglais) et le taux de la sénescence actuarielle (la force, décrite par la pente) (Figure 6).

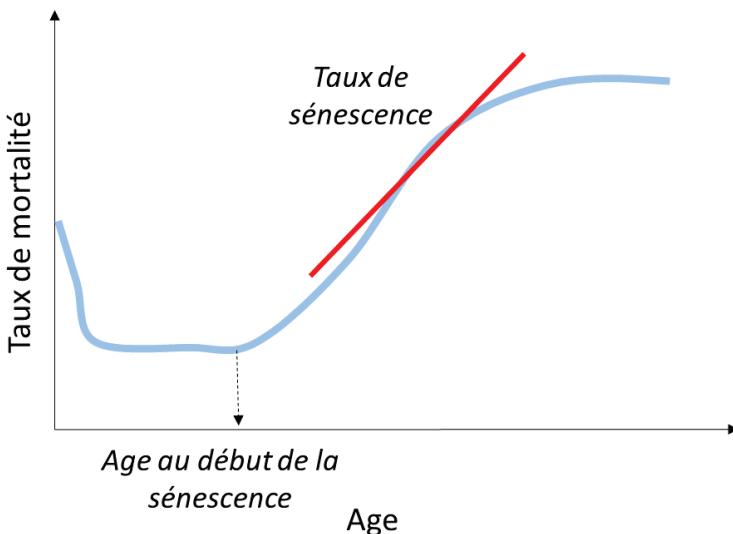


Figure 6 : Age au début de la sénescence et taux de sénescence

De récentes études ont montré qu'il était cependant indispensable de revoir notre méthode de mesure pour la sénescence actuarielle (Ronget and Gaillard 2020). En effet, les organismes n'ont pas les mêmes cycles physiologiques (Promislow and Harvey 1990b). Comparer leur longévité ne semble pas correcte dans le sens où, n'ayant pas les mêmes cycles biologiques, les organismes ne présentent pas le même temps biologique, et peuvent donc présenter des durées de vie très différentes avec des patrons de sénescence tout aussi divers. Afin de palier à ça, de nouvelles mesures sont utilisées, elles concernent le « rythme » et la « forme » de la sénescence actuarielle et prennent en compte le rythme biologique des espèces (Baudisch 2011). Par exemple, l'étude de la mortalité sera standardisée par la longévité maximale des espèces ce qui permettra de voir quel est le patron de sénescence des espèces (Ronget and Gaillard 2020).

### III.3. Mesurer la sénescence reproductive

La sénescence reproductive correspond à la diminution du succès de reproduction avec l'âge. Le succès de reproduction est défini comme étant la capacité d'un individu à produire des descendants féconds. Dans la littérature, le succès de reproduction est souvent mesuré par le nombre de descendants produits (Emlen 1970), la survie des descendants (Packer et al. 1998), la taille de la portée (Balbontín and Ferrer 2005) ou encore la masse des petits (Sharp and Clutton-Brock 2010). Pour autant, la reproduction

est un processus complexe et sa mesure globale nécessiterait une approche plus intégrative (Lemaître et al. 2015).

### III.4. Mesurer la sénescence physiologique

Lorsque la cellule entre en sénescence, elle présente des phénotypes particuliers (et notamment une taille plus importante) (de Jesus and Blasco 2012). Les mécanismes physiologiques participant directement ou indirectement à la mise en place de ces phénotypes cellulaires ou moléculaires peuvent servir de biomarqueurs de sénescence et permettre de déterminer l'âge chronologique d'une cellule (Baker and Sprott 1988 ; Simm et al. 2008 ; Sprott 2010). Un des marqueurs le plus utilisé en biologie cellulaire pour mettre en évidence la sénescence est l'activité de la Bêta-galactosidase (SA-Bêta-galactosidase, pour « Associated Senescence », Figure 7), notamment sur les cultures cellulaires humaines. Ce paramètre, indirectement lié à la sénescence puisque ne participant pas à son processus, est pourtant un indice fiable de l'état physiologique (sénescence ou non) d'une cellule (Gary and Kindell 2005; Lee et al. 2006a).

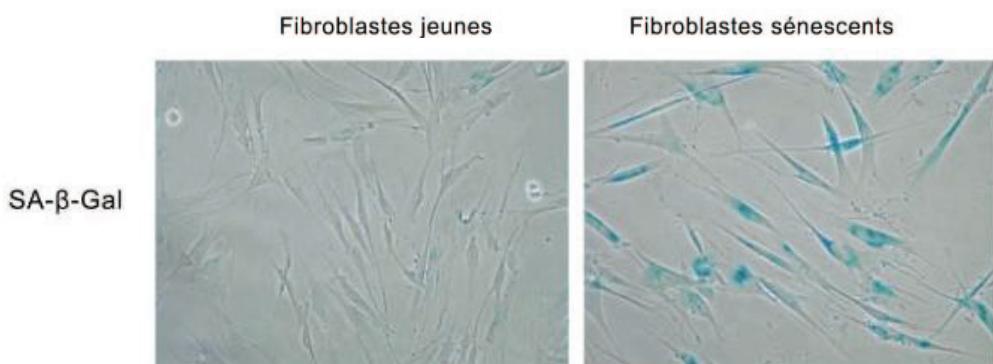


Figure 7 : Coloration des cellules sénescentes au SA-Bêta galactosidase

*Observation microscopique d'une culture cellulaire de fibroblastes humains. Après coloration à la SA-Bêta-galactosidase, les cellules sénescentes apparaissent en bleu. Modifié d'après (Binet 2011).*

Les études évolutives sur la sénescence utilisent la plupart du temps les métriques liées à la survie, à la reproduction et à la croissance car ce sont les principales fonctions physiologiques coûteuses aux organismes. Bien que ces métriques soient tout à fait pertinentes, les biomarqueurs peuvent eux aussi apporter de précieuses informations quant à l'âge chronologique des individus et permettent ainsi de mieux comprendre le

processus de sénescence en lui-même (Chapitre III). Dans ce cadre, nous avons décidé de développer, au cours de cette thèse, des biomarqueurs cellulaires de sénescence qui nous ont permis de mesurer l'impact, à l'échelle cellulaire, de différents stress abiotiques (Chapitre IV)

### III.5. Vers une approche intégrative de la sénescence

De nos jours, la sénescence démographique est principalement étudiée d'un point de vue des compromis d'allocation aux ressources qui régissent l'évolution des histoires de vie des organismes (Lemaître et al. 2015). En biologie cellulaire, la plupart des études utilisant des biomarqueurs de sénescence s'intéressent à l'aspect mécanistique et pathologique de la sénescence, elles ne tentent pas de comprendre les mécanismes à l'échelle populationnelle. Afin de mieux comprendre la diversité des patrons de sénescence, il semble nécessaire de développer des études intégratives qui pourraient permettre de mieux cerner les mécanismes sous-jacents à ce processus quasi-ubiquitaire (Gaillard and Lemaître 2020).

Comprendre la sénescence nécessite de développer des connaissances dans de nombreux domaines, mais aussi de faire de lien entre ceux-ci. Au cours de cette thèse nous avons pris le parti d'étudier la sénescence à plusieurs échelles, pour comprendre comment les différents traits pouvaient varier avec l'âge mais aussi en présence de stress abiotiques. Cette thèse présente donc des travaux que l'on pourrait qualifier de précurseurs dans la démarche d'une étude plus intégrative de la sénescence.

## IV. Patrons de sénescence : la diversité des patrons dans le monde vivant

Bien qu'attendue initialement uniquement chez des organismes disposant d'une lignée somatique et d'une lignée germinale (Weismann 1982), la sénescence a été observée chez des organismes très simples comme des bactéries, ne disposant pas de lignée somatique *versus* germinale (Flatt and Schmidt 2009). D'ailleurs, et plus globalement, au sein du règne animal, la sénescence actuarielle et reproductive présentent des patrons

très diversifiés (Jones et al. 2014), à la fois entre espèces, entre populations, entre sexes et même entre individus (Bouwhuis et al. 2010 ; Tidière et al. 2016 ; Lemaître et al. 2020).

### IV.1. Diversité dans le monde vivant : entre espèces

Dans le monde vivant, les organismes ont des stratégies évolutives très différentes. Par exemple, les organismes présentent des tailles très variées, peuvent vivre dans des habitats extrêmement différents et présenter des stratégies de reproduction distinctes. Toutes ces différences peuvent être à l'origine de la diversité des patrons de sénescence observée au sein des différentes espèces dans le monde vivant (Gaillard et al. 1989 ; Calder 1996; Wiersma et al. 2007 ; Müller et al. 2012). Ainsi, l'onset et le taux de ce processus de sénescence sont extrêmement variables au sein du monde vivant, ce qui a été très bien illustré dans l'étude de Jones et al. (2014) ([Figure 8](#)).

### IV.2. Diversité dans le monde vivant : différences intra-espèces

Au-delà des différences constatées entre espèces, il existe des différences au sein même des espèces. Selon leurs histoires de vies, les populations d'une même espèce peuvent présenter des patrons de sénescence très différents. Dans l'étude de Tidière et al. (2016), les patrons de sénescence de populations sauvages de mammifères ont été comparés à ceux des populations captives et montrent globalement que la vie en captivité offre une meilleure chance de survie aux animaux étudiés (Tidière et al. 2016). Au sein d'une même population, des différences peuvent être observées entre les sexes. Par exemple, chez le cricket, *Teleogryllus commodus*, les femelles connaissent un taux de sénescence plus important que les mâles alors que leur âge au début de la sénescence est plus élevé (Zajitschek et al. 2009).

## INTRODUCTION

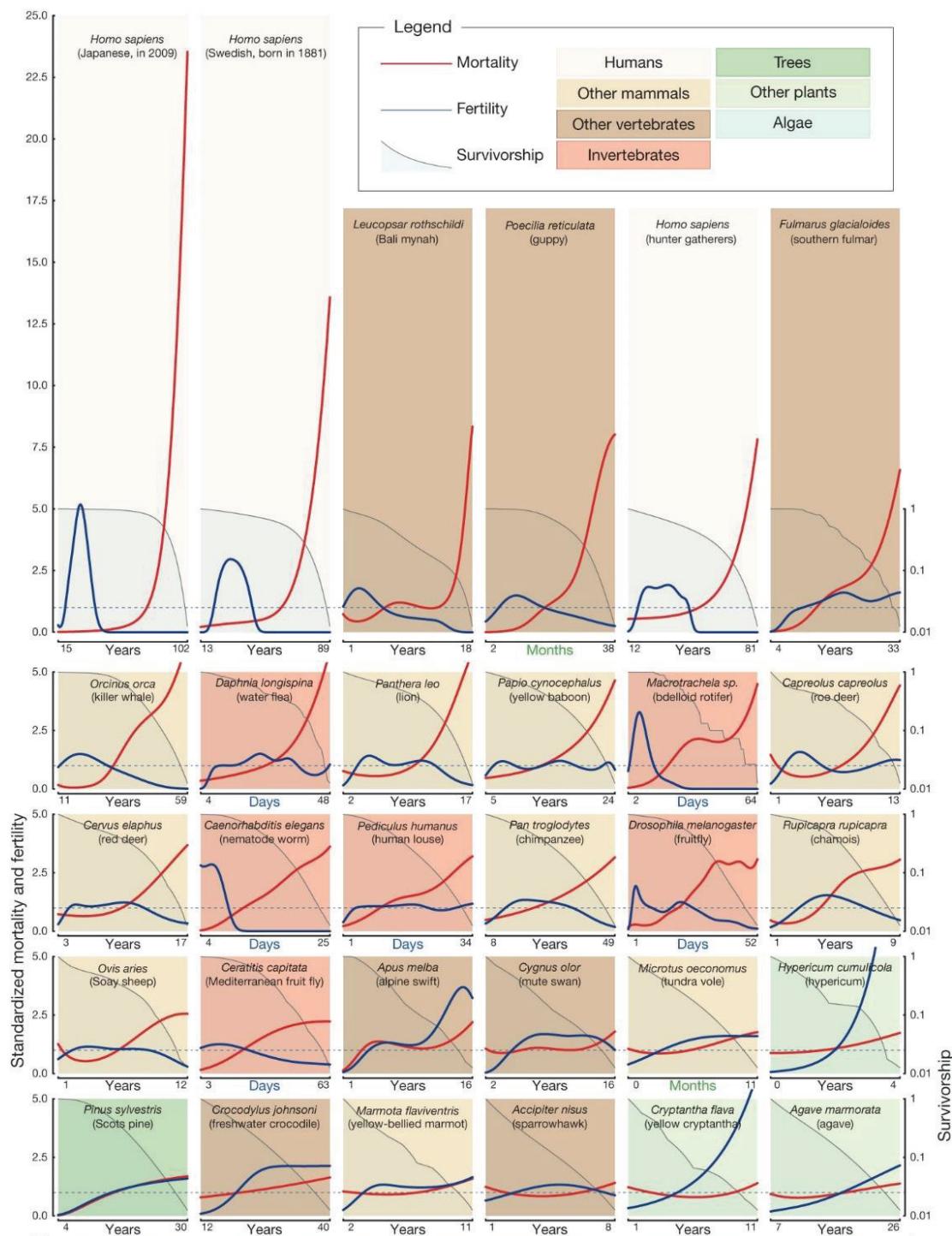


Figure 8 : Diversité des patrons de sénescence dans le monde vivant

D'après : Jones et al., 2014

## V. Diversité des patrons de sénescence : les causes

Comme nous avons pu le voir précédemment, les patrons de sénescence sont très différents que ce soit entre espèces, entre populations mais aussi entre individus. Comprendre la raison de cette diversité semble être la clef pour comprendre les mystères de l'évolution de la sénescence (Promislow 2003 ; Nussey et al. 2013).

Dans le contexte de l'étude de la sénescence d'un point de vue évolutif, la théorie de la pléiotropie antagoniste ainsi que la théorie du soma jetable, prévoient une diminution de la survie en cas d'investissement important lors d'une reproduction précoce (Williams 1957 ; Partridge and Barton 1993). En effet, le *trade-off*\* entre l'énergie allouée à la reproduction et celle allouée au maintien de l'organisme est à l'origine même de la théorie du soma jetable (Kirkwood 1977). Aussi, si l'énergie allouée à la reproduction se fait au détriment de la maintenance somatique, le nombre d'erreurs accumulées au cours du temps augmente comme le prédit la théorie de la pléiotropie antagoniste (Williams 1957). Ainsi, des facteurs, comme le sexe des individus, ou les stimuli ou stress environnementaux, pouvant influencer les différences d'allocations d'énergie, peuvent entraîner des variations dans les patrons de sénescence.

### V.1. Le sexe

Chez la plupart des espèces, des différences sont observées concernant les patrons de sénescence (Clutton-Brock and Isvaran 2007 ; Maklakov and Lummaa 2013a ; Adler and Bonduriansky 2014). Chez la mouche méditerranéenne du fruit *Ceratitis capitata*, les femelles vivent plus longtemps que les mâles (Davies et al. 2005) alors que chez le nématode, ce sont les mâles qui vivent plus longtemps (McCulloch and Gems 2003). Plusieurs éléments peuvent expliquer ces différences de longévité entre les mâles et les femelles d'une même espèce. Selon Williams, la différence entre les sexes peut être expliquée par une vulnérabilité différente aux stress, les différences de taille, l'effort de prospection ou encore des comportements différents face aux dangers (Williams 1957). La sélection sexuelle peut aussi expliquer cette différence de patrons de sénescence, avec une sélection de certains traits fort couteux (Promislow 1992). Une autre hypothèse concerne l'héritage asymétrique des chromosomes sexuels (Marais et al. 2018). Cette théorie pourrait d'ailleurs expliquer que chez les mammifères, les mâles ont tendance à vivre moins longtemps que les femelles (Clutton-Brock and Isvaran 2007 ; Lemaître and

Gaillard 2013 ; Lemaître et al. 2020), alors qu'à l'inverse, chez les oiseaux, ce sont les mâles qui vivent généralement plus longtemps que les femelles (Xirocostas et al. 2020). Selon cette théorie, chez le sexe hétérogamétique\*, la longévité peut être diminuée de 17,6% (Xirocostas et al. 2020). L'explication pourrait être liée à une expression non compensée (car en version unique puisqu'une seule copie de ce chromosome sexuel) des mutations délétères du chromosome sexuel. Il est aussi possible que ces différences puissent être dues à une transmission uniquement maternelle des mitochondries (Camus et al. 2012).

Le sexe est un élément très important dans l'étude de la variabilité des patrons de sénescence. Etant lui-même moteur de modification de ces patrons, il est indispensable de l'étudier de façon systématique. Nous avons décidé, au cours de cette thèse, de toujours tester de façon indépendante les mâles et les femelles de notre modèle biologique que je décrirai un peu plus loin afin de pouvoir comprendre l'impact du sexe sur la mise en place des patrons de sénescence observés.

### V.2. Qualité génétique des individus

Les chromosomes sexuels ne sont pas les seuls paramètres génétiques pouvant influencer la longévité des animaux. Nous savons aussi que la qualité génétique des individus a un impact important sur leur *fitness*. Il est d'ailleurs reconnu que les populations présentant une faible diversité génétique ont une valeur sélective plus faible que les populations présentant une diversité génétique importante (Jump et al. 2009). A l'échelle individuelle, il a été montré que les individus possédant une diversité génétique plus importante présentaient de meilleures performances en termes de survie, de reproduction ou encore de compétences immunitaires (Williams 2001 ; Seddon et al. 2004 ; Brock et al. 2015). Ces paramètres de survie, reproduction et immunité sont étroitement liés à la *fitness* des individus (Chapman et al. 2009), et donc, pourraient être liés à leur sénescence.

### V.3. L'environnement

Un des éléments qui semble également prédominant dans la diversité des patrons de sénescence est l'environnement. En effet, selon les stimuli et stress de l'environnement, des patrons de sénescence différents peuvent être observés au sein d'une même espèce

et parfois même d'une même population en lien avec ce que les organismes peuvent investir dans leurs fonctions physiologiques. Cet effet de carence alimentaire, bien qu'encore activement débattu, pourrait être le résultat d'une réallocation de l'énergie destinée à la reproduction, alors redirigée vers la maintenance somatique (Speakman and Mitchell 2011).

La plupart du temps, les stress environnementaux entraînent une diminution à la fois de la durée de vie et du succès de reproduction. Par exemple, chez les populations de *Drosophila buzzatii*, le taux de sénescence dépend de l'altitude (Norry et al. 2006). Chez la libellule *Coenagrion puella*, le succès de reproduction est lié à la densité de la population (Banks and Thompson 1987).

L'impact des variables environnementales sur la sénescence reste pourtant difficile à mettre en évidence car les variations environnementales sont bien trop importantes pour permettre d'étudier leur impact de façon isolée sur les organismes en milieu naturel. Afin de comprendre comment l'environnement peut impacter les patrons de sénescence, il semble ainsi nécessaire de développer des approches expérimentales en laboratoire où les conditions de maintenance peuvent être entièrement contrôlées.

Dans cette thèse, nous avons choisi d'adopter une approche expérimentale permettant (1) de contrôler l'environnement des individus et (2) de tester sur ces individus l'effet de chaque variable environnementale de façon indépendante en mesurant des paramètres de sénescence démographique (survie, reproduction) et moléculaire à l'aide de nos biomarqueurs de sénescence (Chapitre IV).

### V.4. Manque d'information sur certains modèles

Bien que de nombreuses études aient déjà été menées pour comprendre la diversité des patrons de sénescence au sein du monde vivant, certains organismes comme les plantes ou chez la plupart des insectes (Roach and Smith 2020 ; Zajitschek et al. 2020) mais aussi des reptiles (Hoekstra et al. 2020) semblent avoir été moins étudiés alors qu'ils présentent une diversité de patrons de sénescence importante. En effet, certains organismes disposent de caractéristiques particulières pouvant entraîner des patrons de sénescence différents ou bien même une sénescence dite « négligeable ». Parmi ces organismes, certaines espèces vivent très longtemps, ainsi leurs données de suivi

démographique sont difficiles à obtenir et nous ne savons pas quels sont leurs patrons de sénescence. L'hydre est aussi un cas particulier, bien que ces cellules semblent connaître le phénomène de sénescence, l'organisme en lui-même ne présente pas ce type de phénotype (Martínez 1998). D'autres contraintes existent chez d'autres espèces dont celles pour lesquelles il est difficile de définir une identité (présence d'un soma ou seulement d'un germe, comme les espèces unicellulaires telles que les bactéries). Pour autant, la diversification des modèles utilisés pour étudier la sénescence, bien qu'elle apparaisse comme un challenge, est une étape indispensable dans la compréhension du processus de sénescence (Gaillard and Lemaître 2020) et permet parfois de déceler de la sénescence chez des modèles pour lesquels elle n'était pas attendue (Ackermann 2003).

Les organismes possédant des stratégies évolutives particulières sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent de comprendre les mécanismes d'un processus complexe. En effet, c'est souvent dans les exceptions que des éléments de réponses peuvent être apportés. Dans ce but, nous avons choisi de travailler sur un modèle à croissance indéterminée : le cloporte commun *Armadillidium vulgare*.

## VI. Organismes à croissance indéterminée : sénescence négligeable ?

Parmi les organismes soupçonnés de présenter une sénescence dite « négligeable », il y a les organismes à croissance indéterminée. Ces organismes ont pour particularité de croître tout au long de leur vie, ils ont une courbe de croissance dite « asymptotique » (Karkach 2006). La plupart des poissons, les lézards et les serpents mais aussi les crustacés sont des organismes à croissance indéterminée. Cette particularité peut entraîner une augmentation du succès de reproduction avec l'âge (Vaupel et al. 2004, Figure 9). En effet, les individus reproducteurs âgés étant beaucoup plus grands que les individus reproducteurs jeunes, les individus âgés ont des gonades plus importantes et sont donc avantagés dans la reproduction ce qui va à l'encontre des théories de sénescence prédisant une baisse de la reproduction avec l'âge (Vaupel et al. 2004). Chez ces espèces, les vieux organismes sont donc souvent considérés comme de véritables

forces dans la reproduction. Ainsi, chez certains poissons, ce sont les plus vieux et donc les plus gros individus qui présentent le meilleur succès de reproduction (Venturelli et al. 2009). Pourtant de récents indices indiquent que sur certains traits concernant la reproduction, les performances de ces organismes aussi déclinent avec l'âge. Par exemple, chez les mâles guppy la vitesse et la vitesse des spermatozoïdes diminuent avec l'âge (Gasparini et al. 2010) et chez le poisson zèbre, le comportement de reproduction chez les mâles est lui aussi altéré avec l'âge (Kanuga et al. 2011). Ainsi, la théorie selon laquelle la sénescence est négligeable chez ces espèces reste à prouver et nécessite le développement d'études sur ces organismes présentant une stratégie de croissance particulière.

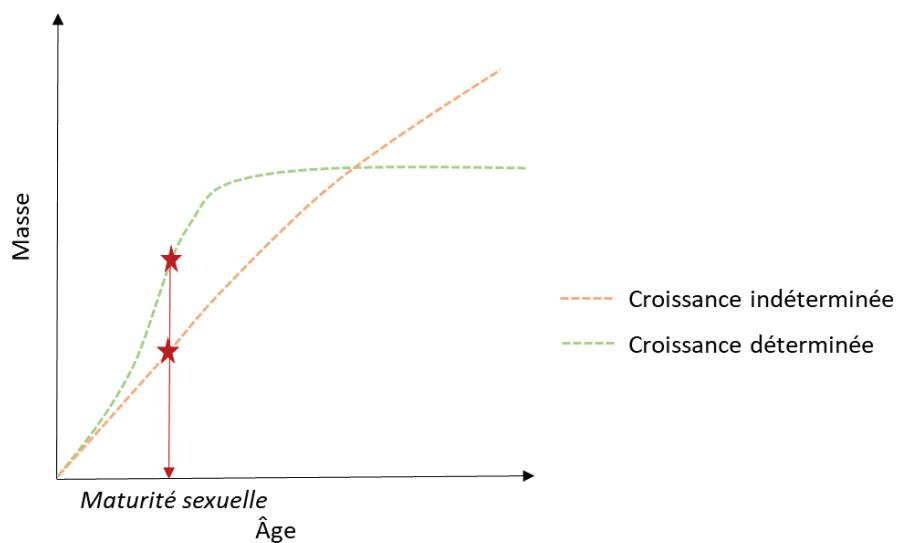


Figure 9 : Courbe de croissance en fonction des stratégies de croissance des organismes

## VII. Objectifs de la thèse et démarche adoptée

Ce qui passionne les biologistes évolutionnistes est de comprendre le fonctionnement et l'évolution des espèces au cours du temps. Pour autant, les dernières études s'accordent sur le fait que la clef pour comprendre le fonctionnement d'un processus aussi complexe que celui de la sénescence est de réaliser une étude approfondie chez des espèces très différentes et possédant des stratégies d'histoire de vie très diversifiées (Shefferson et al. 2017a). En effet, c'est la diversité des approches et des modèles biologiques qui permet de comprendre les mécanismes régissant l'évolution des espèces. Ainsi, l'étude des

## INTRODUCTION

organismes présentant une sénescence négligeable ou lente paraît indispensable. Parmi ces organismes, nous avons présenté ci-dessus les organismes à croissance indéterminée. Bien que jusqu'à récemment catégorisés comme étant des organismes à sénescence négligeable (Jones et al. 2014), de récentes études tendent à montrer qu'ils présentent finalement des signes de sénescence reproductive (Kanuga et al. 2011). Puisque les données sont encore très peu nombreuses sur ces organismes, il semble indispensable de développer les connaissances sur de tels modèles. Parmi les organismes à croissance indéterminée, le cloporte commun *Armadillidium vulgare* est un isopode terrestre capable de vivre jusqu'à trois ans. Facile à élever et à maintenir en conditions contrôlées, ce petit organisme est un élément important de la chaîne alimentaire (Souty-Grosset et al. 2005) et est très sensible aux variations environnementales (Miller and Cameron 1987 ; Mocquard et al. 1989). Bien qu'il n'ait jamais été étudié dans ce contexte, il rassemble donc toutes les qualités pour étudier la sénescence.

L'objectif de cette thèse sera donc d'explorer les patrons de sénescence chez cet organisme à croissance indéterminée et de comprendre quels peuvent être les stress pouvant influencer ces patrons (Figure 10). Comme *Armadillidium vulgare* n'a jamais été étudié dans le cadre de la sénescence, le premier et deuxième chapitre de ma thèse se consacreront à l'étude des patrons de sénescence actuarielle et reproductive de cette espèce. Le troisième chapitre s'appuie sur le développement de biomarqueurs cellulaires de sénescence, visant aussi à étudier d'un point de vue cellulaire ce processus. Enfin, nous testerons l'effet de différents stress environnementaux sur les profils mis en évidence dans les précédents chapitres.

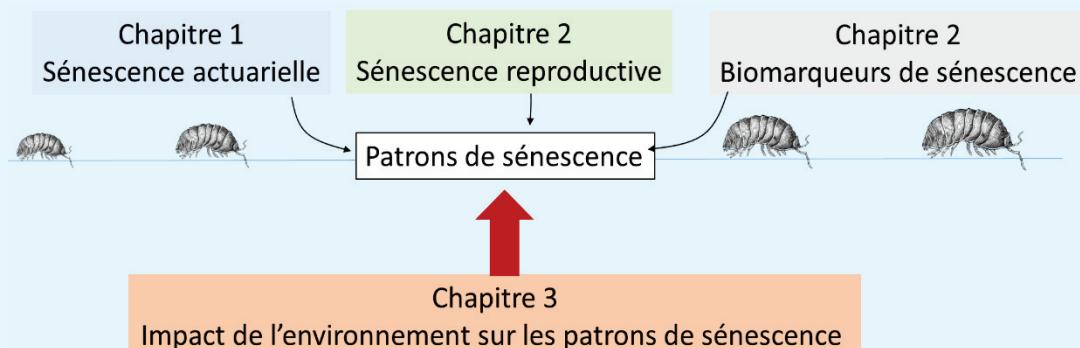


Figure 10 : Configuration du manuscrit et des travaux menés lors de la thèse

## Matériels et Méthodes

---

## I. Matériel Biologique : le cloporte

### I.1. Généralités

Le cloporte commun, *Armadillidium vulgare* de son nom latin, appartient à l'ordre des Isopodes et au sous-ordre des Oniscidae ([Tableau 1, Figure 11](#)). Plus connu sous le nom de cochon de Saint-Antoine en français et de *pill bug* en anglais, ce petit crustacé est originaire du sud de l'Europe (Vandel 1962). Ayant une durée de vie pouvant aller jusqu'à 3 ans (et dans des cas exceptionnels 4 ans) (Paris and Pitelka 1962), il est aujourd'hui présent sur tous les continents suite aux activités humaines. Le cloporte est une espèce grégaire, caractéristique lui permettant de garder l'humidité et ainsi de ne pas souffrir de la dessiccation (Takeda 1980). On le trouve généralement dans des milieux boisés, humides et dans les jardins.



Figure 11 : Photo d'un cloporte mâle de l'espèce *Armadillidium vulgare*

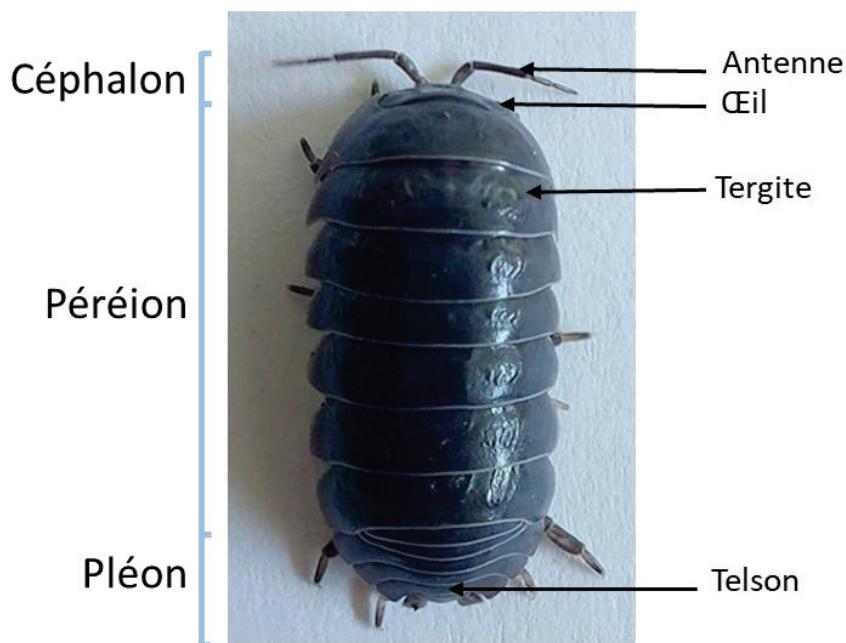
Tableau 1 : Systématique de l'espèce étudiée

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Crustacea
Classe	Malacostraca
Ordre	Isopoda
Sous-Ordre	Oniscidea
Famille	Armadillidiidae
Genre	<i>Armadillidium</i>
Espèce	<i>vulgare</i>

## I.2. Anatomie

Le corps d'un cloporte est constitué de 3 parties ([Figure 12](#)) :

- Le céphalon qui porte l'appareil buccal, les yeux et les antennes.
- Le péréion constitué de 7 segments. Ces segments sont appelés sternites sur la voie ventrale et tergites sur la voie dorsale. Chaque segment porte une paire de pattes.
- Le pléon, qui lui est constitué de 6 segments appelés pléonites et du telson soudé au dernier pléonite. Sur la face ventrale, le telson se compose de 5 paires de pléopodes.



[Figure 12 : Morphologie générale du cloporte commun \*Armadillidium vulgare\*](#)

### I.2.1. Appareils reproducteurs

#### I.2.1.1 Appareil reproducteur du mâle

Sur la partie ventrale du cloporte, au niveau du pléon, les deux paires de pléopodes se différencient en endopodites (organes reproducteurs) ([Figure 13\(A\)](#)). La première paire se différencie en stylets copulateurs tandis que les endopodites de la deuxième se collent aux stylets copulateurs pour permettre l'écoulement du sperme (Vandel 1960).

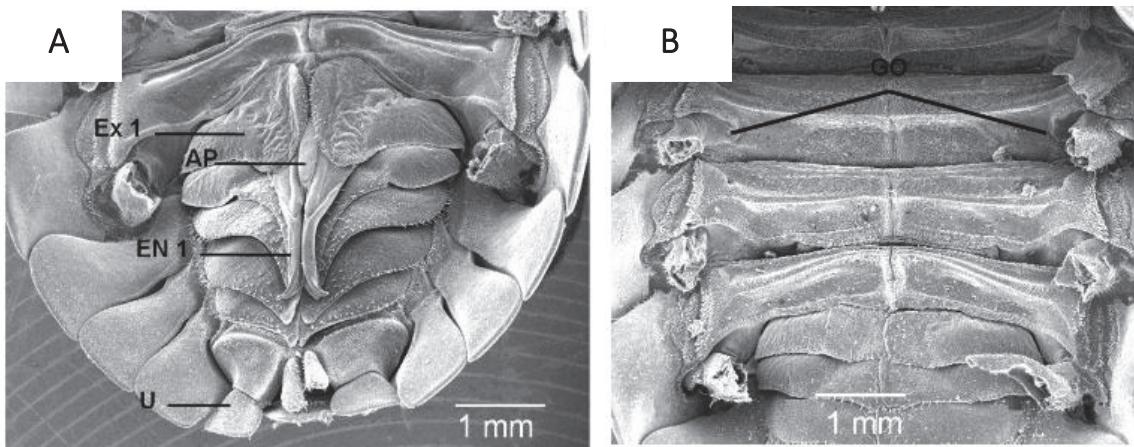


Figure 13 : Organe génital mâle (A) et femelle (B) photographié au microscope électronique à balayage chez *Armadillidium vulgare*

Chez le mâle (A) : Ex1 : Exopodite 1 ; AP ; Apophyse génitale ; EN1 : Endopodite 1 ; U : Uropodes

Chez la femelle (B) : GO : ouvertures génitales

Source : (Fortin, 2016)

La gonade mâle est constituée de 3 parties (Figure 14). Chaque stylet copulateur est relié à un canal déférent, lui-même relié à la vésicule séminale. Cette vésicule est surmontée de trois petits saccules que l'on appelle les utricules. Les spermatozoïdes forment des « bundles » (i.e. des regroupements formés de 15 à 30 spermatozoïdes) (Itaya 1979; Fortin 2016)

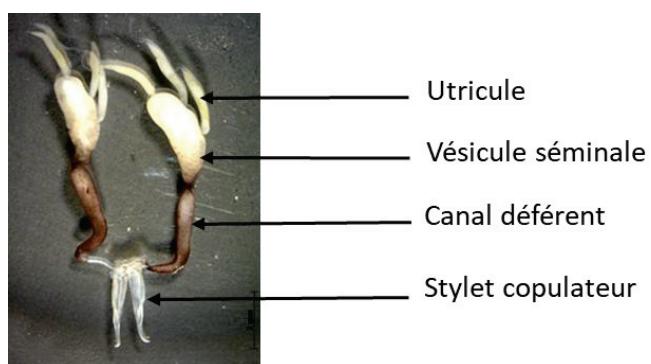


Figure 14 : photographie (x10) des gonades mâles

#### I.2.1.2. Appareil reproducteur de la femelle

Chez la femelle, les ouvertures génitales se trouvent à la base des 5<sup>èmes</sup> paires de pattes. Chaque ouverture est reliée à l'oviducte qui s'ouvre dans l'ovaire. A la jonction de l'oviducte et de l'ovaire se trouve un petit anneau qui permettra le stockage des spermatozoïdes et que l'on appelle « spermathèque » (Figure 15).

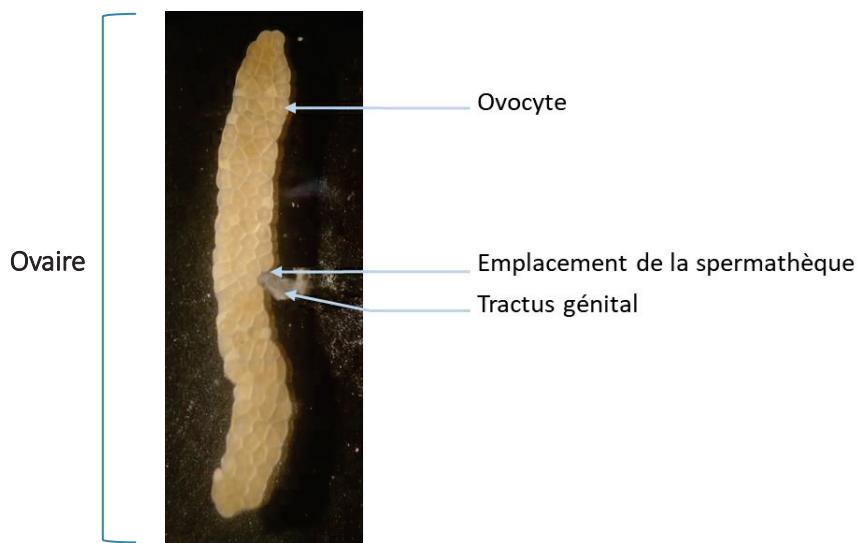


Figure 15 : Photographie (x10) d'un ovaire de cloporte femelle

### I.3. Croissance et mue

Le cloporte est un organisme à croissance indéterminée, c'est-à-dire que contrairement aux insectes, il grandit tout au long de sa vie par des mues successives. Le processus de mue est composé de 4 périodes chez les Oniscidea (Figure 16).

- Lors de la période A, se déroule l'exuviation, aussi appelée ecdysis. Cette étape dure entre 1 et 2 jours. L'exuviation va commencer par la partie postérieure du cloporte : péréionites 5, 6 et 7, pléon et telson, puis après 12h à 24h, c'est la partie antérieure du cloporte qui mue, comprenant le céphalon et les péréionites 1 à 4.
- Au cours de la période B, durant environ 2 jours, le cloporte est immobile, mou et donc vulnérable aux prédateurs.
- La période suivante, appelée C, est la période de diecdysis, le cloporte est dur et actif.
- La dernière période, la période D, correspond à la période durant laquelle le cloporte se prépare à la prochaine mue, des plaques blanches apparaissent alors sur la face ventrale du cloporte. Elles correspondent à une accumulation de carbonate de calcium que le cloporte recycle afin d'éviter les pertes lors de la prochaine mue. Cette période de pré-ecdysis peut durer environ 16 jours.

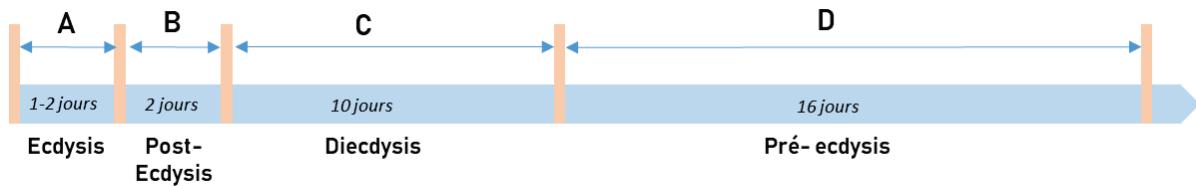


Figure 16 : Cycle de mue chez *A. vulgare*

L'*ecdysis* correspond à la perte de l'ancienne cuticule, elle est réalisée en deux étapes. La partie postérieure en premier, et la partie antérieure ensuite.

#### I.4. Reproduction

Chez le cloporte, comme chez la plupart des espèces animales, le processus de reproduction, présenté en [Figure 17](#), est saisonnier. Cette temporalité permet de donner plus de chances aux jeunes qui naîtront ainsi durant la période la plus favorable à leur survie. Ainsi, les signaux tels que l'augmentation de la température ou la modification de l'intensité lumineuse stimulent l'animal et entraînent la mise en reproduction (Mocquard et al. 1989 ; Souty-Grosset et al. 1993). Selon la provenance des animaux, le moment où les individus entrent en reproduction varie (Souty-Grosset et al. 1988). En France, les femelles gravides sont observées du mois d'avril au mois d'octobre (Vandel 1962).

Pour comprendre le processus de reproduction chez *A. vulgare*, il faut tout d'abord comprendre comment fonctionne la maturation des ovocytes chez la femelle ([Figure 18](#)). En effet, alors que les mâles semblent être capables de se reproduire toute l'année, les femelles doivent réaliser des mues particulières leur permettant de mettre en place une poche ventrale appelée *marsupium* et ainsi de porter les petits lors de leur développement. Une étape importante consiste en la maturation des ovocytes. Pour que ces derniers soient fécondables, ils doivent s'être chargés en réserves vitellines. Hors saison de reproduction, durant les périodes de « mues normales », les ovocytes se différencient. Après avoir stocké des ressources vitellines, les ovocytes entrent en phase de vitellogenèse primaire. Ils stoppent leur développement à cette étape et lorsque les conditions environnementales sont propices à la reproduction, les ovocytes connaissent une étape de maturation, appelée intermue préparturielle (Mocquard et al. 1989). Ils subissent alors une vitellogenèse secondaire et accroissent leur taille par la mise en réserve du vitellus (Souty-Grosset 1984).

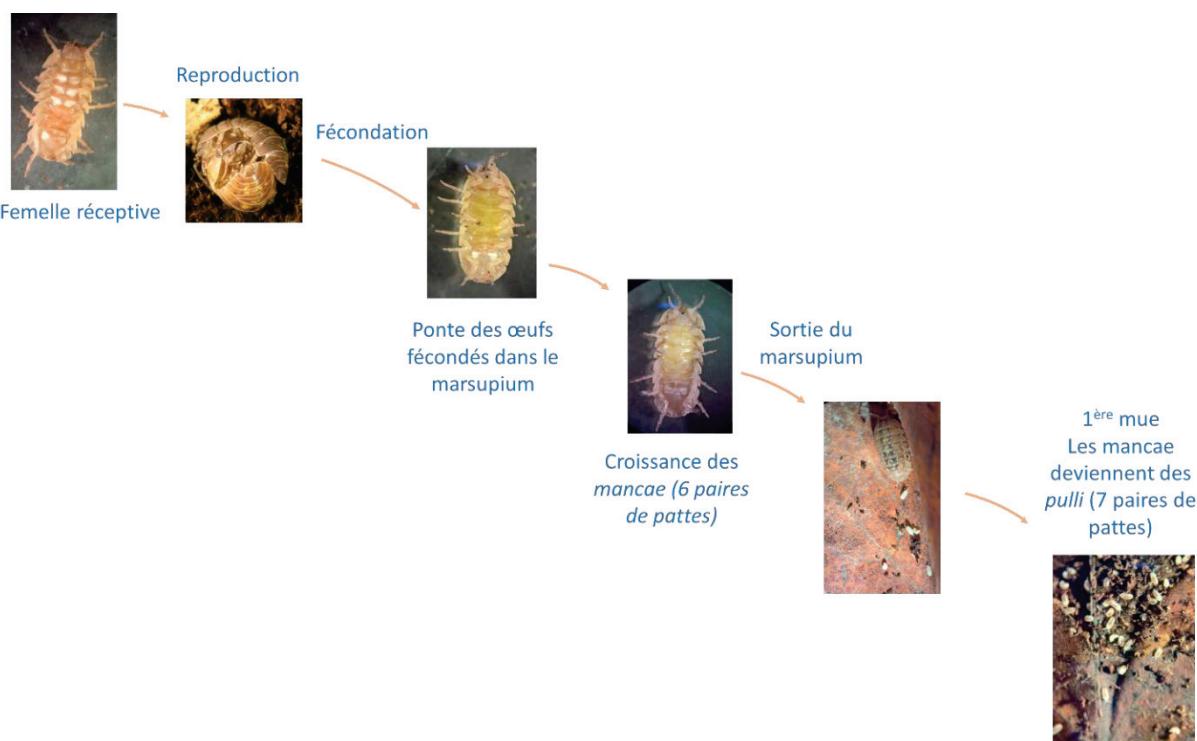


Figure 17 : Etapes de la reproduction chez le cloporte commun *A. vulgare*

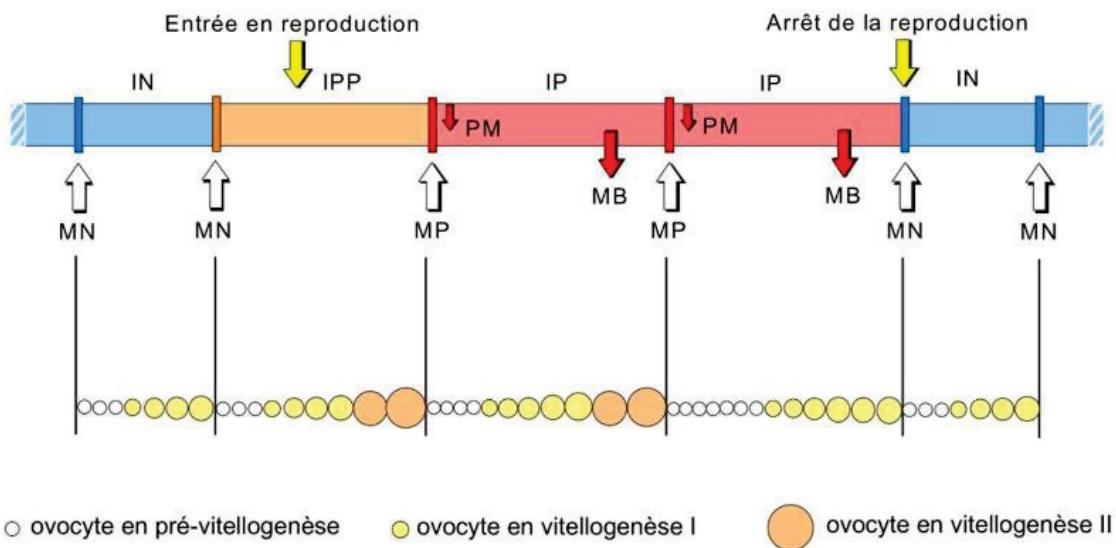


Figure 18 : Cycle de mue et de reproduction chez le cloporte commun *A. vulgare*

Les cercles représentent les ovocytes, en blanc lorsqu'ils sont en pré-vitellogenèse, en jaune lorsqu'ils sont en vitellogenèse primaire et en orange lorsqu'ils sont en vitellogenèse secondaire. MN : Mue Normale ; MP : Mue Parturielle ; IN : Inter-Mue ; IPP : Intermue Préparturielle ; MP : Mue Parturielle. Source : Lefebvre, 2002.

Juste avant d'effectuer leur mue parturielle (Figure 18), les femelles sont réceptives à l'accouplement (Beauché and Richard 2013). Le dépôt des plaques de calcium précédent une mue sur leur face ventrale prennent alors une forme particulière (Moreau and Rigaud 2002, Figure 17). Lors de l'accouplement, le mâle insère son appareil copulateur de façon successive dans les deux ouvertures génitales de la femelle (Mead 1973). Le sperme est alors déposé dans le tractus génital de la femelle avant de migrer vers la spermathèque (Suzuki and Ziegler 2005). Les ovocytes, alors matures, traversent cet anneau spermatique, qui est déstabilisé et c'est probablement à ce moment que les ovocytes sont fécondés. Ils migrent ensuite dans la poche marsupiale (Suzuki and Ziegler 2005). Après 1 mois d'incubation dans la poche marsupiale, et le développement visible des embryons dans le *marsupium*, les *mancae* qui ne possèdent alors que 6 paires de pattes émergent du *marsupium* (Surbida and Wright 2001, Figure 19). Ils effectuent une première mue dans les premières 24h, qui leur permet d'acquérir une 7<sup>ème</sup> paire de pattes, ils sont alors appelés « *pulli* ». Si la femelle n'a pas été inséminée par un mâle, elle effectue tout de même une mue parturielle et une ponte de ses ovocytes non fécondés dans son *marsupium*. C'est ce qui est appelé une « ponte blanche ».

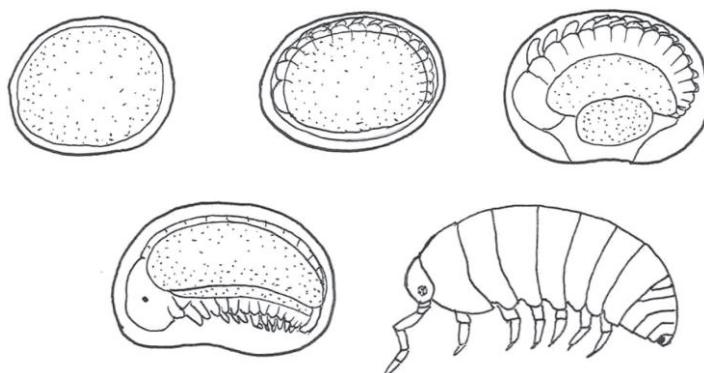


Figure 19 : Développement du cloporte de la fécondation à la naissance

D'après Rockhill et al. 2019

La spermathèque de la femelle peut contenir les spermatozoïdes de plusieurs mâles et le maintenir pour l'utiliser pour plusieurs reproduction (Howard 1943 ; Bech et al. 2017). Ainsi, dans la nature, les portées produites par les femelles d'*A. vulgare* sont composées d'environ 5 pères différents, alors que les mâles, eux, ne semblent pas limités sauf en cas de fortes compétitions entre mâles (Durand et al. 2020). Le système d'appariement est

## MATERIELS ET METHODES

---

donc de type promiscitaire, ce qui doit être, vraisemblablement facilité par le caractère grégaire de cette espèce. Nous avons aussi observé chez cette espèce, une capacité pour la femelle à refuser l'accouplement (Mead 1973) mais aussi à choisir son partenaire sur des critères génétiques (Durand et al. 2015, 2017a,b ; Fortin et al. 2018).

### I.5. Elevage

Le laboratoire EBI de Poitiers possède un très grand élevage d'Oniscidés. Tous les individus sont maintenus dans des boîtes en plastique contenant du terreau non traité (*i.e.* exempt de tout fertilisant). Tous les animaux sont maintenus dans les mêmes conditions d'élevage : une température constante de 20°C, la photopériode naturelle de Poitiers (46° 35' N, 0° 20' E), avec une nourriture *ad libitum* constituée de feuilles séchées réhydratées de tilleul et de rondelles de carottes dans des boîtes classiques d'élevage (Figure 20A). Les animaux sont obtenus à partir d'individus prélevés sur le terrain. Pour la lignée étudiée dans cette thèse, les animaux proviennent d'individus qui ont été prélevés à Helsingör (Finlande) en 1982. Afin de faire perdurer les lignées, les cloportes sont mis en reproduction une fois par an. Pour cela, des couples non apparentés sont réalisés et déposés dans de petites boîtes circulaires (Figure 20B). Chaque couple est placé dans une salle dite « à photopériode stimulante », mimant la luminosité stimulante pour l'entrée en reproduction. Les boîtes sont contrôlées de façon hebdomadaire afin de suivre le statut des femelles et de noter les gravidités. Quand les petits naissent, ils sont isolés dans de grandes boîtes en plastiques rectangulaires jusqu'à atteindre leur maturité sexuelle. Lorsque les individus sont assez gros, qu'ils ont atteint cette maturité sexuelle, ils sont triés par sexe et séparés dans deux boîtes différentes afin d'éviter toute reproduction entre frères et sœurs. Ainsi, chaque individu dans une boîte à l'issue des tris est vierge et d'ascendance connue.

A.



B.



Figure 20 : Aperçu des conditions d'élevage du cloporte : en (A), les conditions de maintenance des cloportes adultes sexés et séparés. En (B), boîte contenant des couples

## I.6. Prélèvement d'hémolymphé et de tissus

### I.6.1. Prélèvement de l'hémolymphé

Afin de prélever l'hémolymphé d'un cloporte, il est tout d'abord nécessaire de lui faire effectuer 3 bains successifs (le premier d'eau de javel 70%, suivi de deux bains successifs d'eau) afin de le nettoyer. Le bain consiste seulement à tremper l'animal quelques secondes. Ensuite le cloporte est placé sur la face ventrale. Un trou est effectué avec une petite aiguille au centre de la 6ème tergite afin d'atteindre le vaisseau dorsal ([Figure 21](#)). Une goutte d'hémolymphé surgit alors. Elle est récupérée avec une micropipette.



Figure 21 : Emplacement du trou à effectuer pour prélever l'hémolymphé

### I.6.2. Prélèvement de la chaîne nerveuse

Le prélèvement de la chaîne nerveuse nécessite le sacrifice de l'animal, pour cela la tête et la partie inférieure du telson sont coupés rapidement. L'animal est ensuite déposé dans une solution de Ringer, et disséqué sous loupe binoculaire. La chaîne nerveuse est blanche et composée de différentes ramifications ([Figure 22](#)). Elle est fragile et nécessite une dissection délicate.

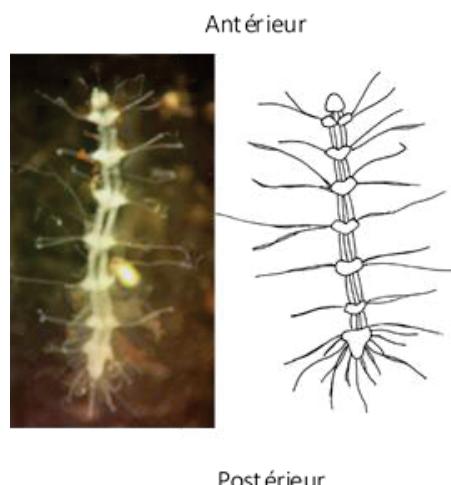
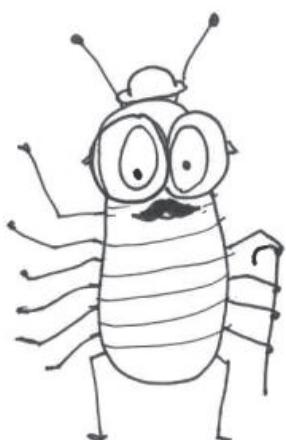


Figure 22 : Photographie et schéma d'une vue ventrale de chaîne nerveuse (x15)

*1.6.3. Prélèvement des gonades*

Tout comme pour la chaîne nerveuse, les gonades chez les mâles comme chez les femelles, nécessitent le sacrifice de l'animal. Ensuite, il suffit de casser les sternites pour ouvrir l'animal et prélever les gonades.

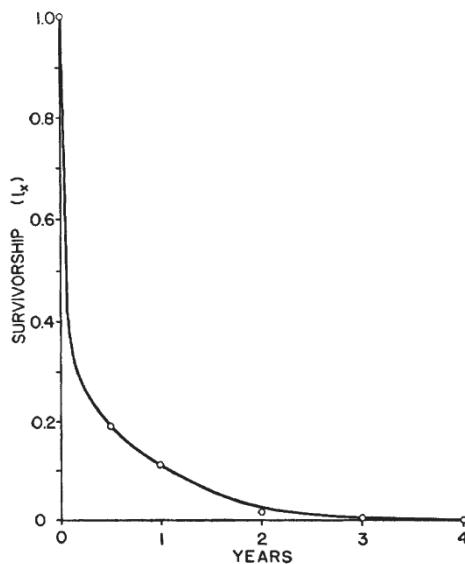


## Chapitre I : Etude de la sénescence actuarielle chez *A. vulgare*

---

## I. Introduction

Les données démographiques concernant les populations d'*A. vulgare* nous viennent de Paris et Pitelka en 1962. A partir d'individus prélevés dans les populations en Californie, et en prenant la taille des animaux comme proxy de l'âge, Paris et Pitelka ont montré que la probabilité de survie diminuait avec l'âge (Paris and Pitelka 1962 ; [Tableau 2](#) ; [Figure 23](#)), et qu'après la première année de vie, très peu d'animaux survivaient ([Tableau 2](#)).



[Figure 23 : Probabilité de survie du cloporte \*A. vulgare\*](#)

Cette courbe a été réalisée grâce à des données réalisées en milieu naturel dans les pâties de Californie entre 1957 et 1960. Source : Paris et Pitelka, 1962.

[Tableau 2 : Table de survie et reproduction chez A. vulgare](#)

Source : Paris et Pitelka, 1962

TABLE VI. Ecological life table

x Age (years)	l <sub>x</sub> Survivorshp (on April)	l <sub>x</sub> ♀ Survivorship of females	m <sub>x1</sub> m <sub>x2</sub>		l <sub>x</sub> ♀ m <sub>x1</sub> l <sub>x</sub> ♀ m <sub>x2</sub>		$\sum_{i=1}^2 l_x \text{♀ } m_{xi}$ Age specific fecundity Annual totals	
			Fecundity rates*		Age-specific fecundity*			
			Early	Late	Early	Late		
0.....	1.0000	—	—	—	—	—	—	
½.....	0.1900	—	—	—	—	—	—	
1.....	0.1104	0.0555	0.7719	5.4814	0.0428	0.3042	0.3470	
2.....	0.0144	0.0058	23.6534	61.3966	0.1372	0.3561	0.4933	
3.....	0.0020	0.0008	79.2750	122.6875	0.0634	0.0981	0.1615	
4.....	0.0002	0.0001	237.5000	—	0.0238	—	0.0238	
5.....	0.0000	—	—	—	—	—	—	
$R_0 = 1.0126$								

\* Fecundity is computed for each of two modalities of reproduction during the breeding season.

Au laboratoire, nous arrivons à obtenir des individus de 3 ans et de manière plus exceptionnelle, des animaux de 4 ans. Nous observons dans nos élevages une diminution des effectifs après la première saison de reproduction sans avoir pour autant étudié cette dynamique. En effet, à ce jour et à notre connaissance, aucune étude en laboratoire n'a jusqu'alors été menée pour mesurer la sénescence chez cette espèce. A l'aide d'une base de données constituée en 2014 par une autre doctorante du laboratoire EBI, Sylvine Durand (doctorante de 2014 à 2017 au laboratoire EBI), et en la complétant avec un suivi réalisé durant ma thèse, nous explorons dans ce chapitre I, les patrons de sénescence actuarielle chez les femelles. Cette étude n'est qu'à ses prémices mais révèle déjà des informations intéressantes. Les premiers résultats présentés ici sont donc encore à l'état descriptif et nécessiteront une étude statistique plus complète.

## II. Matériels et Méthodes

### II.1. Matériel biologique

L'étude est réalisée à partir d'une base de données constituée par S. Durand. Elle représente le suivi individuel de 32 femelles de la même lignée que celle utilisée durant ma thèse. Ces femelles sont âgées de 1 an et ont, juste avant le suivi, été mises en reproduction avec 2 mâles vierges de la même lignée et du même âge. Les animaux ont ensuite été mis en photopériode stimulante pour « déclencher » leur reproduction. Un suivi hebdomadaire permettait de recenser les gravidités, les naissances et les morts. Lorsque les femelles étaient gravides et sur le point de mettre bas, elles étaient isolées dans des boîtes de Petri avec une feuille de papier absorbant mouillée. Ainsi, à leur naissance, les petits pouvaient être prélevés avec un pinceau et comptés. Le suivi de ces femelles a été réalisé jusqu'à ce que la dernière femelle meure.

Afin de compléter le jeu de données et en particulier pour mesurer les mortalités en amont de la première reproduction simulée dans l'étude de S. Durand, nous utilisons dans ce chapitre I les données de suivi de 40 femelles âgées de 200 jours pendant 200 jours (jeu de données issu du groupe contrôle (*i.e.* femelles maintenues en conditions classiques d'élevage) de l'expérience « stress température » Chapitre IV).

## II.2. Statistiques

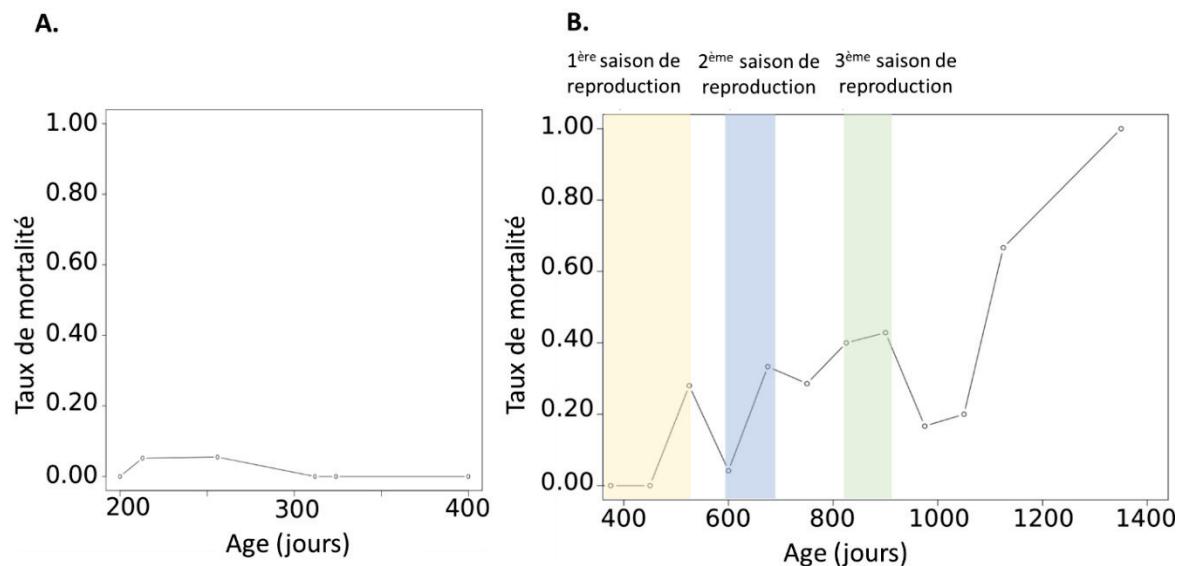
Afin de tester l'effet de l'âge sur la sénescence actuarielle, nous réalisons un tableau contenant les différents taux de mortalité observés en fonction du temps. Nous réalisons ensuite un modèle linéaire généralisé à distribution binomiale pour tester l'effet de la période (saison de reproduction / période de repos) sur les taux de sénescence observés. Pour cela, nous fusionnons les données des deux études (taux de mortalité entre 200 et 400 jours et taux de mortalité au-delà de 400 jours), présentées précédemment ([Figure 24](#)). Puis nous testons, par des modèles linéaires avec distribution Gaussienne, l'effet de la saison de reproduction sur le nombre total de *mancae* produit. Nous testons également l'effet de l'effort de reproduction précoce (1<sup>ère</sup> saison de reproduction) sur la reproduction tardive (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> saisons de reproduction) en regardant si le nombre total de *mancae* produits lors de la première saison de reproduction impacte de façon significative le nombre de *mancae* produits lors de la deuxième et de la troisième saison de reproduction, mais aussi si cette allocation en nombre de descendants impacte la survie des femelles. Pour cela, nous réalisons des modèles linéaires avec distribution Gaussienne.

## III. Résultats

Les femelles vivent en moyenne 755 jours, avec une médiane située à 686 jours. La première mortalité est enregistrée au bout de 450 jours, et la dernière au bout de 1329 jours (soit presque 4 ans) ([Figure 24](#)). Entre 200 et 400 jours, nous observons un faible taux de mortalité des femelles cloportes ([Figure 24A](#)). L'onset de sénescence intervient vers 450 jours, en plein milieu de la 1<sup>ère</sup> reproduction ([Figure 24B](#)) et les taux de mortalité sont significativement plus élevés lorsque les cloportes se situent dans une période de reproduction ( $F_{1,14}=5.61$ ,  $P=0.03$ ).

Nous distinguons également 3 saisons de reproduction : une première située entre 400 et 470 jours, une seconde située entre 600 et 675 jours, et une troisième située entre 810 et 920 jours ([Figure 24](#)). Après mise en reproduction, les femelles produisent jusqu'à 5 portées ([Tableau 3](#) : Caractéristiques des portées obtenues ; [Figure 25](#)), avec une deuxième portée qui comporte significativement moins de *mancae* que la première portée (Estimate  $\pm$  se =  $-18.47 \pm 2.19$ ,  $P=0.038$  ; [Tableau 3](#) : Caractéristiques des portées

obtenues ; [Figure 25](#)). Lorsque nous regroupons les portées dans chaque saison de reproduction, nous observons que le nombre de *mancae* produits est moins important durant la deuxième et troisième saisons de reproduction ( $\text{Chisq}_1=33.55$ ,  $P<0.001$  ; Respectivement :  $\text{Estimate} \pm \text{se} = -90.58 \pm 19.98$  ;  $\text{Estimate} \pm \text{se} = -136.55 \pm 30.35$  ; [Figure 26](#)). Nous ne trouvons cependant aucun effet significatif de l'allocation à la reproduction précoce sur la reproduction tardive ( $\text{Chisq}_1=0.10$ ,  $P=0.74$  ;  $\text{Chisq}_1=0.16$ ,  $P=0.68$ ) ou sur la survie des femelles ( $F_{1,30}=1.91$  ;  $P=0.17$ ).



**Figure 24 :** Taux de mortalité des femelles cloportes entre (A) 200 et 400 jours et entre (B) 400 et 1400 jours

Les saisons de reproductions sont déterminées à partir des portées obtenues dans ces intervalles de temps. La première saison de reproduction (couleur jaune) est plus étendue puisque nous observons jusqu'à trois portées contre deux lors de la deuxième saison de reproduction (couleur bleue) et une seule lors de la troisième saison de reproduction (couleur verte).

**Tableau 3 : Caractéristiques des portées obtenues**

	1ère portée	2ème portée	3ème portée	4ème portée	5ème portée
<b>Nombre de mancae minimum</b>	61	22	68	42	98
<b>Nombre de mancae maximum</b>	186	194	182	174	98
<b>Nombre de mancae médian</b>	105	86	114	107	98
<b>Nombre moyen de mancae</b>	109,41	92,4	115,14	103,4	98
<b>Nombre de femelles ayant connu cet événement</b>	32	30	14	8	2

en %

100

93,75

43,75

25

6,25

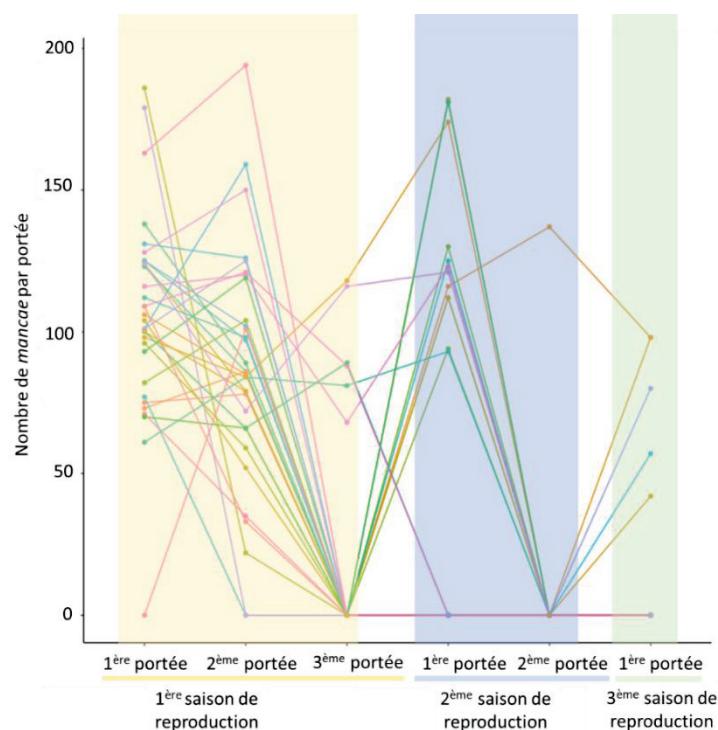


Figure 25 : Nombre de mancae produits par portée en fonction de la saison

Chaque ligne représente une femelle différente. En absence de portée, les femelles ont été renseignées comme ayant produit « 0 » mancae.

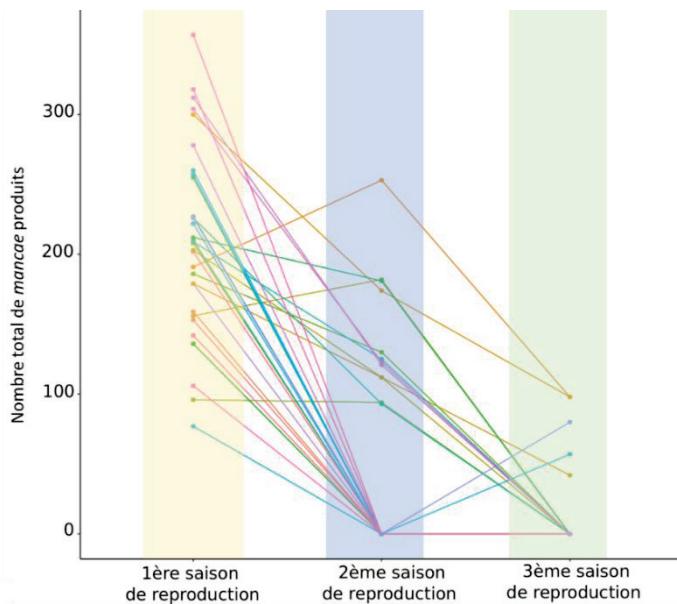


Figure 26 : Nombre total de mancae produits par saison de reproduction

Chaque ligne représente une femelle différente. Toutes les portées produites lors de la première, de la deuxième ou de la troisième saison de reproduction ont été additionnées pour pouvoir visualiser l’allocation à la reproduction en fonction de chaque saison.

#### IV. Discussion

A l'aide de l'ensemble de ces données, nous avons pu mettre en évidence l'effet important de la reproduction sur la sénescence actuarielle du cloporte. En effet, l'onset de sénescence semble intervenir au moment de la reproduction. Avant la reproduction et entre les saisons de reproduction, les taux de mortalité sont moins élevés que lors des différentes saisons de reproduction. Comme l'ont observé Paris et Pitelka en 1962, la première saison de reproduction est très couteuse en terme de survie pour les cloportes femelles (Paris and Pitelka 1962). En effet, nous observons que l'effort de reproduction est plus important lors de la première saison de reproduction durant laquelle plus de 90% des femelles ont produit deux portées, et plus de 40% des femelles en ont produit 3. Nos résultats coïncident avec ceux de Paris et Pitelka en 1962 rapportant un taux de mortalité très important après la première année de vie.

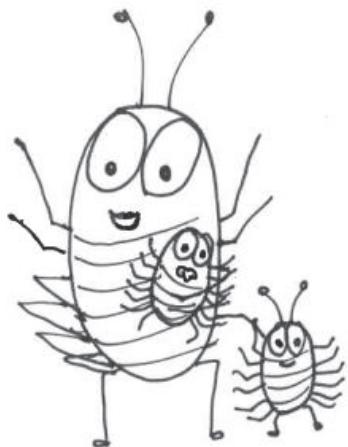
Le succès reproducteur en termes de nombre de descendants est lui aussi impacté par l'âge (et la saison de reproduction) chez le cloporte, révélant une sénescence reproductive chez cette espèce à croissance indéterminée, *a contrario* de ce qui est attendu chez ce type d'organismes. Cela étant dit, dans l'expérience de S. Durand, les

femelles n'ont rencontré que deux mâles et ce, au début de leur vie. Nous ne pouvons donc pas exclure que le peu de descendants obtenus lors de la deuxième et la troisième saison de reproduction soit le résultat d'une quantité trop faible de spermatozoïdes contenus dans la spermathèque chez certaines femelles qui peuvent survivre relativement longtemps après leur dernière portée. Etudier plus en détail la sénescence reproductive chez cette espèce reste donc nécessaire (cf. Chapitre II).

Bien qu'il n'y ait aucun effet de l'allocation précoce à la reproduction sur la reproduction tardive ou sur la survie comme nous pouvions l'attendre (Lemaître et al. 2015), les résultats illustrés sur les [Figure 25](#) et [Figure 26](#) suggèrent que les individus ayant investi de l'énergie de façon importante en début subissent le coût de cet investissement sur leur allocation à la reproduction les saisons suivantes. Ce processus du coût de la reproduction précoce sur la reproduction tardive est retrouvé chez de nombreux organismes (Lemaître et al. 2015).

Le choix de telle ou telle stratégie pourrait être conditionné par le poids (ou la taille) de la femelle lors de la première saison de reproduction, connu pour avoir un effet important sur le nombre de petits produits (Durand et al. 2018 ; Lefebvre et al. 2019) mais qui n'a pas été mesuré dans l'expérience de S. Durand. Des expériences utilisant des femelles de même âge mais de poids (et taille) différent pourraient permettre de tester cette hypothèse.

Ces résultats, même s'ils nécessitent des analyses plus approfondies, apportent les premiers indices de sénescence actuarielle et reproductive chez cet organisme à croissance indéterminée et nous amènent à étudier de façon plus précise la sénescence reproductive (chapitre II), jusqu'alors non soupçonnée chez le cloporte, modèle biologique chez lequel nombreux auteurs ont jusqu'ici considéré les vieux animaux et en particulier les vieilles (et grosses) femelles comme de véritables forces dans la reproduction (Paris and Pitelka 1962; Dangerfield and Hassall 1992; Caubet 1998).



## Chapitre II : Etude de la sénescence reproductive chez A. *vulgare*

---

“The youngest mother, on the average, had the longest-lived offspring”

Alexander Graham Bell (1918)

## I. Introduction

Avec l'âge, les organismes voient leur succès de reproduction diminuer dans un processus appelé « sénescence reproductive ». Par définition, le succès de reproduction est la capacité d'un individu à produire des descendants capables eux-mêmes de se reproduire. Il est le résultat d'un processus complexe mettant en œuvre de nombreuses étapes allant de la production des gamètes aux soins parentaux. Bien souvent, seules certaines de ces étapes sont étudiées pour révéler la présence ou l'absence de sénescence reproductive.

Chez des organismes à croissance indéterminée, les individus vont croître avec le temps entraînant ainsi des capacités physiques plus importantes lors de la reproduction. Il est donc théoriquement attendu que le succès reproducteur chez ces organismes augmente avec l'âge (Vaupel et al. 2004). Chez les poissons notamment, il semblerait que les plus gros individus, et donc les plus vieux, produisent plus de descendants que les plus petits, et donc, plus jeunes individus (Venturelli et al. 2009). Pour autant, le nombre de petits n'est qu'un des nombreux paramètres constituant le succès reproducteur et de récentes études tendent à montrer que bien que le nombre de petits augmente avec l'âge chez ces espèces, d'autres traits peuvent être impactés par l'âge, comme la qualité des spermatozoïdes chez les guppys (*Poecilia reticulata*) ou le comportement de reproduction chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Gasparini et al. 2010 ; Kanuga et al. 2011).

Chez le cloporte *A. vulgare*, le nombre de petits produits augmente avec l'âge de la femelle (Dangerfield and Hassall 1992 ; Lefebvre et al. 2019 ; [Figure 27](#)). En effet, le nombre d'ovocytes est proportionnel à l'âge de la femelle (Lefebvre 2002).

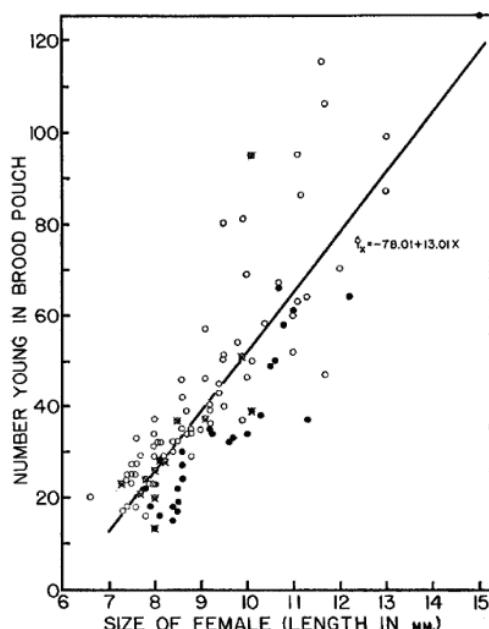


Figure 27 : Nombre de *pulli* comptés dans le *marsupium* en fonction de la taille de la femelle

D'après Paris et Pitelka, 1962

De nombreuses études sur ce modèle biologique ont donc rapportés l'importance des individus âgés en terme de dynamique des populations (Paris and Pitelka 1962 ; Caubet 1998). En effet, en produisant un nombre important d'individus, les individus âgés permettraient le renouvellement des populations. Pour autant, en dehors du nombre d'individus descendants produits, nous n'avons aucun autre indicateur du succès de reproduction des individus âgés chez cette espèce. Par exemple, nous ne savons pas quelle est l'allocation à la reproduction (comportementale ou physiologique), le succès de fécondation, le succès de développement ou encore la qualité des descendants de ces animaux âgés. Afin de pouvoir conclure à une absence de sénescence reproductive dans ce modèle biologique, il est important de tester d'autres traits que le nombre de petits produits à la naissance. Ce chapitre II est donc dédié à l'étude de traits de reproduction des cloportes à des âges différents et plus particulièrement à l'étude (1) de la qualité des descendants issus d'individus âgés comparée à celle des individus jeunes et (2) de l'allocation spermatique à la reproduction des vieux mâles comparée à celle des jeunes mâles.

## II. Age et succès reproducteur : article « Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower» publié dans le Journal of Evolutionnary Biology.

### II.1. Présentation de l'étude

A l'inverse des organismes à croissance déterminée, les organismes à croissance indéterminée vont croître tout au long de leur vie. De ce fait, leurs capacités physiques pour la reproduction peuvent elles aussi croître. Chez le cloporte, le nombre d'ovocytes est plus important chez les grosses et donc vieilles femelles. La femelle cloporte porte les larves pendant un mois dans son *marsupium*, une plus grande taille lui permet de porter plus de petits. Ainsi, de nombreuses études rapportent que les individus plus gros et donc plus vieux produisent plus de descendants que les individus plus jeunes (Paris and Pitelka 1962 ; Lefebvre et al. 2019). Ainsi, jusqu'alors, il était couramment admis que l'âge conférait un avantage à la reproduction chez *A. vulgare*, validant ainsi l'hypothèse de l'absence de sénescence reproductive chez cette espèce (Vaupel et al. 2004). Cependant, comme dit précédemment, l'absence d'études sur d'autres paramètres que le nombre de petits ne permet pas de conclure réellement à cette absence de sénescence reproductive.

Dans cette étude, nous testons l'effet de l'âge des parents sur le nombre de portées obtenues, le nombre de descendants, mais aussi la qualité de ces derniers par leur capacité à eux-mêmes survivre et se reproduire. Pour cela, nous mettons en reproduction 40 couples de cloportes vierges de 1 an (âge de la première reproduction chez cette espèce) et 40 couples de cloportes vierges de 3 ans. Bien que les vieux individus aient tendance à produire moins de portées, ils produisent, comme observé dans les précédentes études, plus de descendants par portée. Cependant, ces descendants présentent une survie moins importante et des difficultés à se reproduire ([Figure 28](#)). Nous mettons ainsi en évidence une sénescence reproductive chez *A. vulgare* avec un effet transgénérationnel de l'âge.

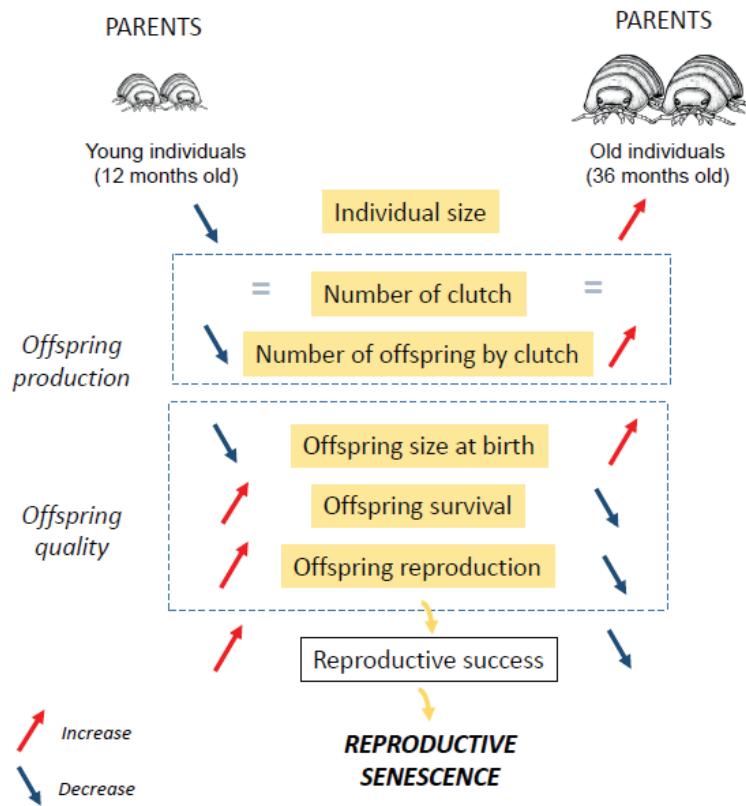


Figure 28 : Résumé graphique de l'étude sur la sénescence reproductive du cloporte

D'après Depeux et al. (2020) (résumé graphique)

Si dans cette étude, nous mettons en évidence un effet de l'âge des parents (mâles et femelles) sur la qualité de leurs descendants, nous ne faisons pas la distinction entre l'effet de l'âge du mâle et l'effet de l'âge de la femelle à cause de l'assortiment par la taille de ces animaux lors de la reproduction. En effet, les individus trop grands ne peuvent pas, mécaniquement, se reproduire avec des individus trop petits, c'est pourquoi, nous n'avons pas pu tester l'effet de l'âge de la femelle et du mâle de façon indépendante dans la présente étude. Pour autant, il semblerait que les descendants des mâles âgés arrivent tout de même à se reproduire à l'instar des descendants de femelles âgées, postulant donc pour un effet transgénérationnel femelle plus fort.

## II.2. Article scientifique

# Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower

Charlotte Depeux<sup>1,2</sup>  | Jean-François Lemaître<sup>2</sup> | Jérôme Moreau<sup>3,4</sup> | François-Xavier Dechaume-Moncharmont<sup>5</sup> | Tiffany Laverne<sup>1</sup> | Hélène Pauillac<sup>1</sup> | Jean-Michel Gaillard<sup>2</sup> | Sophie Beltran-Bech<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, Poitiers Cedex 9, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 558, Université Lyon 1, Villeurbanne cedex, France

<sup>3</sup>UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>4</sup>Centre d'Études Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, Villiers-en-bois, France

<sup>5</sup>Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, Univ Lyon, Villeurbanne, France

## Correspondence

Charlotte Depeux, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

Email: charlotte.depeux@gmail.com

## Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-15-CE32-0002-01; the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers

## Abstract

Reproductive senescence is the decrease of reproductive performance with increasing age and can potentially include trans-generational effects as the offspring produced by old parents might have a lower fitness than those produced by young parents. This negative effect may be caused either by the age of the father, mother or the interaction between the ages of both parents. Using the common woodlouse *Armadillidium vulgare*, an indeterminate grower, as a biological model, we tested for the existence of a deleterious effect of parental age on fitness components. Contrary to previous findings reported from vertebrate studies, old parents produced both a higher number and larger offspring than young parents. However, their offspring had lower fitness components (by surviving less, producing a smaller number of clutches or not reproducing at all) than offspring born to young parents. Our findings strongly support the existence of trans-generational senescence in woodlice and contradict the belief that old individuals in indeterminate growers contribute the most to recruitment and correspond thereby to the key life stage for population dynamics. Our work also provides rare evidence that the trans-generational effect of senescence can be stronger than direct reproductive senescence in indeterminate growers.

## KEY WORDS

ageing, *Armadillidium vulgare*, clutch size, indeterminate growth, reproductive success

## 1 | INTRODUCTION

Deciphering the eco-evolutionary roots of inter-individual variation in reproductive success is a long-standing objective in evolutionary biology. Many overall (e.g. temperature, photoperiod) and biotic (e.g. social relationships, population density, predation and food availability) factors can modulate reproductive success in both vertebrates and invertebrates (e.g. Bertram, 2009; Descamps, Boutin, Berteaux, & Gaillard, 2008; Donelson, Munday, McCormick,

Pankhurst, & Pankhurst, 2010; Geister, Lorenz, Meyering-Vos, & Hoffmann, Klaus.H. & Fischer, K., 2008; Schwanz, 2008). Within a given population, individual attributes such as age and size are also associated with reproductive performance in most animals (Clutton-Brock, 1991). However, reproductive success, usually measured as the number of offspring produced at some predefined stage, (i.e. conception, birth, or independence of offspring) does not account for the entire process of reproduction. In an evolutionary context where the performance of offspring matters because it

shapes Darwinian fitness (at the individual level) and growth (at the population level), a trans-generational approach is required.

Among the factors that influence the fate of offspring, the role of parental age is currently attracting considerable attention (see Lemaître & Gaillard, 2017 for a review). Evidence of a decrease in reproductive performance at old age has accumulated in the last decades (Nussey, Froy, Lemaitre, Gaillard, & Austad, 2013), and empirical studies have reported evidence of reproductive senescence in a large range of reproductive traits including clutch size (Tabata & Teshiba, 2018), juvenile mass or size (Barks & Laird, 2016; Sharp & Clutton-Brock, 2010), offspring survival (Packer, Tatar, & Collins, 1998), offspring reproduction (Ducatez, Baguette, Stevens, Legrand, & Fréville, 2012) or offspring lifespan (Barks & Laird, 2016; Lansing, 1947). Interestingly, when Lansing (1947) published his pioneering study demonstrating a negative effect of parental age on offspring lifespan in rotifers, he made no explicit distinction between the maternal and paternal ages. However, most studies of this process (i.e. the so-called Lansing effect) have focused on maternal age (Lemaître & Gaillard, 2017) whereas old paternal age should also negatively influence offspring performance (Lemaître & Gaillard, 2017) as a result of decreasing sperm quality with increasing paternal age (Johnson & Gemmell, 2012). Studies looking at the effect of both maternal and paternal ages as well as their potential interactions are now strongly required (Dzyuba, 2006; Tidière et al., 2018).

So far, most studies of parental age effect focused on determinate growers (especially long-lived birds and mammals) (Fay, Barbraud, Delord, & Weimerskirch, 2016), which are supposed to show stronger senescence than indeterminate growers (Vaupel, Baudisch, Dölling, Roach, & D. & Gampe, J., 2004). In indeterminate growers the number of offspring produced per reproductive attempt is expected to increase with age, which should counter-select reproductive senescence in terms of fecundity (Jones et al., 2014; Vaupel et al., 2004). For example, in fish populations, older and so bigger individuals generally have a higher reproductive success than younger and smaller individuals (Venturelli, Shuter, & Murphy, 2009), which might be due to the production of high-quality eggs by old females (e.g. Vallin & Nissling, 2000 in the Atlantic cod, *Gadus morhua*). Age classes largely differ in size in indeterminate growers, which makes mating between individuals from distinct cohorts difficult, if not impossible. In such species, both selective pressure and physical constraints during mating can lead to a pattern of size- (and thus age-) assortative mating (Crespi, 1989). Thus, reproductive senescence can be exacerbated by the cumulative effects of both maternal and paternal ages (Lemaître & Gaillard, 2017). Although investigations of reproductive senescence are mandatory to refine our current understanding of the evolution of senescence (Jones & Vaupel, 2017), such studies are still lacking, especially in invertebrates. Here, we aim to fill this knowledge gap by investigating whether reproductive senescence occurs in an indeterminate grower, the common woodlouse *Armadillidium vulgare*, and whether advanced parental age negatively influences offspring fitness components.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

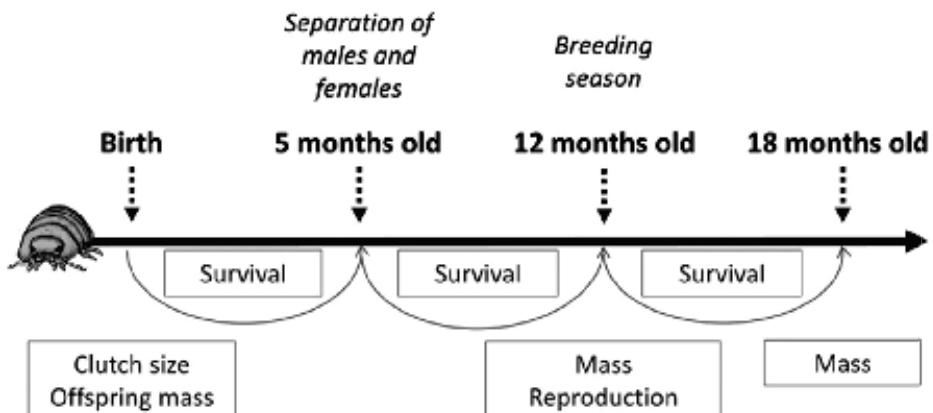
### 2.1 | Biological model

The common woodlouse is a terrestrial isopod that can live up to three years (Paris & Pitelka, 1962). This species exhibits indeterminate growth and as such large size differences across individuals can be observed. For instance, an old individual could be up to ten times larger than a newly mature individual (Brody, Edgar, & Lawlor, 1983). Therefore, physical constraints prevent young individuals to mate with old ones, leading to a pattern of assortative mating in both size and age at the population level (Lefebvre, Richard, Moreau, Rigaud, & Caubet, 2019). Female parental care is energetically costly in this species as females actively carry and protect their offspring in a marsupium for a month (Surbida & Wright, 2001). Offspring develop in this pouch and benefit from a protected environment and nutrients provided by their mother (Surbida & Wright, 2001). As the incubation of the offspring takes place in the marsupium, the size of the females is closely associated with the number of offspring produced (Dangerfield & Hassall, 1992; Durand, Loiseau, Prigot, Braquart-Varnier, & Beltran-Bech, 2018; Paris & Pitelka, 1962).

All individuals of *A. vulgare* used in our experiment came from a natural population collected in Denmark (Helsingør) in 1982. All the specimens were virgin at the beginning of the study and had been maintained on moistened compost and subjected to Poitiers natural photoperiod (86; 46°34'55"N; 0°20'10"E) at 20°C with food provided ad libitum (i.e. slices of fresh carrots and dried leaves of linden, *Tilia* sp). These conditions were repeated across all experiments.

### 2.2 | Differences of reproductive performance between young and old parents

We set up two groups of 40 breeding pairs comprising of one male and one female: one group was made up of old parents (36 months old) and another group was made up of young ones (12 months old). The mass of each individual was initially checked to control for variation within age groups. Young individuals weighed (mean  $\pm$  SD) 0.081 g  $\pm$  0.027 g and old ones 0.293 g  $\pm$  0.044 g. All 80 breeding pairs were weekly monitored throughout 7 months (i.e. during the entire reproductive season, from January to July) and when females were gravid, they were isolated and placed in boxes with wet paper towel. Only the first clutch produced was used because very few breeding pairs produced a second clutch. We computed the breeding rate according to age (the probability to produce a clutch) for each parental group (i.e. young parents and old parents). We recorded the number of offspring per clutch (hereafter called clutch size). The entire clutch was weighed and then divided by clutch size to obtain the mean offspring mass at birth. The experimental design is presented in Figure 1.

**FIGURE 1** Experimental design

### 2.3 | Inter-generational traits: offspring mass, survival and reproductive success

We monitored the offspring during the most critical period of their lives (0–18 months). Indeed, in the wild, only 11% of individuals are able to reach 2-year-old (Paris & Pitelka, 1962). To estimate survival, we counted offspring from the previous breeding pairs a first time at birth, a second time at 5 months of age, then at 12 months of age and finally at 18 months of age (Figure 1). The number of surviving offspring counted at each time allowed estimating offspring survival from 0 to 5 months of age, offspring survival from 5 to 12 months of age, offspring survival from 12 to 18 months of age and total offspring survival (i.e. from 0 to 18 months of age). Offspring were weighed as 12 ( $\pm 1$ ) months old and then as 18 ( $\pm 1$ ) months old to obtain the offspring mass at 12 months of age and the offspring mass at 18 months of age. To estimate reproductive success of offspring born from young or old parents, we set up, when they are sexually mature (i.e. 1-year-old, Paris & Pitelka, 1962), four combinations of 20 breeding pairs (avoiding brothers and sisters): (a) offspring from old parents together, (b) female offspring from old parents with male offspring from young parents, (c) females offspring from young parents with male offspring from old parents, and (d) offspring from young parents together. To avoid pseudo-replication issues (sensu Hurlbert, 1984), we analysed the reproductive status (i.e. reproduction success or failure) of the pair as function of the age group of the female's parents in interaction with the age group of the father's parents.

### 2.4 | Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the software R 3.6.0 (R Core Development Team 2019). For each model, we followed a model selection procedure to identify the minimal model, or the set of adequate models (Anderson & Burnham, 2002). Starting from the full model, we ranked all the nested models based on their AIC. Among the top-ranked models (delta AIC < 2), we only retained the most parsimonious ones: if one of these models was simply a more complex form of another one listed among the top rank models, for instance because it contained an additional parameter (variable or

interaction term), this parameter was ignored and the more complex model was not retained (Galipaud, Gillingham, David, & Dechaume-Moncharmont, 2014, Table S1). For the mean offspring mass at birth, at 12 months of age and at 18 months of age as for offspring survival at 5 months of age, between 5 and 12 months of age and at 18 months of age, we first tested for an effect of clutch size. When clutch size had a statistically significant effect (see Table S2), it was systematically included in the set of considered models (see Berger, Lemaître, Gaillard, & Cohas, 2015 for a similar approach).

Breeding rate as binary data has been modelled using a generalized linear model (GLM) with binomial distribution with parent's age ("young parents" versus "old parents") as a fixed factor. Clutch size was modelled using a linear model (LM) with normal distribution with parent's age as a fixed factor. The mean offspring mass at birth was modelled using a linear model (LM) with a normal distribution because only the average clutch mass was recorded (i.e. individual body mass within a clutch could not be measured at birth). Offspring mass at 12 months of age and offspring mass at 18 months of age were analysed with a linear mixed-effect models (LMM) with a normal distribution, using parent's age, offspring sex and their interaction as fixed factors and the breeding pairs identity as a random effect to take into account a potential genetic effect. The survival to 5 months of age was modelled with a generalized linear mixed-effect model (GLMM) with a binomial distribution, the parent's age and clutch size were the fixed factors, and the breeding pairs identity was the random effect. The offspring survival from 5 to 12 months of age, from 12 to 18 months of age and the overall survival (i.e. from 0 to 18 months of age) have been modelled as binary data using generalized linear mixed-effect models (GLMM) with a binomial distribution, parent's age and offspring sex and their interaction added to the clutch size were the fixed factors and the breeding pairs identity was used as the random effect. The breeding rate of offspring was modelled with binary data using a generalized linear model (GLM), with mother's age and father's age and their interaction as fixed factors.

Finally, reproductive senescence can be masked by the selective disappearance of low-quality individuals (Nussey, Coulson, Festa-Bianchet, & Gaillard, 2008). For a given age, larger females produce more offspring in the common woodlouse and body mass is thus generally thought to be a good indicator of individual

**TABLE 1** Selected models, their values and their statistical significance

Trait	Offspring age	Model	Best model selected	Variable	Parameter estimate $\pm$ SE	LR Chisq <sub>1</sub>	pValue
Breeding rate		Generalized Linear Model (Binomial)	Intercept	Intercept	-0.02 $\pm$ 0.22	0.01	.91
Offspring number	Birth	Generalized Linear Model (Normal)	Parent's age	Individual's age (old)	-0.76 $\pm$ 0.45	2.86	.09
Offspring mass	birth	Linear Model (Normal)	Parent's age	Parent's age (old)	88.67 $\pm$ 8.157	24.16	<.001
	12 months old	Linear Mixed-Effect Models (Normal)	Intercept	Parent's age (old)	45.15 $\pm$ 12.90	12.25	<.001
	18 months old	Linear Mixed-Effect Models (Normal)	Intercept	Parent's age (old)	2.34e-04 $\pm$ 1.20e-05	34.61	.001
Offspring survival	0-18 months old	Generalized Linear Mixed-Effect Models (Binomial)	Parent's age + (Clutch size)	Parent's age (old)	5.63e-05 $\pm$ 1.77e-05	12.62	<.001
	0-5 months old	Generalized Linear Mixed-Effect Models (Binomial)	Intercept + (Clutch size)	Parent's age (old)	0.04 $\pm$ 0.001	47.59	<.001
	5-12 months old	Generalized Linear Mixed-Effect Models (Binomial)	Parent's age + (Clutch size)	Parent's age (old)	-0.004 $\pm$ 0.003	1.94	.16
	12-18 months old	Generalized Linear Mixed-Effect Models (Binomial)	Parent's age + (Clutch size)	Intercept	0.06 $\pm$ 0.001	51.44	<.001
Offspring	12 months old	Generalized Linear Model (Binomial)	Mother's age + Father's age	Parent's age (old)	0.002 $\pm$ 0.004	0.11	.73
reproductive success			Intercept	Intercept	-	44.6	<.001
			Mother's age (old)	-	-	15.99	<.001
			Father's age (old)	-1.52 $\pm$ 0.82	5.06	.02	

Note In italic and grey, the nonselected models giving information on the effect of important variables.

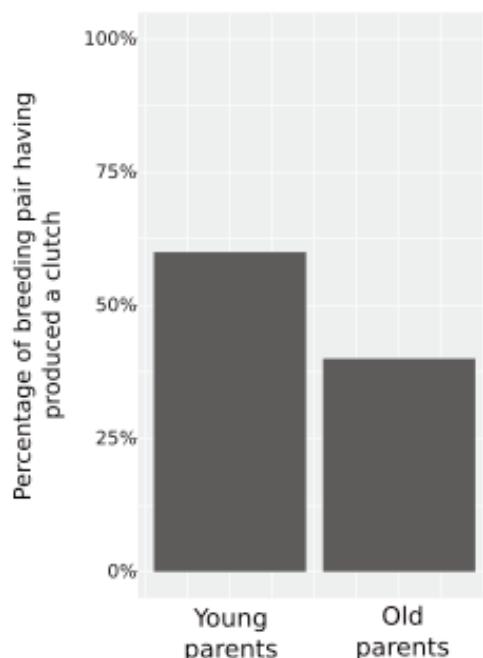
Significant p-value are indicated in bold.

quality (Durand et al., 2018). We tested for such relationships by modelling the breeding rate as binary data using a generalized linear model (GLM) with maternal mass set as a fixed factor within the young and old mothers separately. Then, in absence of repeated data on individuals over the life course, we tested for a putative influence of selective disappearance on our results by testing within the old parents group whether the first 50% of individuals that encounter premature death were lighter than the individuals that survived beyond the median life span. When doing this, the effect of mass on survival of the old individual group has been modelled as binary data using a generalized linear model (GLM) with binomial distribution with individual mass, sex and their interaction as fixed factors.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Differences of reproductive performance between young and old parents

Old parents (40 breeding pairs) produced 16 clutches, whereas young parents (40 breeding pairs) produced 24 clutches. No detectable difference was found concerning the breeding rate. The model with only the intercept was selected, but if we looked the nonselected model concerning the effect of age on the breeding rate, we found that the breeding rate tended to decrease with increasing parental age (estimate  $\pm$  SE =  $-0.76 \pm 0.45$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 2.86,  $p = .09$ ; Table 1; Figure 2). Moreover, old parents produced more and heavier offspring than young parents (estimate  $\pm$  SE =  $45.15 \pm 12.90$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 12.62,  $p < .001$ ; estimate  $\pm$  SE =  $5.63e-05 \pm 1.77e-05$  g, LR Chisq<sub>1</sub> = 12.62,  $p = .001$ , respectively; Table 1; Figure 3).



**FIGURE 2** Breeding rate according to individual's age

#### 3.2 | Offspring mass, survival and reproductive success

The offspring mass at 12 and 18 months did not differ between young and old parents (estimate  $\pm$  SE =  $0.004 \text{ g} \pm 0.003 \text{ g}$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 1.94,  $p = .16$ ; estimate  $\pm$  SE =  $0.002 \text{ g} \pm 0.004 \text{ g}$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 0.11,  $p = .73$  for 12 and 18 months, respectively; Table 1). The cumulative survival (from 0 to 18 months) was higher for offspring born from young parents than for offspring coming from old parents (estimate  $\pm$  SE =  $0.018 \pm 0.09$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 3.95,  $p = .04$ ; Table 1; Figure 4). More specifically, this difference did not occur for the offspring survival between birth and 5 months of age (estimate  $\pm$  SE =  $0.18 \pm 0.69$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 0.07,  $p = .79$ ; Table 1; Figure 4) but is present for the survival from 5 to 12 months (estimate  $\pm$  SE =  $-0.90 \pm 0.41$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 4.27,  $p = .04$ ; Table 1; Figure 4) and from 12 to 18 months (estimate  $\pm$  SE =  $-1.06 \pm 0.24$ , LR Chisq<sub>1</sub> = 8.22,  $p = .004$ ; Table 1; Figure 4). Reproductive success of offspring was higher for offspring born from young mothers and young fathers than for offspring born from old fathers or old mothers (0.25 versus 0 for young and old females, respectively, 0.20 versus 0.05 for young and old males, respectively; LR Chisq<sub>1</sub> = 15.99,  $p < .001$  and LR Chisq<sub>1</sub> = 5.06,  $p = .02$ ; Table 1; Figure 5).

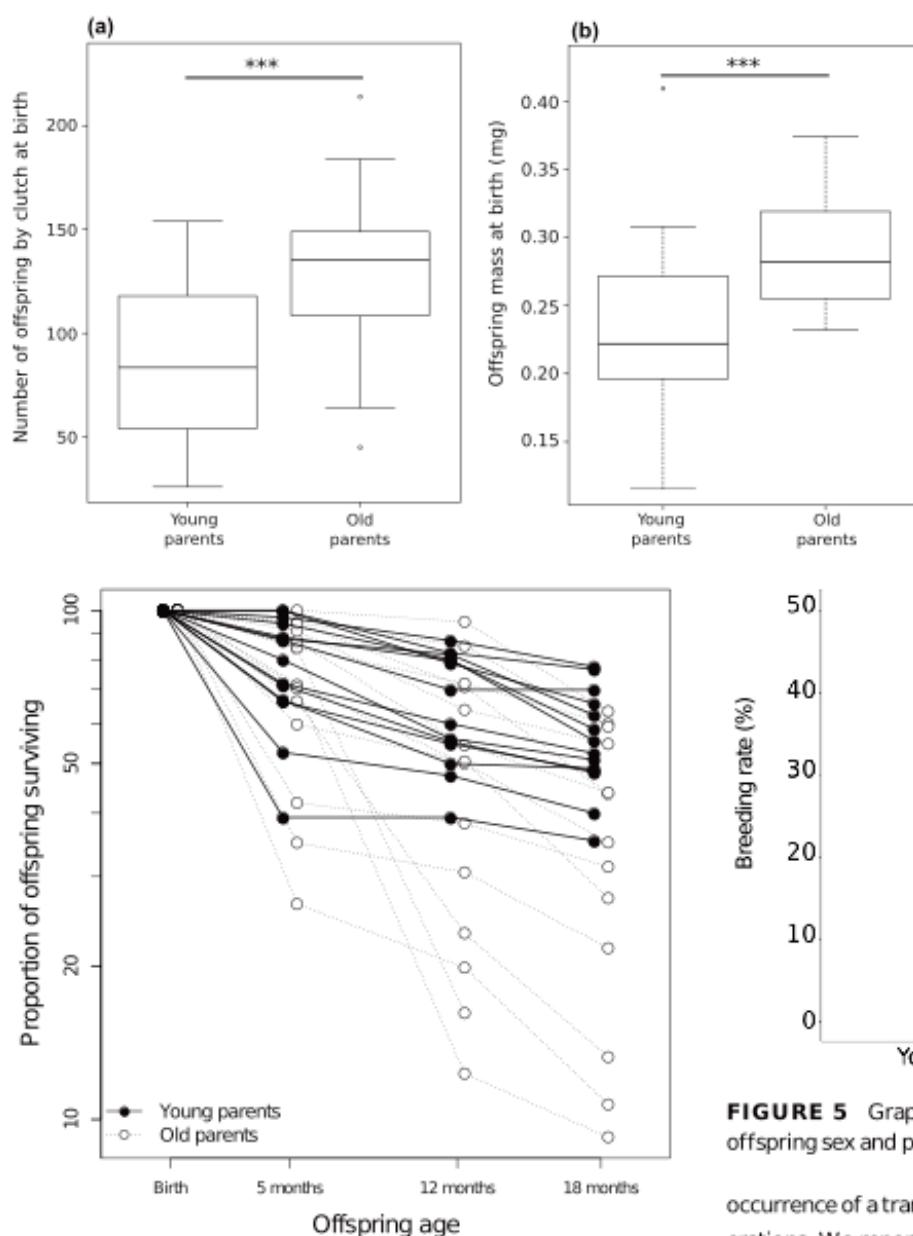
#### 3.3 | Selective disappearance

The maternal mass did not influence the breeding rate within both the young mothers ( $\chi^2 = 0.27$ , df = 1,  $p = .59$ ) and the old mothers ( $\chi^2 = 2.31$ , df = 1,  $p = .12$ ). We also did not find any link between body mass and survival in the 3-year-old group ( $\chi^2 = 1.66$ , df = 1,  $p = .20$ ) neither in males nor in females as expressed by the absence of statistically significant interaction between sex and body mass (estimate  $\pm$  SE =  $-17.19 \pm 11.44$ ,  $p = .13$ ).

### 4 | DISCUSSION

In indeterminate growers, reproductive success should increase with age, leading to an absence or a negligible reproductive senescence (Vaupel et al., 2004). At first glance, our results support this prediction as old parents produced clutches containing more offspring than young ones (Vaupel et al., 2004). However, old parents tended to produce a smaller number of clutches than young ones and we detected a trans-generational effect of reproductive senescence because parental age negatively influenced both survival and reproduction of offspring. As we had hardly obtained clutches from offspring of old individuals, we were unable to study the quality of the grandchildren.

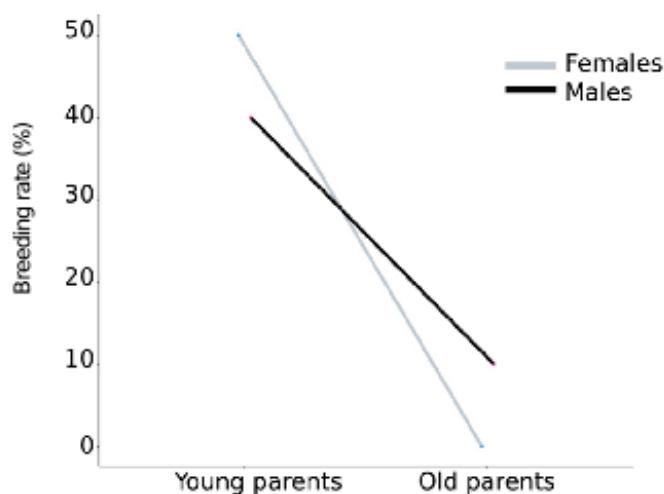
The effect of the environmental context experienced by the parents (e.g. diet, temperature, pathogen prevalence) on offspring performance has been described for a long time (Curley, Mashhoodi, & Champagne, 2011; Mousseau, 1998) but an increasing number of studies have revealed that parental age can also negatively impact



**FIGURE 4** Offspring survival according to their parent's age. Mean proportion of offspring surviving ( $\pm$  bootstrapped 95% confidence interval) at 5 months of age, 12 months of age and 18 months of age. Each data point corresponds to one clutch and was plotted as grey dots with a slight jitter added to distinguish adjacent points

offspring survival (Fox, Bush, & Wallin, 2003; Priest, Mackowiak, & Promislow, 2002) and reproduction (Bouwhuis, Charmantier, Verhulst, & Sheldon, 2010; Ducatez et al., 2012; Lippens, Faivre, Lechenault, & Sorci, 2017; Priest, Roach, & Galloway, 2008; Schroeder, Nakagawa, Rees, Mannarelli, & Burke, 2015). For instance, in Asian elephants (*Elephas maximus*), older mothers produce offspring with impaired survival (Reichert et al., 2019) and in the rotifers *Brachionus manjavacas*, maternal age negatively affects offspring survival and reproduction (e.g. egg quality) (Bock, Jarvis, Corey, Stone, & Gribble, 2019). These results are in line with ours as we found that the parent's age has a high impact on offspring survival and reproductive prospects. Moreover, we demonstrated the

**FIGURE 3** Number (A) and Mass (B) of offspring per clutch according to their parent's age. The thick line depicts the median, the box the interquartile range, and the whisker are bounded to the most extreme data point within 1.5 the interquartile range. The outliers outside this range are displayed as open circles. \*\* means  $p < .01$



occurrence of a trans-generational effect of parental age across generations. We reported that males from old parents reproduced less than males from young parents and this observed effect in males was stronger in females because females from old parents did not reproduce at all.

Several mechanisms could be involved in these trans-generational effects, including oxidative stress, telomere inheritance, epigenetics or parental care (Franklin & Mansuy, 2010; Njajou et al., 2007). Most studies of the physiological basis of senescence in invertebrates (notably in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*) have focused on oxidative stress due to its well-described effect on lifespan (Golden, Hinerfeld, & Melov, 2002). Parental care could also be impacted by age (Lemaître & Gaillard, 2017) notably because the ability of acquiring and storing body reserves often decreases with increasing age, at least in vertebrates (Lecomte et al., 2010; Skoglund, 1988). Parental care effects are also well documented in invertebrates, in particular in insects (Wong, Meunier, & Kölliker, 2013) but the few studies investigating the effect of age on parental care in invertebrates have provided mixed results (Ivimey-Cook & Moorad, 2018). In some

organisms such as viviparous terrestrial isopods, the maintenance of the reproductive system can be very energetically expensive (Lardies, Cotoras, & Bozinovic, 2004). In the woodlice, females provide nutrients to offspring during the incubation in the marsupium by a fluid called marsupial fluid (Surbida & Wright, 2001). Thus, both the quality and the quantity of nutrients provided by females in marsupium fluid could determine offspring quality and thereby their viability. Studies investigating how the marsupial fluid properties change with mother's age in the woodlouse and whether such changes might account for the decrease in reproductive success we reported in old individuals are strongly required. Overall, our knowledge on age-specific allocation to maternal and paternal care is still in its infancy in invertebrates, but we can hypothesize that a decrease in maternal care associated to increased oxidative stress and some epigenetic factors (Curley et al., 2011; Guillaumet-Adkins et al., 2017) could contribute to the trans-generational effect observed in woodlouse.

One of the grey areas of these results is the source of this trans-generational effect. Although many studies have focused on the maternal effect, the paternal effect and the interaction between both effects remain relatively unknown. Among the rare studies that have investigated the influence of both maternal and paternal age, Bouwhuis, Vedder, and Becker (2015) showed that the trans-generational effects are sex-specific in the common tern, *Sterna hirundo*. In this species, daughters from old mothers had a lower reproductive success than daughters from young mothers and sons from old fathers had a shorter lifespan than sons from young fathers. In the invertebrate *Drosophila melanogaster*, the effect of parent's age in offspring reproduction differs between sexes: sons were insensitive to maternal age but had reduced reproductive abilities with paternal age when daughters from old mothers showed a decrease in reproductive success (Mossman, Mabeza, Blake, Mehta, & Rand, 2019). Offspring produced by both old mothers and fathers show a substantial modification in reproductive behaviour with an extreme egg dumping (Mossman et al., 2019). Overall, both advanced maternal and paternal ages could have a negative impact on offspring lifetime reproductive success, which can be exacerbated by the strong positive age assortative mating that occurs in *A. vulgare*. In our experiment, it was not possible to tease apart the relative contribution of mother and father ages, notably because trials of mating between cross-aged individuals (e.g. 1-year-old individuals\*3-year-old individuals) were unsuccessful. Future experiments would need to investigate the effect of age directly on male or female reproductive traits (e.g. sperm, oocytes), which could play a key role in shaping reproductive senescence patterns (Fricke & Koppik, 2019; Monaghan & Metcalfe, 2019). Finally, it is important to notice that the survival of older individuals does not seem to be linked to their mass in our experiment, which suggests that the possible selective disappearance of the lightest individuals (in a given age-class) does not impact our results.

Everything else being equal, individuals reaching 3 years of age likely achieve a higher fitness than short-lived individuals, thanks

to the much larger number of eggs produced throughout lifetime. However, old individuals suffer from a strong reproductive senescence in terms of offspring quality and why selection did not select for old individuals allocating to offspring quality rather than to offspring quantity can be seen as paradoxical at the light of some recent developments in evolutionary biology of ageing, which suggest that reproductive senescence should be absent in indeterminate growing species (Vaupel et al., 2004). However, these results can largely be explained by classic evolutionary theories of ageing: (a) although we do not know how the environmentally driven mortality influence these patterns, the proportion of individuals reaching 3 years of age in nature (<1%) is far too weak to enable the evolution a new reproductive tactic (Medawar, 1952), and (b) the selection for the production of a large quantity of offspring might come at a cost in late life in terms of offspring quality (Williams, 1957). In the particular case of the woodlouse, these results run counter to studies carried out so far, which have viewed oldest individuals as playing a key role in population dynamics through their ability to produce many offspring (Dangerfield & Hassall, 1992; Paris & Pitelka, 1962). However, our study does not provide information on the consequences of reproductive senescence in terms of population dynamics in the wild. Although three-year-old individuals are quite rare (<1% of a given cohort are reaching 3 years of age) to be expected to play any detectable role in population dynamics, two-year-old individuals are more common in the wild (i.e. 13% of individuals within a given cohort reach this age) and reproductive senescence in terms of decreased offspring viability we demonstrated in our study might negatively influence population recruitment (Paris & Pitelka, 1962). To better understand the influence of reproductive senescence from a quantitative viewpoint, data on age-specific reproductive success in the wild will be required. Our findings demonstrate that indeterminate growers are likely to show reproductive senescence but on traits that may be different than determinate growers.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French ministry of Education, the 2015–2020 State-Region Planning Contract and European Regional Development Fund and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers and by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE32-0002-01). We would like to thank Sylvaine Durand, Cybèle Prigot, Ophélie Trainson, Clémentine Préau and Marius Bredon for our constructive exchanges about that work as well as Alexandra Lafitte for technical assistance. We would also like to thank Richard Cordaux and Xavier Bonnet for their insightful comments. We wish to thank the anonymous reviewers for their constructive comments as well as the editor for his review of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

## ORCID

Charlotte Depeux  <https://orcid.org/0000-0001-7295-6763>

- Mossman, J. A., Malbeza, R. M. S., Blake, E., Mehta, N., & Rand, D. M. (2019). Age of both parents influences reproduction and egg dumping behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Heredity*, 110, 300–309. <https://doi.org/10.1093/jhered/esz009>
- Mousseau, T. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01472-4)
- Njajou, O. T., Cawthon, R. M., Damcott, C. M., Wu, S.-H., Ott, S., Garant, M. J., ... Hsueh, W.-C. (2007). Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 12135–12139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702703104>
- Nussey, D. H., Coulson, T., Festa-Bianchet, M., & Gaillard, J.-M. (2008). Measuring senescence in wild animal populations: Towards a longitudinal approach. *Functional Ecology*, 22, 393–406. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01408.x>
- Nussey, D. H., Froy, H., Lemaître, J.-F., Gaillard, J.-M., & Austad, S. N. (2013). Senescence in natural populations of animals: Widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing Research Reviews*, 12, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.07.004>
- Packer, C., Tatar, M., & Collins, A. (1998). Reproductive cessation in female mammals. *Nature*, 392, 807–811. <https://doi.org/10.1038/33910>
- Paris, O. H., & Pitelka, F. A. (1962). Population characteristics of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology*, 43, 229–248. <https://doi.org/10.2307/1931979>
- Priest, N. K., Mackowiak, B., & Promislow, D. E. L. (2002). The role of parental age effects on the evolution of aging. *Evolution*, 56, 927–935. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb01405.x>
- Priest, N. K., Roach, D. A., & Galloway, L. F. (2008). Cross-generational fitness benefits of mating and male seminal fluid. *Biology Letters*, 4, 6–8. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0473>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Reichert, S., Berger, V., Jackson, J., Chapman, S. N., Htut, W., Mar, K. U., & Lummaa, V. (2019). Maternal age at birth shapes offspring life history trajectory across generations in long lived Asian elephants. *Journal of Animal Ecology*, 89, 996–1007. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13049>
- Schroeder, J., Nakagawa, S., Rees, M., Mannarelli, M.-E., & Burke, T. (2015). Reduced fitness in progeny from old parents in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 4021–4025. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422715112>
- Schwarz, L. E. (2008). Chronic parasitic infection alters reproductive output in deer mice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62, 1351–1358. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0563-y>
- Sharp, S. P., & Clutton-Brock, T. H. (2010). Reproductive senescence in a cooperatively breeding mammal. *Journal of Animal Ecology*, 79, 176–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2009.01616.x>
- Skoglund, T. (1988). Tooth wear by food limitation and its life history consequences in wild reindeer. *Oikos*, 51, 238. <https://doi.org/10.2307/3565648>
- Surbida, K., & Wright, J. C. (2001). Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). *Physiological and Biochemical Zoology*, 74, 894–906.
- Tabata, J., & Teshiba, M. (2018). Sexual attractiveness and reproductive performance in ageing females of a coccoid insect. *Biology Letters*, 14, 20180262. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0262>
- Tidière, M., Thevenot, X., Deligiannopoulou, A., Douay, G., Whipple, M., Siberchicot, A., ... Lemaître, J.-F. (2018). Maternal reproductive senescence shapes the fitness consequences of the parental age difference in ruffed lemurs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285, 20181479. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.1479>
- Vallin, L., & Nissling, A. (2000). Maternal effects on egg size and egg buoyancy of Baltic cod, *Gadus morhua*. *Fisheries Research*, 49, 21–37.
- Vaupel, J., Baudisch, A., Dölling, M., Roach, A. D., & Gampe, J. (2004). The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology*, 65, 339–351. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2003.12.003>
- Venturelli, P. A., Shuter, B. J., & Murphy, C. A. (2009). Evidence for harvest-induced maternal influences on the reproductive rates of fish populations. *Proceedings of the Royal Society B*, 276, 919–924. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1507>
- Williams, G. C. (1957). Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution*, 11, 398–411.
- Wong, J. W. Y., Meunier, J., & Kölliker, M. (2013). The evolution of parental care in insects: The roles of ecology, life history and the social environment: The evolution of parental care in insects. *Ecological Entomology*, 38, 123–137.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Depeux C, Lemaître J-F, Moreau J, et al. Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *J Evol Biol*. 2020;00:1–9. <https://doi.org/10.1111/jeb.13667>

### III. Age des mâles et compétition spermatique : article scientifique en préparation « Fertilization challenge: effect of age on sperm competition in the common woodlouse »

#### III.1. Introduction

Chez le cloporte, nous avons un rapport clair entre le nombre de descendants et la taille de la femelle (Dangerfield and Hassall 1992 ; Lefebvre et al. 2019 ; Depeux et al. 2020). Cependant, nous avons encore peu d'informations concernant l'effet de la taille des mâles sur leur succès reproducteur. En effet, bien que notre étude portant sur la sénescence reproductive (partie Chapitre II, partie II) mette en évidence un effet de l'âge des parents (mâles et femelles) sur la qualité de leurs descendants, nous n'avons pas pu faire dans cette étude la distinction entre l'effet de l'âge du mâle et l'effet de l'âge de la femelle.

La femelle a la possibilité de stocker le sperme des mâles au sein de sa spermathèque et de l'utiliser pendant plusieurs saisons de reproduction (Suzuki and Ziegler 2005 ; Durand et al. 2019), ce qui peut avoir une forte influence sur la sélection sexuelle notamment en permettant à la fois (et de façon non exclusive) (1) aux femelles de « choisir » le sperme des mâles les plus « performants » soit par des mécanismes précopulatoires (évitement d'accouplement, préférences de partenaire...), soit post copulatoires (choix du sperme pour la fécondation de œufs...) et (2) aux mâles les plus « performants » d'inséminer plus de femelles. Ainsi, s'il y a sénescence reproductive chez les mâles *A. vulgare*, des paramètres comme la capacité basale de synthèse de spermatozoïdes, la capacité d'insémination, l'épuisement spermatique et éventuellement la capacité de renouvellement spermatique (le tout sous le terme générique d'allocation spermatique) devraient différer entre des mâles jeunes et des mâles vieux.

#### III.2. Présentation de l'étude

Afin de tester l'impact de l'âge sur l'allocation spermatique (de façon générique) des mâles, nous présentons à 15 mâles de 1 an et 15 mâles de 2 ans, 12 femelles réceptives à

la reproduction en 4 jours, à raison de 3 femelles différentes chaque nuit. Après avoir passé la nuit avec le mâle, ces 3 femelles sont disséquées afin de vérifier si leurs oviductes ont été inséminés. S'ils sont inséminés, nous prélevons les spermatozoïdes présents dans la spermathèque afin de les compter sous microscope électronique (Box technique 1) et les comparer entre jeunes et vieux mâles. Nous comptons et comparons aussi entre jeunes et vieux mâles le nombre de « bundles » de spermatozoïdes présents (1) chez des mâles vierges de même âge afin d'estimer et comparer selon l'âge les capacités basales de synthèse de spermatozoïdes et (2) à la fin de l'expérience sur les mâles ayant rencontré les 12 femelles pour estimer l'épuisement spermatique des mâles et leur éventuelle capacité de renouvellement spermatique en fonction de leur âge.

Bien que les vieux mâles aient, avant reproduction, plus de spermatozoïdes dans leurs gonades, ils fécondent moins de femelles sur 4 jours et utilisent donc moins de spermatozoïdes que les jeunes mâles. De plus, les vieux mâles présentent dans leurs gonades, à la fin de l'expérience d'épuisement spermatique, un nombre plus important de spermatozoïdes que les jeunes mâles ce qui montre un investissement moindre dans l'insémination des femelles et/ou un renouvellement spermatique inefficace. Par cette étude, nous mettons donc en évidence un effet important de l'âge sur l'allocation spermatique qui peut être assimilé à une sénescence reproductive chez les mâles *A. vulgare*.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu co-encadrer Simon Roy, étudiant en première année de Master BEE à l'Université de Poitiers. Son stage, d'une durée de 2 mois, a été réalisé en 2018. Il consistait en la co-réalisation de l'expérience d'épuisements des mâles

### Box technique 1: Dénombrement de « bundles » et spermatozoïdes

#### Prélèvement des spermatozoïdes

##### > Dans les gonades mâles, sous forme de « bundles »

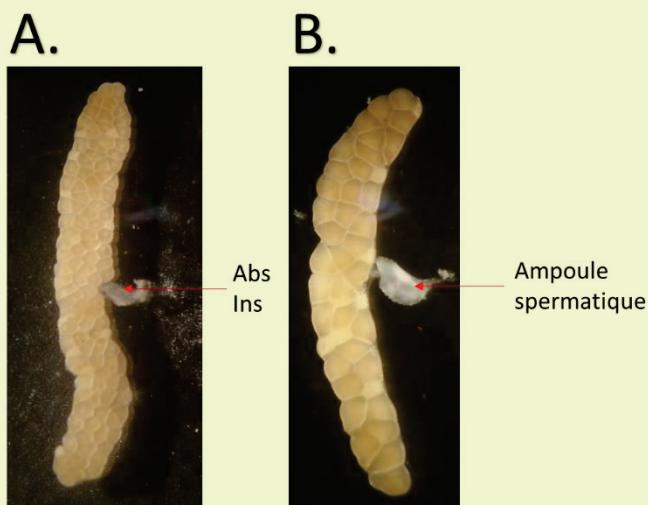
Afin de visualiser ou compter les bundles contenus dans les gonades mâles, les gonades sont prélevées (II.3.) et déposées dans du Ringer. Les utricules, siège de la spermatogénèse, sont retirés. Le canal déférent et la vésicule séminale sont séparés et déposés chacun dans 15mL de Ringer (un verre de montre est utilisé afin de permettre une homogénéisation de la solution).

### > Au sein d'un oviducte fécondé

Lorsque la femelle vient juste d'être inséminée, les spermatozoïdes sont présents dans le tractus génital (oviducte) sous forme d'une boule/anneau blanchâtre ([Figure 29](#)). Pour prélever ces spermatozoïdes, il faut tout d'abord prélever l'oviducte et le déposer dans 15mL de Ringer. Ensuite, il faut briser l'oviducte pour laisser les spermatozoïdes se déverser dans le Ringer. Tous les morceaux de tissus de l'oviducte doivent être retirés. La solution doit être minutieusement homogénéisée.

### Comptage des spermatozoïdes

Afin de compter le nombre de spermatozoïdes contenus dans un oviducte fécondé ou le nombre de bundle dans la vésicule séminale et le canal déférent d'un mâle, il est nécessaire de prélever les bundles ou spermatozoïdes comme présenté précédemment. Ensuite, 3 gouttes de 10 $\mu$ L de la solution diluée dans le Ringer sont déposées sur une lame de microscopie. La lame est déposée sur une plaque chauffante afin de permettre l'évaporation de l'eau et est fixée par dépôt d'éthanol 100% (qui permet la fixation des cellules). Les lames alors séchées sont recouvertes d'une solution de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) à 50  $\mu$ g/mL et placées à l'obscurité pendant 15 minutes. Le dénombrement s'effectue sous microscope inversé à épifluorescence (Axio observer ZEISS, filtre DAPI) en comptant sur chaque lame les spermatozoïdes/bundles dans chacune des 3 gouttes.



[Figure 29 : Ovaies et oviductes d'une femelle non inséminée \(A\) et d'une femelle inséminée \(B\).](#)

Abs ins : absence insémination

III.3. Article scientifique en préparation

## Fertilization challenge: effect of age on sperm allocation in the common woodlouse

Charlotte DEPEUX<sup>\* 1, 2</sup>, Simon ROY<sup>\*1</sup>, Jérôme MOREAU<sup>3</sup>, Jean-François LEMAÎTRE<sup>2</sup>, François-Xavier DECHAUME-MONCHARMONT<sup>4</sup>, Tiffany LAVERRE<sup>1</sup>, Hélène PAUHLAC<sup>1</sup>, Jean-Michel GAILLARD<sup>2</sup>, Sophie BELTRAN-BECH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des interactions EBI, UMR CNRS 7267, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

<sup>2</sup> Université Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR CNRS 558, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

<sup>3</sup> Université de Bourgogne, Laboratoire Biogéosciences, UMR CNRS 6282, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

<sup>4</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, LEHNA, UMR 5023, 6 rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex, France

\* Co-first author

Corresponding author: charlotte.depeux@gmail.com

### Abstract

To access reproduction, males have to be competitive during the two step of reproductive competition : (1) the precopulatory selection, characterized by the ability for males to mate with females, and (2) the post-copulatory selection, characterized by the ability for male's ejaculate to fertilized female's gonad. The effect of age in post-copulatory selection is well documented as gametes quality generally decreases with age. In the way to win the reproductive competition, males could have to adjust their mating strategies. In some species, as indeterminate grower, the quantity of sperm increases with age, given the possibility to multiply partners, and in case of strong post-copulatory selection, to maximise their fitness. From an experimental design, we

assessed whether males of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*, an indeterminate grower, displayed reproductive senescence. After estimating the basal sperm count in 1- and 2-year-old males, we presented these males with three females successively for 4 days and counted the number of inseminated females and the quantity of spermatozoa distributed by males each day. The sperm potential of the 2-year-old males was greater than that of the 1-year-olds males. Despite the higher potential in terms of sperm quantity for old males, they fertilized less females than young males. Our work showed that old males were less competitive than young ones in sperm competition, evidence of reproductive senescence in males of this indeterminate grower species.

## Key words

*Armadillidium vulgare*, sperm competition, sperm depletion, ageing, reproductive senescence

## Introduction

In promiscuous species, females and males mate with different partners. The sperm competition is all the stronger as the females will have access to several males. To guarantee their reproductive success, males must be competitive. Ageing could be the evidence of a good genetic heritage, and could be really attractive for females (Brooks 2001). Thus, in some case old males are more competitors for mates, and more chosen by females (Jones and Elgar 2004; Girndt et al. 2018). Moreover, senescence theories predict a decrease in reproductive success with age, called “the reproductive senescence” (Lemaître and Gaillard 2017). The sexual selection can be played at two unexclusive levels: the pre- and post-copulatory sexual selection levels. The pre-copulatory sexual selection is the male ability to mate with females, the post-copulatory selection is the ability to fertilized oviducts. Thus, the post-copulatory sexual selection could occur after the mating between the sperm of different males in female’s tract, this phenomenon is called cryptic competition. Many studies have reported the effect of age in

the sperm competitiveness or ability to fertilized females (Carazo et al. 2011; McDonald et al. 2017). In addition, age could have indirect effect on reproductive success: in fact, the deterioration of gametes could lead the production of offspring of lower quality (Radwan 2003; Johnson and Gemmell 2012; Preston et al. 2015).

Most recent studies have mainly focused on the effect of age on post-copulatory sexual selection, in particular concerning the "ejaculate quality" characterized by the number of spermatozoa and their quality (velocity, viability but also motility) (Pizzari et al. 2008). These traits are predominant for the reproductive success (Wedell et al. 2002; Fitzpatrick and Lüpold 2014). The number of sperm in ageing individuals depends on species with in some species, as in humans, a number of sperm which decreases with age (Sasson et al. 2012; Johnson et al. 2018), and, at the reverse, in other species, notably in some indeterminate growers as the guppy, a number of sperm which increases with age (Gasparini et al. 2010). The velocity could also decrease , for example or in the guppy (*Poecilia reticulata*) or in the Eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) (Gasparini et al. 2010; Vega-Trejo et al. 2019) or at contrary increase with age as in bluegill (*Lepomis macrochirus*) (Burness et al. 2004).

The pre-copulatory traits are less studied. Moreover, in case of a decrease in male competitiveness in post-copulatory traits, reproductive strategies could be employed in the pre-copulatory step to maximise reproductive success. We know that male are able to adjust their allocation strategy in conditions of strong competition (Bretman et al. 2011). For example, in guppies the quality of offspring increases with age when the number of mating decreases (Johnson et al. 2018). In indeterminate grower, the quantity of sperm increases with age (Gasparini et al. 2010) and could compensate the decrease in sperm quality by increase the number of matings or transferred sperm during insemination (Kelly and Jennions 2011). Thus, the sperm allocation could be the result of trade off as the reproductive effort that is characterized by age but also, and importantly, by "mating history" (Lemaître et al. 2015). It is therefore sometimes difficult to understand what the real effect of age is on the allocation of

males to reproduction (Vega-Trejo et al. 2019). To better understand this phenomenon, it seems necessary to develop experimental approaches to better measure the effect of age on male reproduction allocation.

In the way to develop our knowledge on the effect of age on male reproduction allocation, we realized an innovative experiment on a promiscuous species: the common woodlouse *Armadillidium vulgare*. Our experimental approach consisted to propose a series of females to virgin males of different ages (1 and 2 years old) and to evaluate, on the one hand, by kinetics, and on the other hand, by the total number of fertilized females and spermatozoa distributed, the effect of age on the allocation of males to reproduction. As the common woodlouse is an indeterminate grower, we expected that old males have, in their gonads, more sperm, and therefore allocate more than young males in reproduction.

## **Material and Methods**

### **1. Biological model**

All individuals of *A. vulgare* (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) we studied came from a natural population collected in Denmark (Helsingör) in 1982. Individuals were maintained in constant laboratory conditions, on moistened soil, at 20 °C and at natural photoperiod of Poitiers (46°35'N; 0°20'E). Food consisted of dead leaves and slices of fresh carrots provided *ad libitum*. To ensure virginity, males and females from the same brood were sorted and separated per sex before they reached sexual maturity. Thus, all individuals we monitored were virgin at the beginning of experiments.

#### **a. Reproductive physiology of *A. vulgare***

In the terrestrial isopod *A. vulgare*, the reproduction is triggered by an increase in day length and temperature, thus ensuring favourable conditions for the offspring (Souty-Grosset et al. 1988). In this promiscuous species (Durand et al. 2020) individuals start to reproduce when they are one-year-old (Paris and Pitelka 1962), females enter into parturial moulting, for which they

accumulate calcium plates in their sternites with particular shape described by Moreau and Rigaud (2002). Males are then able to fertilize females: they introduce their two copulating styli in turn into the two genital openings of a female, located on either side of the 5th sternite (Suzuki 2001; Suzuki and Ziegler 2005), where they deposit the sperm. Thus immediately after reproduction, the sperm is observable in the freshly inseminated oviducts (Moreau et al. 2002). A few hours after mating, the sperm is stored in a ring-shaped seminal receptacle located at the junction of the female's oviduct and the ovary: the spermatheca (Suzuki and Ziegler 2005). When the eggs are mature, they migrate through the spermatheca and can thus be fertilized by the stored sperm, then they migrate into the incubator pouch (the marsupium) where they develop for a month (Suzuki and Ziegler 2005).

The male genital tract consists in three pairs of utricles linked to a pair of seminal vesicles extending into a pair of vas deferens (Katakura, 1959). Vas deferens terminate and converge in the two copulating styli used by the male for reproduction (Wilson, 1991). Spermatogenesis and the formation of "bundles" containing between 15 and 30 spermatozoa (Itaya, 1979) both take place within the utricles (Nichols, 1909). Male's gametes are packed and stored in the seminal vesicle before being redirected to the vas deferens. In the female genital tract, after fertilization, the bundles are broken and spermatozoa can be observed at the individual level. Thus, in the following experiments we observed the spermatozoa on bundles in the male genital tract and on the individual form in the female genital tract.

## 2. Experimental design

During this experiment, we measured the effect of age on the insemination success of males. In this way, we elaborated a sperm depletion experiment (presented below). We have divided our approach into 4 steps. Step 1: The first step consisted of measuring **the sperm stock**, characterized by the quantity of sperm present in the gonads of virgin males aged 1 and 2 years (*Figure 30*). Step 2: Then, we proposed to 1-year-old virgin males and 2-year-old virgin males, 12

receptive virgin females each for 4 days at a rate of 3 females per day. Thus, we were able to evaluate if the **kinetics of insemination** depended on age by measuring the number of inseminated females and the quantity of sperm allocated per day (*Figure 30*). Step 3 : At the end of the experiment, in a third stage, **the insemination success** was estimated by the total number of females inseminated during the four days, as well as the total quantity of spermatozoa allocated during the experiment (*Figure 30*). Step 4: Finally, in a fourth stage we studied the **quantity of sperm remaining** in the males used in the sperm depletion experiment (*Figure 30*).

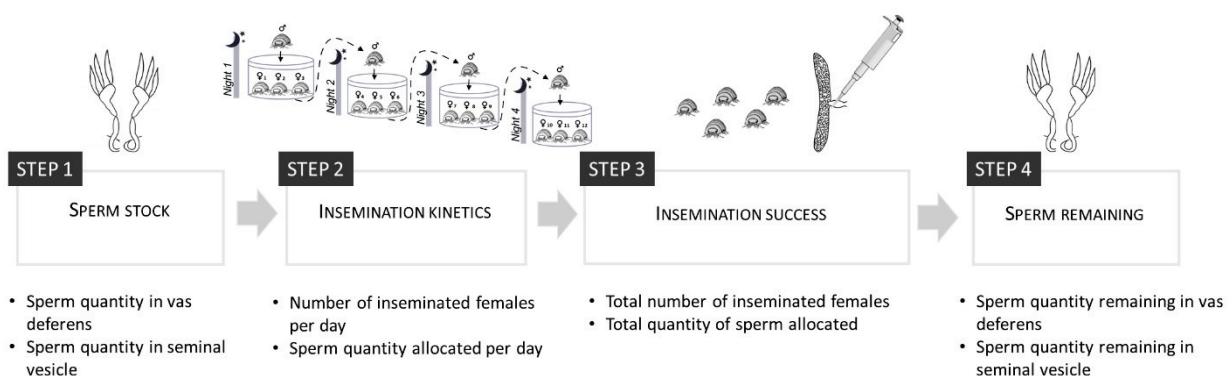


Figure 30: Experimental design

The figure represents the four steps of our study focusing in the insemination success of the males of *Armadillidium vulgare* according to age. Thus, each step was conducted in a group of young males (1-year-old) and in a group of old males (2-years-old).

a. Step 1: Sperm stock in virgin males

To estimate the sperm stock in virgin males according to age, we counted bundle of sperm in gonads of 15 1-year-old ( $\pm 2$  months) and 15 2-years-old ( $\pm 2$  months) males. We dissected males in Ringer solution (Sodium Chloride 394 mM, Potassium Chloride 2 mM, Calcium Chloride 2 mM, Sodium Bicarbonate 2 mM), and we collected the entire gonads (i.e. testis, seminal vesicle and vas deferens). We isolated seminal vesicle and vas deferens in two distinct receptacles containing 15mL of Ringer solution. Organs were crushed and homogenized in the Ringer

solution. Three drops of 10 $\mu$ L of the sperm were then deposited on a microscope slide, dried on a hot plate and fixed with 100% ethanol. They were then coloured using DAPI solution (concentration of 50 $\mu$ g.mL $^{-1}$ ) (adapted from Moreau *et al.*, 2001). The sperm quantity was estimated under epifluorescence on a ZEISS Axio observer microscope by counting 3 drops for one sample and by means of the number of bundles contained in the 3 drops.

b. Step 2: Insemination kinetics

To study if the male insemination kinetics depends on age, we elaborated a “sperm depletion” experiment presented in (*Figure 31*) and was adapted from Moreau et al. (2002)'s protocol. We elaborated 2 groups of males : 15 males of 1-year-old ( $\pm 2$  months) and 15 males of 2-years-old ( $\pm 2$  months). Females were 1-year-old ( $\pm 2$  months) and had approximately the same body mass (0.15 $\pm$ 0.5g, N=360). We proposed genetically unrelated females to males to avoid inbreeding avoidance or kin selection mechanisms (Durand *et al.* 2017a; Fortin *et al.* 2018). For this experiment, receptive females were selected and weighted just before being used (Moreau and Rigaud 2002)

The experimental design illustrated in Figure 1. Each male was placed individually in cylindrical boxes (diameter of 8 cm) with towel paper soaked with water and a piece of dead leaf, at 20 °C for 12 h. We selected only receptive females by checking their sternites and only taking ones with particular shape calcium plates illustrating the entrance in parturial moult and ensuring their receptivity to males (Moreau and Rigaud 2002). In each box, three receptive females were proposed to each male from 7:00 p.m. to 8:00 a.m., removed at 8:00 a.m. and replaced with three new females at 7:00 p.m. until 8:00 a.m. the next day. This protocol of proposing 3 females to each male was carried out during 4 days. Each new day, directly after the removal of the females, the males were dissected immediately to count the sperm in female oviducts and avoid sperm storage in the spermatheca. We dissected females in Ringer solution (Sodium Chloride 394 mM, Potassium Chloride 2 mM, Calcium Chloride 2 mM, Sodium Bicarbonate 2 mM) and

checked whether insemination had occurred in the two oviducts. We thus obtained **the number of inseminated females per day**. We collected the inseminated oviducts in 15mL of Ringer solution to get the sperm. We removed the tissue containing the sperm and we broke and homogenized the sperm. Three drops of 10 $\mu$ L of the collected sperm in Ringer solution were deposited on a microscope slide, dried on a hot plate and fixed with 100% ethanol. They were then coloured using DAPI solution (concentration of 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) (adapted from Moreau *et al.*, 2001). Number of spermatozoa was estimated under epifluorescence on a ZEISS Axio observer microscope by counting 3 drops for one sample and by means of the number of spermatozoa contained in the 3 drops. We then quantified the **sperm quantity allocated by day**.

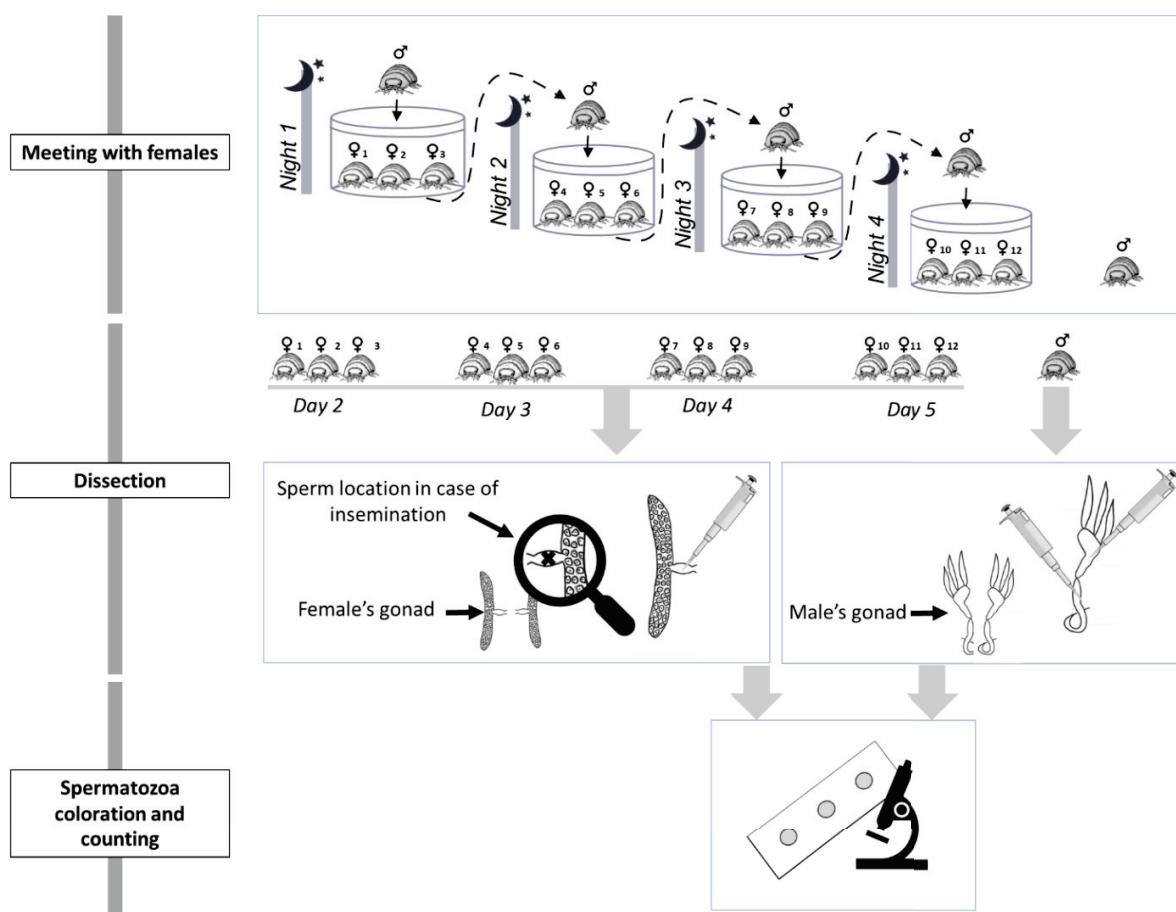


Figure 31: General sperm depletion experimental design

The protocol consisted in proposing to each male of 1 year old ( $N=15$ ) or 2 year old ( $N=15$ ) 12 receptive females at a rate of 3 females per evening for 4 days. At the end of the night spent with the males, the

females were dissected to observe whether fertilisation occurred and, if it did, to collect sperm for counting. At the end of the 4 days, the male was also dissected to count the quantity of sperm remaining in gonads.

c. *Step 3: Insemination success*

In this step, we totalled the **number of inseminated females** and the **quantity of sperm allocated** for reproduction for each male in order to test the effect of age on the success of "raw" insemination at the end of the 4 days of experiment.

d. *Step 4: Remaining sperm*

At the end of the experiment, and to estimate the **quantity of remaining sperm** in males, we dissected them in Ringer solution (Sodium Chloride 394 mM, Potassium Chloride 2 mM, Calcium Chloride 2 mM, Sodium Bicarbonate 2 mM) (Figure 1). The entire gonads (i.e. testis, seminal vesicle and vas deferens) were collected and we isolated seminal vesicle and vas deferens in two distinct receptacles containing 15mL of Ringer solution. We followed the same protocol as presented in the Step 1.

## 2. Statistics

All statistical analyses were performed using the software R 3.6.0 (R Core Development Team 2019). Plots were realized using the package ggplot2 (Wickham 2011).

As the size and mass positively covary with individual quality in woodlice (Durand et al. 2018), we first checked for the potential confounding effect of individual's mass on insemination success in both sexes by fitting GLM with binomial distributions. Females' mass did not affect the inseminating success (i.e. probability for an oviduct to be inseminated) of either young (LR Chisq<sub>1</sub>=2.38, P=0.12) or old LR Chisq<sub>1</sub>=0.48, P=0.48) males. Likewise, the mass of males did not

influence their inseminating success at any age (young males: LR Chisq<sub>1</sub>=1.25, P=0.26; old males: LR Chisq<sub>1</sub>=2.10, P=0.15). We thus did not include body mass in the subsequent models.

### Sperm stock in virgin males

In order to test the effect of age on the quantity of sperm in virgin males, we carried out a linear model with age as a fixed factor.

### Insemination kinetics

#### *Inseminated females*

To test fertilization kinetics, we first considered the number of females inseminated each day.

On the first day, we modelled the number of oviducts fertilized by a linear model with a Gaussian distribution, with age as a fixed factor.

For the second, third and fourth day, we modelled the number of females inseminated by a linear model with a Gaussian distribution, taking as a fixed factor the age and the number of inseminated females the day before to account for precedence.

#### *Allocated sperm*

The number of sperm allocated on the first day was modelled by a linear model with Gaussian distribution, taking the age of the males as a fixed factor.

As for the number of fertilized oviducts, we modelled the daily quantity of spermatozoa allocated per males on the second, third and fourth day, taking into account the precedence, using as a fixed factor the age of the males and the quantity of spermatozoa allocated the day before.

### Insemination success

#### *Number of inseminated females*

The total number of inseminated females at the end of the 4-day experiment was modelled by a linear model with a fixed age factor.

*Number of spermatozoa allocated for reproduction*

The total number of spermatozoa allocated at the end of the days of experimentation was modelled by a linear model with Gaussian distribution with age as the fixed factor.

**Remaining sperm**

The amount of remaining sperm was modeled by a linear model with Gaussian distribution, with age as a fixed factor.

**RESULTS**

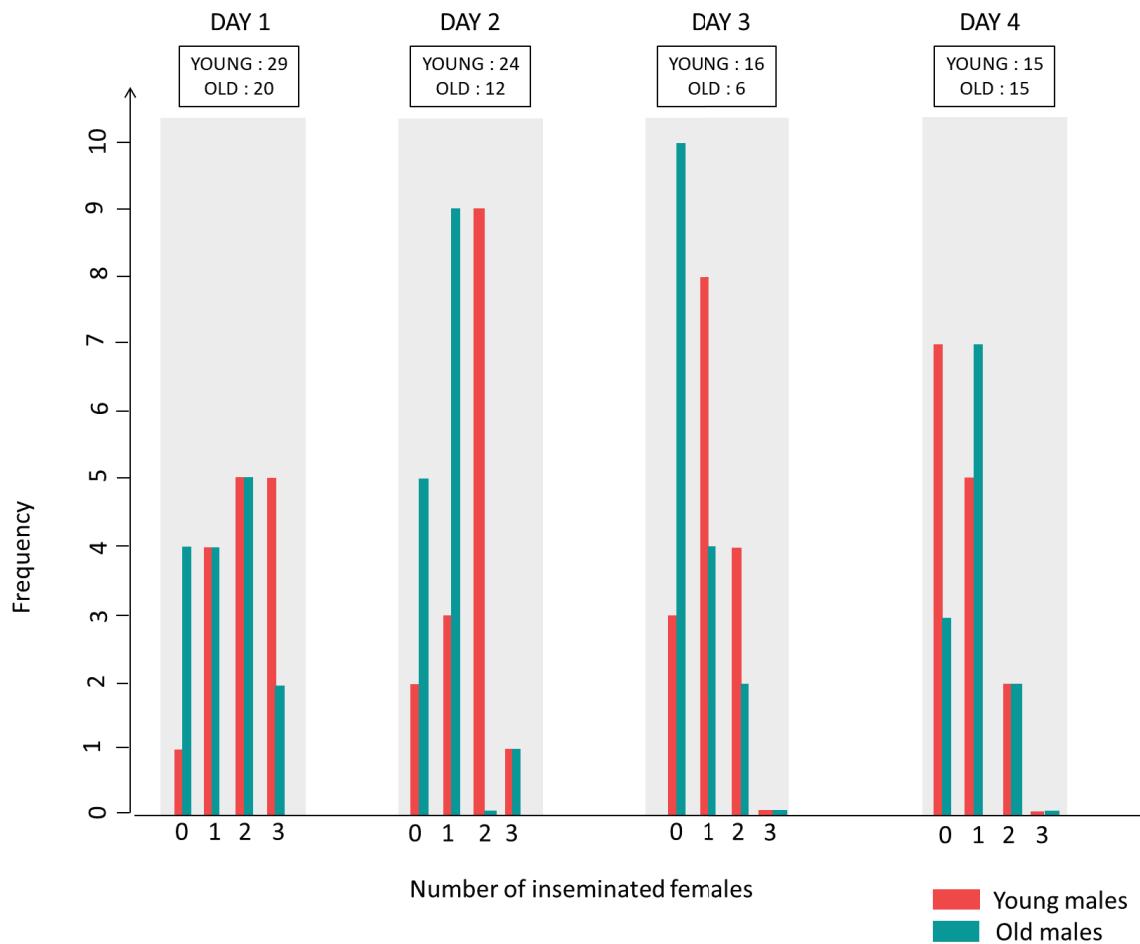
**Step 1: Sperm stock in virgin males**

In virgin males the quantity of sperm is higher in old males than in young ones in both vas deferens and seminal vesicle (Respectively: Estimate  $\pm$  sd=40564 $\pm$ 9252, P<0.001; Estimate  $\pm$  sd=152167 $\pm$ 22870, P<0.001).

**Step 2: Insemination kinetics**

*Number of inseminated females*

The first day, old and young males inseminated the same number of females ( $F_{1,28}=0.68$ , p=0.41, Figure 2).



*Figure 3: Distribution of the number of inseminated females per day and according to age*

Males are presented to 3 females. They have de possibility to inseminate 0 to 3 different females. In the 15 males used for each category (young or old males) we represented the frequency of males having inseminated 0,1,2, or 3 different females according to the day of the experiment.

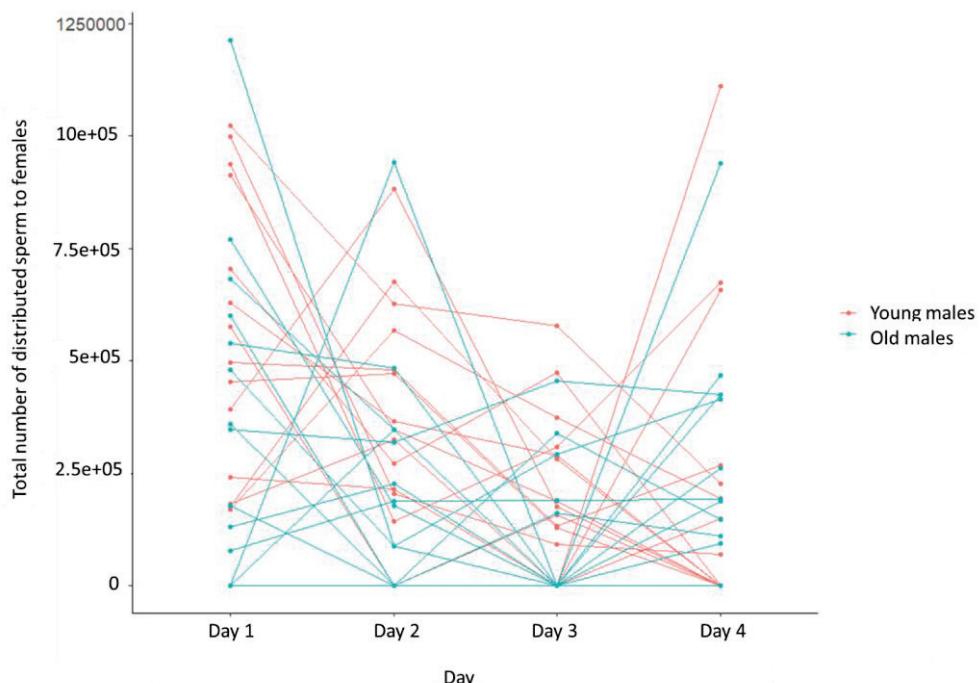
The second day, as the third day, old males inseminated less females than young ones (Respectively: Estimate  $\pm$  sd=-0.59  $\pm$  0.26,  $F_{1,27}= 4.89$ ,  $p=0.03$ ; Estimate  $\pm$  sd=-0.49 $\pm$ 0.22,  $F_{1,27}= 4.77$ ,  $p=0.04$ ; Figure 3), but not depends significantly about the number of inseminated females the previous day ( $F_{1,27}=0.03$ ,  $p=0.85$ ;  $F_{1,27}=0.61$ ,  $p=0.43$ ).

The fourth day, old males and young males inseminated the same number of females ( $F_{1,27}=0.01$ ,  $p=0.92$ ; Figure 3), independently of the number of females inseminated the previous day ( $F_{1,27}= 1.18$ ,  $p=0.28$ ; Figure 3).

*Quantity of allocated sperm*

The first day, the sperm quantity allocated to reproduction did not significantly differ between young and old males ( $F_{1,28}=0.78$ ,  $p=0.39$ ), as for the second, third and fourth day (Respectively :  $F_{1,27}=3.03$ ,  $p=0.10$  ;  $F_{1,27}=2.74$ ,  $p=0.11$  ;  $F_{1,28}=0.006$ ,  $p=0.94$ ). The number of sperm allocated the previous did not impact the sperm quantity allocated in reproduction the second, third and fourth day (Respectively :  $F_{1,27}=0.21$ ,  $p=0.64$  ;  $F_{1,27}=0.31$ ,  $p=0.58$  ;  $F_{1,28}=0.53$ ,  $p=0.47$ ).

*Figure 4: Plot of the total number of distributed sperm to females per day in relation to male age.*



*Each line represents one male.*

### **Step 3: Insemination success**

Males inseminated less females than young males (Estimate  $\pm$  sd=-1.94 $\pm$ 085, P=0.02, Figure 5).

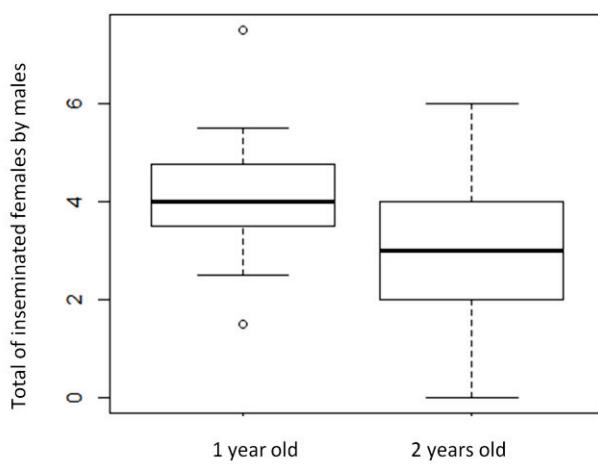


Figure 5: Total allocated sperm during the experiment according to age.

Then, they have distributed less sperm than young males (Estimate  $\pm$  se = -390367  $\pm$  189686, P=0.05, Figure 6).

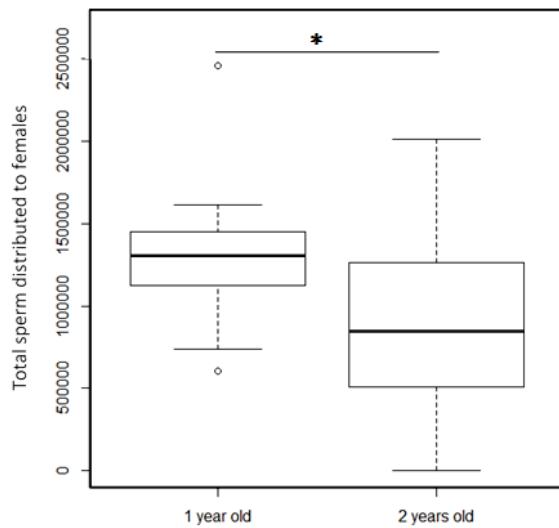


Figure 5: Total allocated sperm during the experiment according to age.

#### **Step 4: Remaining sperm**

After the depletion experiment the quantity of sperm stills higher in old males than in young ones in both vas deferens and seminal vesicle (Respectively: Estimate  $\pm$  sd=42673 $\pm$ 15512, P=0.01; Estimate  $\pm$  sd=304467 $\pm$ 81561, P<0.001).

## **Discussion**

In this study, we showed that 2-year-old males had more sperm in their gonads than 1-year-old males. Our experiment consisted of presenting 3 females per day for 4 days to each male. Concerning the kinetics there did not seem to be any different strategies between the 1-year-old males and the 2-years-old males who all saw their reproductive effort decrease on the 3rd day then increase on the 4th day. However, at the end of the 4 days, the young males had inseminated more females and had allocated more sperm than the 2-year-old males. We have thus shown that although the older males have a quantitatively greater sperm potential than the younger males, they are not as competitive during pre-copulatory selection.

As if the production of sperm is costly (Wedell et al. 2002), it appears to be no limiting in old individuals. So, how can we explained that old males, with greater sperm quantity were not able to inseminate as many females as young males?

(i) One hypothesis is that age lead a cost in reproductive behavioural. As the quantity of bundle of sperm was no limiting in old males and remaining in quantity after the mating with 12 females, this decrease in energy could then lead to a decrease in the efficiency in prospecting (Makai et al. 2020), in stimulation of the female (Kanuga et al., 2011) or even in the realisation of copulation (Fricke and Maklakov 2007).

(ii) Moreover, another hypothesis proposed that old males could be less attractive than young ones. When “Getting old” could be synonymous of genetically quality (Brooks 2001), numerous studies reports a negative effect of age on the male’s gamete quality and, thus, in offspring production and fitness (Johnson and Gemmell 2012; Fricke and Koppik 2019; Monaghan and Metcalfe 2019). Through sexual selection, mechanisms of avoidance of old males could be selected over time . By the discrimination of different pre-copulatory traits, females could be less receptive for mating with males of lower quality (Carazo et al. 2011). For example, in *Bombus terrestris*, the male’s sexual pheromones change with age and alters the female’s choice (Coppée et al. 2011). In woodlice, females can refuse mating (Lefebvre 2002) and could choose males for their genetic quality (Durand et al. 2017a). We hypothesize that females may choose to refuse breeding with old males to ensure better success for their offspring. In order to test these hypothesis, behavioural experiments must be conducted.

Recently, it has been showed that offspring from old parents have a poorer fitness than offspring from young parents in *A. vulgare*. These results suggest that, with age, the quality of gonads decreases in *A. vulgare* (Depeux et al. 2020), suggesting an impact of age on post-copulatory selection. If the male gonads are of poorer quality with age, one might have expected the males to multiply mating before maximizing their reproductive success. Conversely, they also experience a decrease in their ability to cope during pre-breeding selection, leading them to

perform less well than young individuals. It must be considered that females possess a spermatheca and that if a cryptic competition intervenes within this one, then a too important investment in quantity would not serve to compensate for the loss in quality. This could justify a reasoned allocation of males.

Our results suggest a very strong effect of reproductive senescence on sperm competition in an organism which, however, sees its quantitative sperm capacity increase with age. This paradox could perhaps be explained under natural conditions. Indeed, in the framework of this experiment we did not induce competition between males. Each male was able to meet his females in his box. However, we know that certain organisms can adjust their sperm allocation according to the competition present in their environment (Wedell et al. 2002). Thus, it will be interesting to test the male's competition and the allocation of old males.

Our study highlighted the effect of age on sperm competition in the woodlouse. Although we expected a higher allocation in older individuals, we found greater success in young males.

## Bibliography

- Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F. & Brooks, R. 2008. Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology* 22: 443–453.
- Bretman, A., Gage, M.J.G. & Chapman, T. 2011. Quick-change artists: male plastic behavioural responses to rivals. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 467–473.
- Brooks, R. 2001. Can older males deliver the good genes? *Trends in Ecology & Evolution* 16: 308–313.
- Burness, G., Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I., Moyes, C.D. & Montgomerie, R. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56: 65–70.

- Carazo, P., Molina-Vila, P. & Font, E. 2011. Male reproductive senescence as a potential source of sexual conflict in a beetle. *Behavioral Ecology* 22: 192–198.
- Coppée, A., Mathy, T., Cammaerts, M.-C., Verheggen, F.J., Terzo, M., Iserbyt, S., et al. 2011. Age-dependent attractivity of males' sexual pheromones in *Bombus terrestris* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Chemoecology* 21: 75–82.
- Depeux, C., Lemaître, J., Moreau, J., Dechaume-Moncharmont, F., Laverre, T., Pauhlac, H., et al. 2020. Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *Journal of Evolutionary Biology*, doi: 10.1111/jeb.13667.
- Durand, S., Braquart-Varnier, C. & Beltran-Bech, S. 2020. Promiscuity and sex ratio in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* and consequences on genetic diversity. *Behavioural Processes* 171: 104030.
- Durand, S., Cohas, A., Braquart-Varnier, C. & Beltran-Bech, S. 2017. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71.
- Durand, S., Loiseau, V., Prigot, C., Braquart-Varnier, C. & Beltran-Bech, S. 2018. Producing offspring in *Armadillidium vulgare*: Effects of genetic diversity and inbreeding. *Evolution & Development* 20: 65–77.
- Fitzpatrick, J.L. & Lüpold, S. 2014. Sexual selection and the evolution of sperm quality. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 20: 1180–1189.
- Fortin, M., Vitet, C., Souty-Grosset, C. & Richard, F.-J. 2018. How do familiarity and relatedness influence mate choice in *Armadillidium vulgare*? *PLoS ONE* 13: e0209893.
- Fox, J. & Weisberg, S. 2019. An {R} Companion to Applied Regression.
- Fricke, C. & Koppik, M. 2019. Male reproductive ageing - a tale of the whole ejaculate. *Reproduction*, doi: 10.1530/REP-18-0579.

- Fricke, C. & Maklakov, A.A. 2007. Male age does not affect female fitness in a polyandrous beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Animal Behaviour* 74: 541–548.
- Gasparini, C., Marino, I.A.M., Boschetto, C. & Pilastro, A. 2010. Effect of male age on sperm traits and sperm competition success in the guppy ( *Poecilia reticulata* ). *Journal of Evolutionary Biology* 23: 124–135.
- Girndt, A., Chng, C.W.T., Burke, T. & Schroeder, J. 2018. Male age is associated with extra-pair paternity, but not with extra-pair mating behaviour. *Scientific Reports* 8.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P. & Heiberger, R.M. 2016. Package ‘multcomp’ (ed. CRAN).
- Johnson, S.L. & Gemmell, N.J. 2012. Are old males still good males and can females tell the difference? *BioEssays* 34: 609–619.
- Johnson, S.L., Zellhuber-McMillan, S., Gillum, J., Dunleavy, J., Evans, J.P., Nakagawa, S., et al. 2018. Evidence that fertility trades off with early offspring fitness as males age. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285: 20172174.
- Jones, T.M. & Elgar, M.A. 2004. The role of male age, sperm age and mating history on fecundity and fertilization success in the hide beetle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: 1311–1318.
- Kanuga, M.K., Benner, M.J., Doble, J.A., Wilson-Leedy, J.G., Robison, B.D. & Ingermann, R.L. 2011. Effect of aging on male reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 315A: 156–161.
- Kelly, C.D. & Jennions, M.D. 2011. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews* 86: 863–884.
- Lefebvre, F. 2002. Reproductive strategies in terrestrial isopod crustaceans. Université de Poitiers.

Lemaître, J.-F., Berger, V., Bonenfant, C., Douhard, M., Gamelon, M., Plard, F., et al. 2015. Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proc Biol Sci* 282.

Lemaître, J.-F. & Gaillard, J.-M. 2017. Reproductive senescence: new perspectives in the wild. *Biol Rev* n/a-n/a.

Makai, G., Rodríguez-Muñoz, R., Boonekamp, J.J., Hopwood, P. & Tregenza, T. 2020. Males and females differ in how their behaviour changes with age in wild crickets. *Animal Behaviour* 164: 1–8.

McDonald, G.C., Spurgin, L.G., Fairfield, E.A., Richardson, D.S. & Pizzari, T. 2017. Pre- and postcopulatory sexual selection favor aggressive, young males in polyandrous groups of red junglefowl: SEXUAL SELECTION FAVORS AGGRESSIVE, YOUNG MALES. *Evolution* 71: 1653–1669.

Monaghan, P. & Metcalfe, N.B. 2019. The deteriorating soma and the indispensable germline: gamete senescence and offspring fitness. *Proc. R. Soc. B* 286: 20192187.

Moreau, J. & Rigaud, T. 2002. The Shape of Calcium Carbonate Deposits as an External Marker for Female Reproductive Status in Terrestrial Isopods. *Journal of Crustacean Biology* 22: 353–356.

Moreau, J., Seguin, S., Caubet, Y. & Rigaud, T. 2002. Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial crustacean. *Animal behaviour* 64: 569–577.

Paris, O.H. & Pitelka, F.A. 1962. Population characteristics of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology* 43: 229–248.

Pizzari, T., Dean, R., Pacey, A., Moore, H. & Bonsall, M.B. 2008. The evolutionary ecology of pre- and post-meiotic sperm senescence. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 131–140.

Preston, B.T., Saint Jalme, M., Hingrat, Y., Lacroix, F. & Sorci, G. 2015. The sperm of aging male bustards retards their offspring's development. *Nature Communications* 6.

- Radwan, J. 2003. Male age, germline mutations and the benefits of polyandry: Germline mutations, ageing and polyandry. *Ecology Letters* 6: 581–586.
- Sasson, D.A., Johnson, S.L. & Brockmann, H.J. 2012. The role of age on sperm traits in the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Animal Behaviour* 84: 975–981.
- Souty-Grosset, C., Chentoufi, A., Mocquard, J.P. & Juchault, P. 1988. Seasonal reproduction in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille): geographical variability and genetic control of the response to photoperiod and temperature. *International journal of invertebrate reproduction and development* 14: 131–151.
- Suzuki, S. 2001. Structural changes of the female genitalia during a reproductive cycle in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. *Invertebrate Reproduction & Development* 40: 9–15.
- Suzuki, S. & Ziegler, A. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Arthropod Structure & Development* 34: 441–454.
- Vega-Trejo, R., Fox, R.J., Iglesias-Carrasco, M., Head, M.L. & Jennions, M.D. 2019. The effects of male age, sperm age and mating history on ejaculate senescence. *Funct Ecol* 33: 1267–1279.
- Wedell, N., Gage, M.J.G. & Parker, G.A. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 313–320.
- Wickham, H. 2011. *ggplot2: ggplot2*. WIREs Comp Stat 3: 180–185.

## Appendix 1. Model selection

In bold the selected models

Models							
		Model	Variables	df	AICc	delta	weight
Number inseminated different females	of	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	332.9	17.51	0.000
			Day	5	325.7	10.36	0.003
			Father's age	3	327.0	11.66	0.002
			<b>Day + Father's age</b>	<b>6</b>	<b>316.3</b>	<b>0.97</b>	<b>0.379</b>
			Day * Father's age	9	315.4	0.00	0.615
Number inseminated oviducts	of	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	452.0	8.23	0.010
			Day	5	448.2	4.51	0.065
			Father's age	3	447.9	4.17	0.076
			<b>Day + Father's age</b>	<b>6</b>	<b>443.7</b>	<b>0.00</b>	<b>0.616</b>
			Day * Father's age	9	445.7	1.94	0.233
Total sperm allocated	allocated	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	3365.0	12.74	0.001
			Day	5	3354.6	2.35	0.217
			Father's age	3	3363.1	10.88	0.003
			<b>Day + Father's age</b>	<b>6</b>	<b>3352.3</b>	<b>0.00</b>	<b>0.704</b>
			Day * Father's age	9	3356.8	4.49	0.075
Allocated sperm by ova		Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	5141.4	5.92	0.035
			<b>Day</b>	<b>5</b>	<b>5135.5</b>	<b>0.00</b>	<b>0.681</b>
			Father's age	3	5143.3	7.87	0.013
			Day + Father's age	6	5137.5	2.08	0.240
			Day * Father's age	9	5141.7	6.25	0.030
Proportion of half-females fertilized		Linear Model (Gaussian distribution)	<b>Intercept</b>	<b>2</b>	<b>100.2</b>	<b>0.00</b>	<b>0.673</b>
			Day	5	105.1	4.96	0.056
			Father's age	3	102.2	1.97	0.251
			Day + Father's age	6	107.3	7.14	0.019
			Day * Father's age	9	113.5	13.32	0.001
Sperm quantity in vas deferens in virgin males		Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	711.2	13.66	0.001
			<b>Father's age</b>	<b>3</b>	<b>697.5</b>	<b>0.00</b>	<b>0.999</b>
Sperm quantity in seminal vesicle in virgin males		Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	778.2	26.45	0
<b>Sperm quantity in vas deferens in males after experiment</b>		Linear Model (Gaussian distribution)	<b>Father's age</b>	<b>3</b>	<b>751.8</b>	<b>0.00</b>	<b>1</b>
			Intercept	2	838.2	10.12	0.006
			Father's age	92	828.1	0.00	0.994

CHAPITRE II : ETUDE DE LA SENESCENCE REPRODUCTIVE CHEZ A. VULGARE

<b>Sperm quantity in seminal vesicle in males after experiment</b>	Intercept	2	1544.3	46.05	0.000
	Linear Model (Gaussian distribution)	Father's age	3	1505.7	7.45

## IV. Discussion

Par les deux études de ce chapitre II, nous mettons en évidence à la fois un effet transgénérationnel de l'âge chez le cloporte mais aussi, nous montrons une diminution de la compétitivité des vieux mâles lors de la reproduction.

### IV.1. Sénescence reproductive : mécanisme complexe et cocktail de traits à étudier

Dans l'introduction de ce chapitre, nous évoquions que le succès de reproduction ne dépend pas uniquement de la quantité de descendants produits. Il englobe un nombre important de traits qui peuvent tout à fait être modifiés avec l'âge et qu'il semble important d'étudier plus attentivement (Pizzari et al. 2008). Notre étude chez le cloporte permet de mettre en évidence l'importance d'étudier le succès de reproduction à plusieurs étapes et sur différents traits ([Figure 32](#)). En effet, si dans la première étude nous nous étions contentés de regarder le nombre de descendants produits par les vieux individus, nous aurions conclus à une absence de sénescence reproductive. Dans la deuxième étude, si nous nous étions arrêtés à la quantité de spermatozoïdes en stock chez les vieux mâles, une fois encore, nous n'aurions pas pu déceler la sénescence reproductive et aurions continué de considérer les vieux animaux comme des forces de reproduction dans les populations.

Chez les organismes à croissance indéterminée, on ne s'attend pas à trouver des signes de sénescence reproductive sur le nombre de descendants produits. Pourtant chez le cloporte, nous trouvons un effet de l'âge sur la qualité de ses descendants. Ces résultats pourraient être dus à une stratégie particulière chez ces organismes. Développer les connaissances chez des organismes très différents avec des stratégies évolutives très diversifiées pourraient apporter de précieux éléments à la compréhension du processus complexe de sénescence (Shefferson et al. 2017).

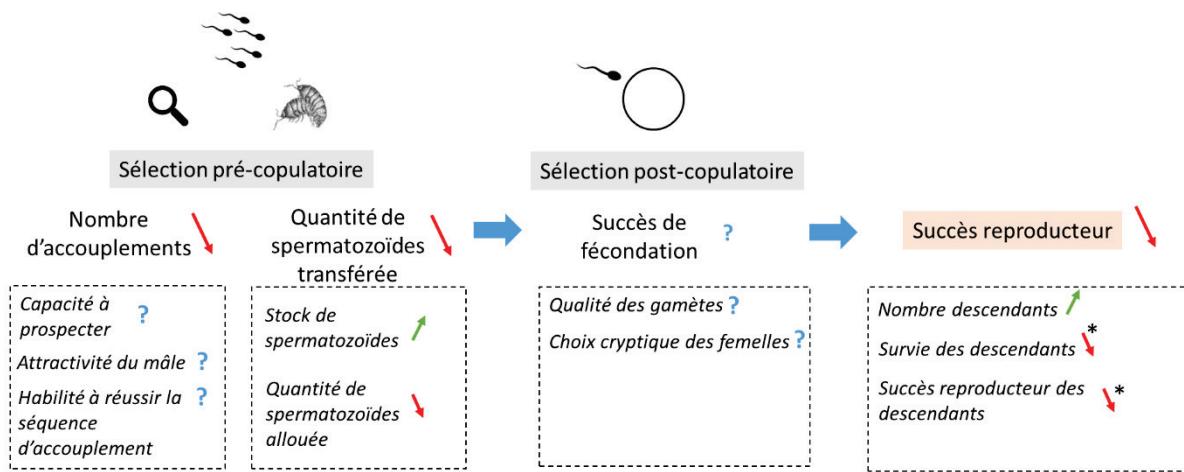


Figure 32 : Schéma simplifié de l'effet de l'âge sur les traits affectant le succès reproducteur chez les mâles *A. vulgare*

\* Effets mâle et femelle non dissociés

La flèche allant vers le bas signale une diminution dans le trait observé, une flèche allant vers le haut une augmentation et le point d'interrogation signifie l'absence de données pour le trait considéré.

#### IV.2. Stratégies de reproduction en fonction de l'âge

D'un point de vue de la stratégie de reproduction, nous savons que les vieux animaux sont contraints de se reproduire entre eux du fait de leur taille. Cet assortiment par taille a pour résultat une progéniture de mauvaise qualité. En effet, si les deux sexes présentent chacun des gonades dégradées, les descendants subiront doublement l'effet de l'âge de leurs parents. Cependant, il est intéressant de noter que chez notre espèce d'intérêt, la femelle possède une spermathèque, et que celle-ci peut stocker le sperme des mâles pour l'utiliser pendant plusieurs saisons de reproduction (Durand et al. 2020). Ainsi, un seul accouplement peut permettre à la femelle de produire des portées tout au long de sa vie (cf. Chapitre 1). Si le sperme est dégradé avec l'âge et produit une descendance de mauvaise qualité, il semble donc nécessaire pour les mâles d'augmenter leur allocation à la reproduction lorsque le sperme est encore de bonne qualité. Cependant, il est aussi possible que le sperme puisse aussi connaître des dégradations au sein de la spermathèque. Pour la femelle, il paraît donc indispensable de sélectionner les mâles avec lesquels elle choisit de s'accoupler, afin de privilégier une descendance de bonne qualité, ce qu'elles semblent faire sur des critères génétiques notamment (Durand

et al. 2017a ; Fortin et al. 2018). Du côté des mâles, il est important de multiplier les partenaires pour maximiser leur reproduction lors de leur première saison de reproduction. Nous savons qu'il existe un trade-off entre l'allocation à la reproduction en début de vie et les reproductions futures ainsi que la survie (Lemaître et al. 2015). Le coût de l'allocation à la reproduction précoce pourrait expliquer la forte mortalité observée au sein des populations de cloportes après la première saison de reproduction que nous avons pu observer dans le chapitre I et présent aussi dans les résultats de Paris et Pitelka, 1962.

En utilisant des individus vierges, nous avons pu observer une diminution des performances, qui auraient pu, dans les conditions naturelles, être attribuées à ce type de compromis entre l'allocation à la reproduction précoce et tardive. Pourtant, sans même avoir investi dans la reproduction en début de vie (les individus vieux étant vierges dans nos expériences), l'énergie allouée à la reproduction diminue avec l'âge, ainsi que la qualité des descendants, prouvant ainsi qu'il existe bien une sénescence reproductive chez ces espèces à croissance indéterminée mais aussi que le maintien du métabolisme est couteux et qu'il est impératif pour ces organismes d'investir rapidement dans la reproduction.

### VI.3. Pistes futures et propositions d'expérimentations

Comme nous avons pu le souligner précédemment, la sénescence reproductive est un processus complexe qui peut intervenir à chacune des étapes constituant le processus complexe que représente la reproduction. Ainsi, pour déceler ce processus et mieux le comprendre, il paraît indispensable de développer les approches permettant de tester l'effet de l'âge sur le plus de traits possibles. Par les deux expériences de ce chapitre II, nous avons pu mesurer l'effet de l'âge sur le succès reproducteur (soit le résultat final) et l'allocation à la reproduction des mâles. Pourtant, de grands traits restent à étudier, notamment toute la composante comportementale caractérisant le succès des mâles auprès des femelles (et inversement), mais aussi la sélection sexuelle post-copulatoire. Pour cela il serait par exemple très intéressant de mettre en place des inséminations artificielles afin d'observer l'effet de l'âge du sperme sur la fécondation.

Dans l'étude de la sélection sexuelle post- et pré-copulatoire, le cloporte est d'autant plus un modèle de choix que la femelle stocke le sperme des différents mâles dans sa

spermathèque pendant plusieurs saisons de reproduction, et présente des multipaternités dans sa descendance (Bech et al. 2017 ; Durand et al. 2018, 2020). Les outils permettant de déterminer la paternité de chaque descendant sont déjà établis et pourraient nous renseigner sur le potentiel choix cryptique des femelles (Bech et al. 2017). Ainsi, nous pourrions voir quelle est l'allocation de chaque mâle dans une portée. En inséminant artificiellement la femelle avec des spermatozoïdes d'âges différents et en même quantité nous pourrions avoir une idée de l'intensité de la compétition spermatique post-copulatoire au sein de la spermathèque. Evaluer l'effet de l'âge sur la sélection sexuelle est un réel challenge en biologie évolutive, les modèles expérimentaux comme le cloporte sont de vraies opportunités de pouvoir comprendre ces mécanismes.



Chapitre III :  
Développement de  
biomarqueurs cellulaires  
de sénescence chez A.  
*vulgare*

---

## I. Introduction

Nous avons précédemment défini la sénescence comme étant un déclin de la *fitness* avec l'âge. Ce déclin de la *fitness* est généralement considéré comme étant la conséquence d'une accumulation des dommages cellulaires avec le temps (Kirkwood 2005 ; Gems and Partridge 2013).

La dégradation des cellules avec l'âge est un processus normal, cependant, sa vitesse et son intensité vont être variables selon les stress rencontrés au long de leur vie. Ainsi, les organismes vont avoir deux âges : (i) l'âge dit « chronologique », qui donne la mesure de l'âge de l'individu en unité de temps et l'âge dit « biologique », qui représentera d'avantage l'âge physiologique de l'organisme. Bien évidemment, l'âge chronologique permettra de donner des indices sur l'état physiologique d'un organisme mais c'est l'âge biologique qui caractérisera réellement à quel moment de sa vie se situe l'organisme. Il n'est cependant pas aisément de quantifier l'âge biologique, et, dans ce but, des biomarqueurs de sénescence doivent être mis en place. Un biomarqueur de sénescence est défini comme étant un paramètre capable de mieux prédire leur âge biologique que leur âge chronologique (Baker and Sprott 1988). Ils doivent présenter quelques caractéristiques précises (décrisées dans Johnson, 2006) :

- Ils doivent être capables de prédire le taux de sénescence. Ils doivent pouvoir renseigner sur la durée de vie d'un individu.
- Ils doivent souligner le processus de sénescence et non l'effet d'une maladie.
- Ils doivent pouvoir être utilisés sans entraîner d'effets négatifs sur l'individu.
- Ils doivent être utilisables sur l'Homme mais aussi sur des animaux de laboratoire.

Les deux dernières caractéristiques sont particulièrement importantes pour l'étude de la sénescence sur le modèle humain et à des fins thérapeutiques. Pour l'étude fondamentale de la sénescence, les deux premiers critères à respecter sont indispensables.

## II. Présentation de l'étude

En médecine ou en biologie cellulaire, la sénescence est bien souvent étudiée à l'échelle de la cellule. Ce ne sont alors plus les diminutions des performances qui sont mesurées mais, la plupart du temps, des biomarqueurs de sénescence. Dans le but de développer les connaissances sur notre modèle, et de pouvoir mesurer la sénescence à plusieurs échelles, nous avons testé sur le cloporte *A. vulgare*, des biomarqueurs de sénescence connus chez les vertébrés. Après avoir ciblé des tissus qui ne muaient pas au cours de la vie du cloporte et en avoir sélectionné un (la chaîne nerveuse), nous avons mesuré l'activité de la Bêta-galactosidase, le profil des cellules immunitaires et l'expression d'un gène impliqué dans l'activité de la télomérase (le gène TERT). Comme attendu, ces biomarqueurs fonctionnent aussi chez notre modèle. En effet, avec l'âge, l'activité de la Bêta-galactosidase augmente dans la chaîne nerveuse des individus, le nombre et la viabilité des cellules immunitaires diminuent tandis que leur taille augmente. Enfin, dans les gonades, l'expression du gène impliqué dans l'activité de la télomérase (gène TERT) diminue aussi avec l'âge, et dans la chaîne nerveuse chez les femelles.

### Box technique 2 : Protocoles de mesure des biomarqueurs de sénescence

#### Profil des cellules immunitaires

Pour obtenir la concentration, la survie et la taille des hémocytes, 3 $\mu$ L d'hémolymphes sont prélevés et rapidement déposés dans 15 $\mu$ L de MAS-EDTA (9mM EDTA, 27mM citrate de sodium, 336 mM NaCl, 115 mM glucose, pH=7-7.4) pour éviter les processus de « coagulation ». Puis, 6 $\mu$ L de Le bleu de Trypan, colorant permettant la coloration des cellules mortes, sont ensuite ajoutés. Ensuite, 10 $\mu$ L de la solution obtenue sont déposés sur une lame de comptage Countess® et les hémocytes sont dénombrées sur le compteur de cellules Countess®. Au-delà de leur nombre, le compteur de cellules permet de connaître la taille moyenne des cellules et leur viabilité.

#### Activité de la Bêta-galactosidase

Une extraction des protéines est réalisée à partir des chaînes nerveuses des individus. Après dissection des individus dans du Ringer (NaCl 394mM, KCl 2mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, NaHCO<sub>3</sub> 2mM), les chaînes nerveuses sont prélevées, déposées puis broyées dans 300µL de tampon de lyse 1X (CHAPS 5mM, acide citrique 40mM, phosphate de sodium 40mM, benzamidine 0.5mM, PMSF 0.25mM). Les échantillons sont vortexés puis centrifugés à 15000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est immédiatement dosé pour évaluer la concentration protéique puis conservé à -80°C.

Les protéines sont quantifiées avec le kit BCA®(Thermofisher). Brièvement, nous ajoutons à 25µL d'extrait protéique, obtenu lors de l'extraction des protéines 25µL du réactif. Le réactif, contenant de l'acide bicinchonique, forme un complexe avec les protéines entraînant une coloration violet-pourpre. Après 1h d'incubation à 37°C, la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines. Elle est mesurée à l'aide du nanodrop (Thermofisher). Il est alors possible d'estimer, grâce à l'utilisation d'une gamme étalon, la quantité de protéines contenue dans la solution. Suite à ce dosage, des dilutions sont réalisées pour obtenir des échantillons présentant la même concentration protéique (pouvant être différente selon l'expérience), nous permettant d'obtenir ainsi l'extrait protéique utilisé pour le dosage de l'activité Bêta-galactosidase.

La méthode utilisée pour doser l'activité Bêta-galactosidase a été mise au point par Gary et Kindell en 2005. Elle permet de quantifier l'activité de la Bêta-galactosidase par fluorescence. La réaction est possible grâce au réactif MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside) qui, au contact de la Bêta-galactosidase, entraîne la synthèse par hydrolyse fluorescente du 4-MU (4-methylumbelliferone) à pH = 6 (Gary and Kindell 2005). Dans le cadre de notre étude, nous mélangeons 75µL d'une solution réactive de MUG (acide citrique 40mM, phosphate de sodium 40mM, NaCl 300mM, β-mercaptopéthanol 10mM, MgCl<sub>2</sub> 4mM, MUG 1.7mM ajouté à partir d'une solution stock à 34mM préparée dans du dyméthylsulfoxyde pour des raisons de dissolution) avec 75µL d'extrait protéique dans une plaque de 96 puits. La fluorescence est mesurée 2h après une incubation à 37°C par un lecteur de plaque (Bethold). Deux réplicats techniques sont réalisés pour chaque échantillon.

#### Expression de la TERT

Afin de mesurer l'expression de la TERT, il est nécessaire de prélever le tissu désiré sur l'animal (gonade ou chaîne nerveuse). Chaque tissu est alors déposé dans du TRIzol (Invitrogen) pour extraire l'ARN selon le protocole du fabricant. Après une désintégration cellulaire en utilisant un sonicator Vibra Cell 75,185 (30% d'amplitude), les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les RT (reverse transcriptases) sont réalisées à partir d'une solution de 500ng d'ARN et du kit SuperScript™ IV (Thermofisher). Les primers utilisés sont les suivants : primer TERT\_F: 5'-AGGGAAAACGATGCACAACC-3' et primer TERT\_R: 5'-GTTCGCCAAATGTTCGAAC-3'. Ils sont établis à partir du génome du cloporte (Chebbi et al. 2019), et après une comparaison avec les séquences retrouvées chez d'autres espèces. La RT-PCR est réalisée en utilisant 0.6µL de chaque primer (10µM), 2.5 µL d'eau « nuclease free » et 1.5% d'ADNC et d'un thermocycleur avec le programme suivant : 10 minutes à 95°C, 45 cycles de 10s à 95°C, 10s à 60°C, et 20s à 72°C. Les niveaux d'expression des gènes cibles ont été normalisés sur le niveau d'expression de deux gènes de référence préalablement établis : la protéine ribosomique L8 (RbL8) et l'elongation Facteur 2 (EF2) (Chevalier et al. 2012).

### III. Article scientifique publié dans Journal of Crustacean Biology



## The crustacean *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Oniscoidea), a new promising model for the study of cellular senescence

Charlotte Depoux<sup>1,2</sup>\*, Ascel Samba-Louaka<sup>1</sup>\*, Thomas Becking<sup>1</sup>, Christine Braquart-Varnier<sup>1</sup>, Jérôme Moreau<sup>3</sup>, Jean-François Lemaitre<sup>2</sup>, Tiffany Laverre<sup>1</sup>, Hélène Pauliac<sup>1</sup>, François-Xavier Dechaume-Moncharmont<sup>4</sup>\*, Jean-Michel Gaillard<sup>2</sup>\*, and Sophie Beltran-Bech<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Poitiers, Laboratoire Écologie et Biogéoécoévolutions UMR CNRS 7267, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106 86073 Poitiers Cedex 9, France

<sup>2</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biostatistique UMR 5558, F-69622 Villeurbanne France

<sup>3</sup>BioGéosciences UMR 6282 CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France and

<sup>4</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire UMR 5023, 6 rue Raphaël Dubois 69622 Villeurbanne Cedex, France

\*Corresponding author: C. Depoux; email: charlottedepoux@gmail.com

(Received 30 August 2019; accepted 23 January 2020)

### ABSTRACT

Senescence, the decline of physiological parameters with increasing age, is a quasi-ubiquitous phenomenon in the living world. The observed patterns of senescence, however, can markedly differ across species and populations, between sexes, and even among individuals. To identify the drivers of this variation in senescence, experimental approaches are essential and involve the development of tools and new study models. Current knowledge of the senescence process is mostly based on studies on vertebrates and the main information about senescence in invertebrates is mostly limited to model organisms such as *Caenorhabditis elegans* or *Drosophila melanogaster*. In this context, we tested whether biomarkers of vertebrate ageing could be used to study senescence in a new invertebrate model: the common woodlouse *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). More specifically, we looked for the effect of age in woodlouse on three well-established physiological biomarkers of ageing in vertebrates: immune cells (cell size, density, and viability),  $\beta$ -galactosidase activity, and the gene expression of telomerase reverse transcriptase (TERT), an essential subunit of telomerase protein. We found that the size of immune cells was higher in older individuals, whereas their density and viability decreased, and that the  $\beta$ -galactosidase activity increased with age, whereas the TERT gene expression decreased. These findings demonstrate that woodlouse displays age-related changes in biomarkers of vertebrate senescence, with different patterns depending on gender. The tools used in studies of vertebrate senescence can thus be successfully used in studies of senescence of invertebrates such as the woodlouse. The application of commonly used tools to new biological models offers a promising approach to assess the diversity of senescence patterns across the tree of life.

**Key Words:** immunosenescence, telomerase reverse transcriptase (TERT),  $\beta$ -galactosidase activity

### INTRODUCTION

Many hypotheses have tried to explain why senescence is a quasi-ubiquitous phenomenon in the living organisms. For instance, the disposable soma theory proposed the senescence process as a result of damages accumulation over time (Kirkwood, 1977). These damages are strongly influenced by the environment, leading to trade-offs between the different functions (e.g., between

reproduction and somatic maintenance) and shaping a high diversity of senescence patterns across species and populations, among individuals, and between sexes. One current challenge is to understand the selective forces and mechanisms driving this diversity of senescence patterns.

At the cellular level, senescence corresponds to the cellular deterioration leading to stop the cellular cycle (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). As ageing is associated with cellular

senescence (Herbig et al., 2006; Wang et al., 2009; Lawless et al., 2010), many biomolecular parameters potentially inform about senescence and can therefore be valuable tools for studying this process (Bernardet de Jesus & Blasco, 2012). For example, the evolution of the integrity and efficiency of immune cells is particularly relevant to study cellular senescence because a diminution of the number of effective immune cells with increasing age takes place in both vertebrates (e.g., Cheynel et al., 2017) and invertebrates (e.g., Park et al., 2011). Another marker used to study cellular senescence is the enzymatic activity of the  $\beta$ -galactosidase. This enzyme is a hydrolase that transforms polysaccharides into monosaccharides. The lysosomal activity of this enzyme is increased when the cell enters in senescence (Dimri et al., 1995; Itahana et al., 2007). This phenomenon occurs in senescent cells of many organisms ranging from humans (Gary & Kindell, 2005) to honeybees (Hsieh & Hsu, 2011). Another protein linked to the cellular senescence process is the telomerase, a ribonucleoprotein complex composed by two essential components, the telomerase reverse transcriptase (TERT) and the telomerase RNA (TR) and other accessory proteins (Podlevsky et al., 2007). Telomerase lengthens the ends of telomeres (i.e., DNA sequences located at the end of chromosomes that protect chromosome integrity and shorten after each cell division). Cell senescence arises when the telomere length becomes critically short (Chiu & Harley, 1997; Shay & Wright, 2005). Telomerase activity depends on the species, age, as well as the type of tissue (e.g., Gomes et al., 2010). For instance, telomerase is active during the development before birth and after only in stem and germ cells in humans (Liu et al., 2007; Morgan, 2013) whereas in *Daphnia pulicaria* Forbes, 1893 the telomerase activity in all tissues of the body decreases with increasing age (Schumpert et al., 2015). The TERT is essential in the telomerase protein complex and has been shown to be related to cell survival in humans (Cao et al., 2002). The TERT has also been detected in numerous species including vertebrates, fungi, ciliates, and insects (Robertson & Gordon, 2006; Podlevsky et al., 2007).

Because the patterns of senescence are strongly diversified within the living world, it seems essential to study organisms displaying markedly different life-history strategies to understand the causes and mechanisms underlying this diversity. Thus, invertebrates are increasingly used in experimental studies of senescence (Stanley, 2012; Ram & Costa, 2018). In addition to share similarities with vertebrates in terms of senescence, they can be manipulated experimentally and they are easier to monitor throughout their entire lifetime (Ram & Costa, 2018). These advantages make them models of choice for studying senescence. Here, we propose the common woodlouse *Armadillidium vulgare* (Latrelle, 1804) as a promising new model for studying senescence. Woodlouse can live beyond three years and displays sex-specific senescence patterns in natural populations (Paris & Pitelka, 1962). In addition, one study has already reported evidence of immune-senescence in this species (Sicard et al., 2010).

In this context, we tested the suitability of  $\beta$ -galactosidase activity, immune cell parameters, and the TERT gene expression to cause age-specific responses in *A. vulgare*. According to reports in the literature, we expected an increase in  $\beta$ -galactosidase activity, and a decrease of both TERT gene expression and immune cell viability and density in *A. vulgare*. As males have higher adult survival than females (Paris & Pitelka, 1962), cellular senescence patterns are also expected to be sex-specific in this species.

## MATERIALS AND METHODS

### *Biological model*

Individuals of *A. vulgare* used in the experiments were obtained from a wild population collected in Denmark in 1982. These individuals have been maintained on moistened soil under the

natural photoperiod of Poitiers, France (46.58°N, 0.34°E) at 20 °C, and fed *ad libitum* with dried linden leaves and carrots. Crosses were monitored to control and promote genetic diversity. For each clutch obtained, individuals were sexed, and brothers and sisters were separated to ensure virginity. Woodlice are promiscuous and only breed when they are one-year old during their first breeding season in the spring. Females carry their offspring in a ventral pouch (marsupium) and can produce up to three clutches per season. In the common woodlouse, individuals molt throughout their lifetimes, with approximately one molt per month. During this process all the cells of the concerned tissues are renewed (Steel, 1980). The brain, the nerve cord, and gonads, however, are not renewed during molting and are therefore relevant candidates for tissue-specific study of senescence in this species. Woodlice were classified in three different age categories: juvenile (before first reproduction, from birth to one-year old), young (one-year old, first year of reproduction), and old (up to two-year old), which are very rare in natural populations (Paris & Pitelka, 1962). As the woodlouse is a continuous grower, juveniles and small individuals could not be used for certain experiments, especially when they required protein extraction or hemolymph collection. Thus, we were only able to test in them the telomerase expression. Old individuals were sampled according to the number of individuals available in our breeding; sometimes we had two-year-old individuals and sometimes three-year-old ones. Moreover, males and females were tested separately to assess the impact of sex.

### *Measurement of $\beta$ -galactosidase activity*

To test the impact of age on  $\beta$ -galactosidase activity, 180 individuals were used: 90 young (i.e., six-month old, 45 males and 45 females) and 90 old (two-year old, 45 males and 45 females).

Individuals were dissected separately in Ringer solution (sodium chloride (NaCl) 394 mM, potassium chloride (KCl) 2 mM, calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) 2 mM, sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) 2 mM) and nerve cord was removed. To obtain a sufficient amount of protein, we made pools of five nerve cords from five different individuals of the same age. The five nerve cords were fixed in 500 µl of Lyse buffer 1X (Chaps detergent ((3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate) 5 mM, citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) 40 mM, sodium phosphate (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 40 mM, benzamidine (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>) 0.5 mM, and PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>FO<sub>2</sub>S) 0.25 mM, pH 6) (Gary & Kindell, 2005), and then centrifuged at 15,000 g at 4 °C for 30 min. The supernatant was taken and kept at -80°C until its utilization. The protein concentration was determined by the BCA (bicinchoninic acid assay) assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and homogenized at 0.1 mg ml<sup>-1</sup>. The  $\beta$ -galactosidase activity was measured as described by Gary & Kindell (2005). Briefly, 100 µl of extracted protein at the concentration of 0.1 mg ml<sup>-1</sup> were added to 100 µl of reactive 4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside (MUG) solution in a 96-well microplate. The MUG reactive, in contact to  $\beta$ -galactosidase, leads by hydrolysis to the synthesis of 4-methylumbelliferyl (4-MU), which is detectable using fluorescent measurements. Measures were performed by the multimode Mithras microplate reader (LB940 HTS III, excitation filter: 360 nm; emission filter 460 nm; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) for 120 min. Two technical replicates were measured for each nerve pool.

### *Measurement of immune cell parameters*

To test the impact of age on the immune cell parameters (i.e., density, viability, and size), we were able to undertake individual tests because of our previous experience. It was therefore not necessary to carry out pools of hemolymph unlike proteins or DNA to make the measurements. Sixty mature individuals were used:

ARMADILLIDIUM VULGARE AS A MODEL FOR CELLULAR SENESCENCE

30 young (i.e., one-year old, 15 males, and 15 females) and 30 old (three-year old, 15 males, and 15 females) individuals.

To study the impact of age on the immune parameters, a hole was bored in the middle of the sixth segment and 3 µl of haemolymph were collected per individual with an eyedropper and deposited promptly in 15 µl of anticoagulant solution (MAS-EDTA (ethylenediaminetetraacetic ( $C_{10}H_{16}N_2O_4$ )) 9 mM, trisodium citrate ( $Na_3C_6H_5O_7$ ) 27 mM, sodium chloride (NaCl) 336 mM, glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) 115 mM, pH 7 (Rodriguez et al., 1995)). Then, 6 µl of trypan blue at 0.4% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added to color the dead cells. Thereafter, 10 µl of this solution were deposited in a counting slide (Invitrogen Countess®; Thermo Fisher Scientific). The immune cell density, the immune cell viability, and the immune cell size were evaluated using an automated cell counter (Invitrogen Countess®).

#### Measurement of TERT gene expression

The identification of the telomerase reverse transcriptase (TERT) gene was first performed from the *A. vulgare* genome (Chebbi et al., 2019). In order to test whether this gene was present and preserved in crustaceans, phylogenetic analyses were undertaken upstream (see Supplementary material S1-S4). This gene has been found in crustacean transcriptomes and the topology of the TERT-gene tree follows the phylogenetic relationships between the involved species (Supplementary S3), suggesting a conserved role of the TERT gene.

#### Gene expression

We tested the effect of age on the expression of TERT gene within four different age groups: 1) four-month old, 2) one-year old, 3) two-year old, and 4) three-year old. Females and males were tested separately by pools of five individuals in one-, two-, and three-year-old groups and by pools of seven individuals in a four-month-old group as smaller individuals provide less biological material. All conditions required four replicates for each sex. A total of 176 individuals were used for this experiment. For each group we tested the expression level of the TERT gene in two different tissues: the nerve cord (somatic line) and gonads (germinal line).

Animals were washed by immersion for 30 sec in a 30% sodium hypochlorite solution (NaClO) followed by two 30-sec immersions in distilled water. Tissues were dissected in Ringer solution (sodium chloride 394 mM, potassium chloride (KCl) 2 mM, calcium chloride ( $CaCl_2$ ) 2 mM, sodium bicarbonate ( $NaHCO_3$ ) 2 mM) and deposited by pools of five units for each tissue on TRIzol reagent (Invitrogen) to extract RNA according to the manufacturer's protocol after a cell disintegration using a Vibra Cell 75,185 (30% amplitude) sonicator (Qsonica, Newton, CT, USA). Total RNA was quantified by NanoDrop technology and stored at -80 °C until use. Reverse transcriptions (RT) were made from 500 ng of RNA previously extracted and using the SuperScript™ IV Reverse Transcriptase kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Primers were designed using the identified gene: primer TERT\_F: 5'-AGGGAAAACGATGCACAACC-3' and primer TERT\_R: 5'-GTTGCCAAATGTTCGAAC-3' (see Supplementary material S1). Quantitative RT-PCR was performed using 0.6 µl of each primer (10 µM), 2.4 µl of nuclease-free water, and 1.5 µl of cDNA template and the LightCycler LC480 system (Roche, Pleasanton, CA, USA) as follows: 10 min at 95 °C, 45 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, and 20 s at 72 °C. Expression levels of target genes were normalized based on the expression level of two reference genes previously established: the ribosomal protein L8 (RbL8) and the Elongation Factor 2 (EF2) (Chevalier et al., 2011).

#### Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the R software v3.5.2 (R. Core Team, 2018). The β-galactosidase activity was analyzed with linear mixed effect models using the package lme4 (Bates et al., 2014). As two technical replicates were measured for each pool, the model included the pools fitted as a random effect, age and sex and their two-way interactions as fixed factors.

Concerning the immune parameters, linear models with Gaussian distribution were fitted to analyze variation in the cell size and viability. A linear model of the cell number (log-transformed; Ives, 2015) was fitted for the cell density.

The level of TERT expression according to age in the two different tissues were compared by a Kruskal-Wallis rank sum test in combination with Nemenyi's post hoc multiple comparison test with the Tukey correction using R package PMCMR (Pohlert, 2014).

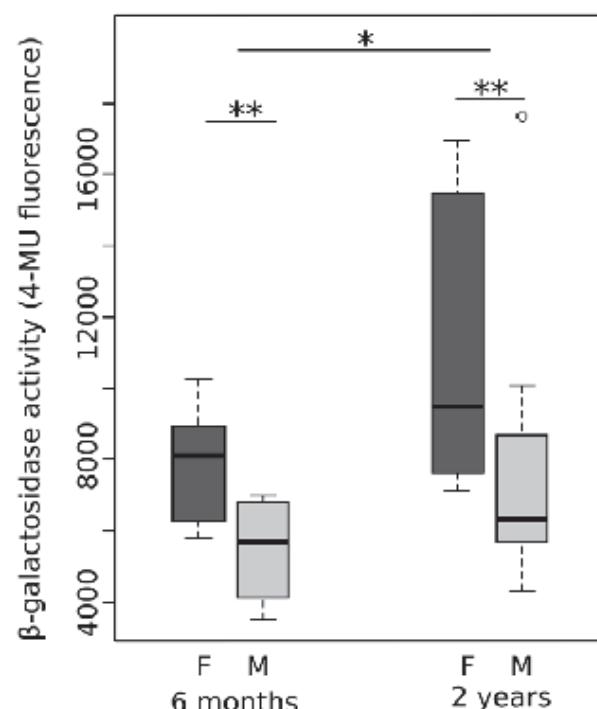
## RESULTS

#### β-galactosidase activity

The β-galactosidase activity was higher in old (i.e., two-year old) than in young (i.e., six-month old) individuals ( $\chi^2 = 6.15$ ,  $P = 0.013$ ; Fig. 1). We also detected a higher β-galactosidase activity in females than in males ( $\chi^2 = 7.26$ ,  $P = 0.007$ ; Fig. 1).

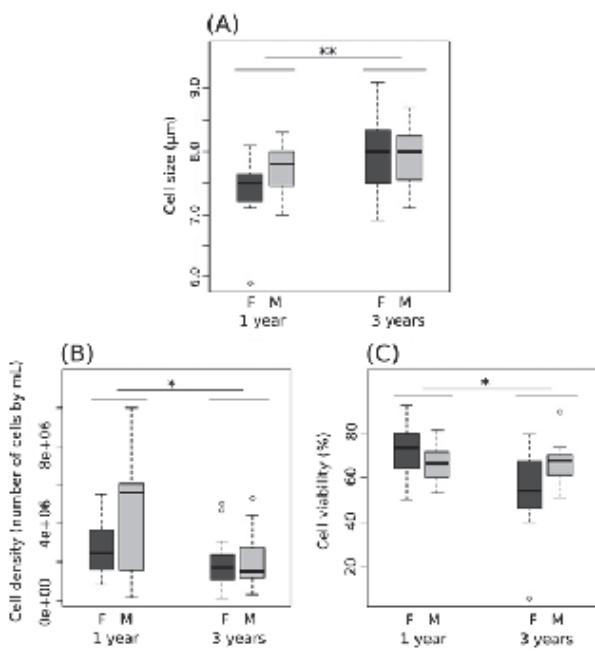
#### Immune cells parameters

Cell size was higher in three-year-old than in one-year-old individuals ( $F_{1,158} = 8.54$ ,  $P = 0.005$ ; Fig. 2A). Conversely, the cell density was higher in one-year-old than in three-year-old individuals



**Figure 1.** Boxplot of β-galactosidase activity in *Armadillidium vulgare* according to age and sex (F, females; M, males). The thick line represents the median, the box the interquartile range, and the whisker the most extreme data point within 1.5 of the interquartile range. The outliers outside this range are shown as open circles.  $N = 180$  individuals: 45 six-month old females, 45 six-month old males, 45 two-years old females, and 45 two-years old males studied in pools of 5 individuals \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

( $F_{1,58} = 4.33, P = 0.01$ ; Fig 2B). Concerning the immune cell viability, a statistically significant interaction occurred between age and sex, with a relatively lower immune cell viability in three-year-old females ( $F_{3,56} = 6.85, P = 0.01$ ; Fig 2C). No sex effect was detected on cell size ( $F_{2,57} = 0.76, P = 0.38$ ; Fig 2A) or cell density ( $F_{2,57} = 0.32, P = 0.57$ ; Fig 2B).



**Figure 2.** Immune cell size (A), density (B), and viability (C) according to age and sex in *Armadillium vulgare* (F, females; M, males). The thick line represents the median, the box the interquartile range, and the whisker the most extreme data point within 1.5 of the interquartile range. The outliers outside this range are shown as open circles. N = 60 individuals: 15 one-year-old females, 15 one-year-old males, 15 three-years-old females, and 15 three-years-old males; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01.

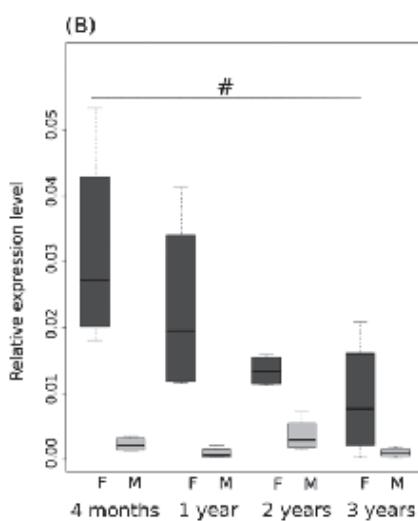
#### TERT gene expression

The TERT gene expression decreased with increasing age in nerve cords ( $\chi^2_1 = 23.30, P < 0.001$ ; Fig 3A). TERT expression was higher in four-month-old individuals compared to two-year-old and three-year-old individuals ( $P = 0.001$  in both cases) and in one-year-old individuals compared to three-years-old individuals ( $P = 0.038$ ), without any detectable sex effect ( $\chi^2_1 = 0.14, P = 0.70$ ; Fig 3A). In gonads, the TERT gene expression was much higher in females ( $\chi^2_1 = 17.81, P < 0.001$ ; Fig 3B) and tended to decrease with increasing age ( $\chi^2_1 = 7.5, P = 0.057$ ; Fig 3B) as the TERT gene expression tended to be higher in four-month-old females compared to three-year-old females ( $P = 0.054$ ). A general tendency was also observed in males ( $\chi^2_1 = 7.34, P = 0.061$ ; Fig 3B), the TERT gene expression tending to be higher in two-year-old individuals compared to one-year-old and three-year-old individuals ( $P = 0.14$  and  $P = 0.12$ , respectively; Fig 3B).

## DISCUSSION

We tested several effective physiological biomarkers of vertebrate senescence to assess whether they could also be used in invertebrates such as the common woodlouse. Immune cells showed an increase in their size and a decrease in their density and viability with increasing age. The activity of the  $\beta$ -galactosidase enzyme in nerve cords increased. The TERT gene expression decreased with increasing age in nerve cords of males and females and in the gonads of females. In contrast, the TERT gene expression was too low in the male gonads to suggest a role on the cellular senescence status in this tissue. The difference regarding the expression of TERT in the nerve cords and gonads underlies the importance of organ choice to perform such an analysis.

Our study is in line with previous studies that had previously revealed the possibility of using vertebrate biomarkers in invertebrates (Hsieh & Hsu, 2011; Park et al., 2011; Schumpert et al., 2015). By testing a set of different physiological biomarkers of vertebrate senescence, often studied independently, our study supports both ideas that routinely used biomarkers in vertebrates can be adapted in invertebrates and that the senescence process is quasi-ubiquitous in the living world and can be expressed in a similar way in very different organisms.



**Figure 3.** Relative expression level of TERT expression in nerve cords (A) and in gonads (B) in *Armadillium vulgare* (F, females; M, males). Expression of each gene was normalized based on the expression of ribosomal protein L8 (Rpl8) and elongation factor 2 (Ef2) as reference genes. The thick line represents the median, the box the interquartile range, and the whisker the most extreme data point within 1.5 the interquartile range. N = 176 individuals: 28 four-month-old females, 28 four-month-old males, 20 one-year-old females, 20 one-year-old males, 20 two-year-old females, 20 two-year-old males, 20 three-year-old females, 20 three-year-old males; #, P < 0.10; \*\*, P < 0.01.

ARMADILLIDIUM VULGARE AS A MODEL FOR CELLULAR SENESCENCE

Previous studies have shown that the probabilities to survive decrease with increasing age in *A. vulgare* (Paris & Pitelka, 1962). The cellular damages accumulated during the life of the isopod could be the cause of cell senescence and therefore the driving force behind actuarial senescence (Harman, 1956; Barja, 2000; Barja & Herrero, 2000; Finkel & Holbrook, 2000). In *A. vulgare* the 2- and 3-year-old individuals could have therefore accumulated more cellular damages during their lifetime, leading to the cellular senescence we report.

Our study also revealed a strong difference between sexes on the response of biomarkers to age changes. At a given age, females display higher  $\beta$ -galactosidase activity and lower immune cell viability than males, as if they age faster than males. Between-sex differences in lifespan have been reported in *A. vulgare* with a longer lifespan in males than in females (Geiser, 1934; Paris & Pitelka, 1962). Exact differences in actuarial senescence patterns (i.e., age-specific changes in survival probabilities) remain to be quantified in *A. vulgare* but such differences are quite common both in vertebrates and invertebrates (Tidière et al., 2015; Marais et al., 2018). One of the main hypotheses proposed to explain sex differences in longevity or senescence patterns relies on different resource allocation strategies between sexes (Vinogradov, 1998; Bonduriansky et al., 2008). In woodlouse, females carry their of spring in their marsupium for one month, giving nutrients and protection, thus they allocate more energy to reproduction than males that do not provide any parental care. The fact that the lifespan of *A. vulgare* is shorter in females (Paris & Pitelka, 1962) thus supports a role of differential sex allocation in this species. Moreover, the difference between males and females in TERT expression in gonads also suggest a difference in sex allocation according to both age and sex. The increased in TERT expression in male gonad in two-years-old individuals should be the result of a terminal investment in reproduction for males; by increasing their TERT expression and thus potentially their telomerase activity they should provide a better fitness to their of spring. This allocation may be lost when males are too old (three-year old).

Sex differences in resource allocation strategies could also be driven by environmental conditions (Shertzer & Ellner, 2002). Our physiological biomarkers of vertebrate senescence revealed sex differences, and as supported in Depoux et al. (2019), they could constitute useful tools to identify other factors involved in variations in senescence patterns, such as environmental stressors. Moreover, if these biomarkers seem to predict better the physiological age than chronological age, notably in terms of survival and reproduction, they could correspond to biomarkers of senescence in the woodlouse (Baker & Sprott, 1988; Simm et al., 2008; Sprott, 2010).

The physiological biomarkers of vertebrate senescence thus respond to age changes in *A. vulgare*, a species that represents a new invertebrate model of ageing. The parameters that predict the chronological age of *A. vulgare* individuals might be reliable biomarkers, especially if their measurements are related to both reproductive and survival prospects more than to the chronological age of individuals. The availability of its genome, the ease of its breeding, its particularity to continue growing during its lifespan, and its adaptations to terrestrial life as well as the presence of cellular senescence on our senescence biomarkers make it a promising candidate to study senescence.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available at *Journal of Crustacean Biology* online.

S1. Phylogenetic analysis protocol of the TERT gene in crustaceans.

S2. TERT-gene alignment used for the phylogenetic analysis.

S3. TERT-gene tree following the phylogenetic relationships between the species involved.

S4. TERT-gene tree following the phylogenetic relationships between the species involved (Newick format).

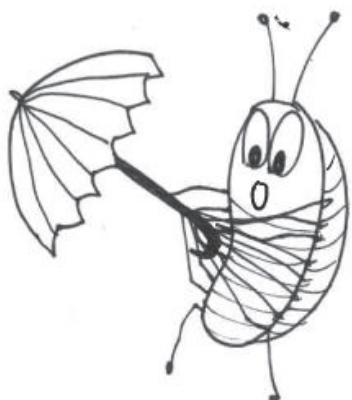
ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Sylvine Durand, Richard Cordaux, Isabelle Giraud, and Bouziane Moumen for our constructive discussions as well as Marius Bredon, Carine Delaunay, Maryline Raimond, and Alexandra Lafitte for technical assistance. The preprint of this work has been deposited in BioRxiv (<https://doi.org/10.1101/583914>). This work was supported by the 2015–2020 State-Region Planning Contract and European Regional Development Fund and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the University of Poitiers. JFL and JMG were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE32-0002-01 to JFL). Our research also received funding from the *Appel à projets de recherche collaborative inter-équipes 2016–2017* by the Ecologie et Biologie des Interactions laboratory. ASL is supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE13-00001-01 Amocyst). The authors declare that there was no conflict of interest in the writing of this manuscript.

REFERENCES

- Baker, G.T. & Sprott, R.L. 1988. Biomarkers of aging. *Experimental Gerontology*, **23**: 223–239.
- Barja, G. 2000. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging*, **12**: 342–355.
- Barja, G. & Herrero, A. 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB Journal*, **14**: 312–318.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*, **67**: 1–48.
- Bernardez de Jesus, B. & Blasco, M.A. 2012. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circulation Research*, **111**: 97–109.
- Bonduriansky, R., Maldakov, A., Zajitschek, F. & Brooks, R. 2008. Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional Ecology*, **22**: 443–453.
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **8**: 729 [doi: 10.1038/nrm2233].
- Cao, Y., Li, H., Deb, S. & Liu, J.-P. 2002. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*, **21**: 3130–3138.
- Chebbi, M.A., Becking, T., Moumen, B., Giraud, I., Gilbert, C., Peccoud, J. & Cordaux, R. 2019. The genome of *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda) provides insights into sex chromosome evolution in the context of cytoplasmic sex determination. *Molecular Biology and Evolution*, **36**: 727–741.
- Chevalier, F., Herbinière-Gaboreau, J., Bertiaux, J., Raimond, M., Morel, F., Bouchon, D., Grève, P. & Braquart-Varnier, C. 2011. The immune cellular effectors of terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Meeting with their invaders. *Wobadolia. PLoS ONE*, **6**: e18531 [doi: 10.1371/journal.pone.0018531].
- Cheyne, L., Lemaître, J.-F., Gaillard, J.-M., Rey, B., Bourgois, G., Ferté, H., Jégo, M., Débais, F., Pellerin, M., Jacob, L. & Gilot-Fromont, E. 2017. Immunosenescence patterns differ between populations but not between sexes in a long-lived mammal. *Scientific Reports*, **7**: 13700 [doi: 10.1038/s41598-017-13686-5].
- Chiu, C.-P. & Harley, C.B. 1997. Replicative senescence and cell immortality: The role of telomeres and telomerase. *Experimental Biology and Medicine*, **214**: 99–106.
- Depoux, C., Samba-Louaka, A., Braquart-Varnier, C., Moreau, J., Lemaître, J.-F., Laverre, T., Pauhlac, H., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Gaillard, J.-M. & Beltran-Bedh, S. 2019. Impact of temperature and photoperiod impact on survival and biomarkers of senescence in common woodlouse. *bioRxiv* [doi: 10.1101/433011].
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I. & Pereira-Smith, O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging

- skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**: 9363–9367.
- Finkel, T. & Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, **408**: 239–247.
- Gary, R.K. & Kindell, S.M. 2005. Quantitative assay of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical Biochemistry*, **343**: 329–334.
- Geiser, S.W. 1934. Further observations on the sex-ratios of terrestrial isopods. *Field and Lab.*, **3**: 7–10.
- Gomes, N.M.V., Shay, J.W. & Wright, W.E. 2010. Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters*, **584**: 3741–3751.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, **11**: 298–300.
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J.M. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science*, **311**: 1257.
- Hsieh, Y.-S. & Hsu, C.-Y. 2011. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Experimental Gerontology*, **46**: 233–240.
- Iitahara, K., Campisi, J. & Dimri, G.P. 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay. *Biological Aging Methods and Protocols*, **2007**: 21–31.
- Ives, A.R. 2015. For testing the significance of regression coefficients, go ahead and log-transform count data. *Methods in Ecology and Evolution*, **6**: 828–835.
- Kirkwood, T.B. 1977. Evolution of ageing. *Nature*, **270**: 301–304.
- Latreille, P.A. 1804. *Histoire naturelle générale et particulière des Crustacés et des Insectes*. F. Dufart, Paris.
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von & Passos, J.F. 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Experimental Gerontology*, **45**: 772–778.
- Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., et al. 2007. Telomere lengthening early in development. *Nature Cell Biology*, **9**: 1436–1441.
- Maria, G.A.B., Gaillard, J.-M., Vieira, C., Plotton, I., Sanlaville, D., Gueyfier, F., Wu, C., Czerwinski, E., Sandler, L., Seyfang, A., Blasco, M.A. & Keefe, D.L. 2018. Sex gap in aging and longevity: can sex chromosomes play a role? *Biology of Sex Differences*, **9**: 1436–1441.
- Morgan, G. 2013. Telomerase regulation and the intimate relationship with aging. *Research and Reports in Biochemistry*, **2013**: 71–78.
- Paris, O.H. & Pitelka, F.A. 1962. Population characteristics of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology*, **43**: 229–248.
- Park, Y., Kim, Y. & Stanley, D. 2011. Cellular immunosenescence in adult male crickets, *Gryllus assimilis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **76**: 185–194.
- Podlevsky, J.D., Bley, C.J., Omana, R.V., Qi, X. & Chen, J.J.-L. 2007. The telomerase database. *Nucleic Acids Research*, **36**: D339–D343.
- Pohlert, T. 2014. The pairwise multiple comparison of mean ranks package (PMCMR). *R package*[<http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>].
- R. Core Team. 2018. *R: A language and environment for statistical computing*. Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ram, J.L. & Costa, A.J. 2018. Invertebrates as model organisms for research on aging biology. In: *Conn's handbook of models for human aging* (J. Ram & P.M. Conn, eds.), pp. 445–452. Academic Press, London.
- Robertson, H.M. & Gordon, K.H.J. 2006. Canonical TTAGG-repeat telomeres and telomerase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research*, **16**: 1345–1351.
- Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E. & Bachere, E. 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, **108**: 1043–1050.
- Schumpert, C., Nelson, J., Kim, E., Dudycha, J.L. & Patel, R.C. 2015. Telomerase activity and telomere length in *Daphnia*. *PLoS ONE*, **10**: e0127196 [doi: 10.1371/journal.pone.0127196].
- Shay, J.W. & Wright, W.E. 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, **26**: 867–874.
- Shertzer, K.W. & Ellner, S.P. 2002. State-dependent energy allocation in variable environments: life history evolution of a rotifer. *Ecology*, **83**: 2181–2193.
- Sicard, M., Chevalier, F., Vlechouwer, M.D., Bouchon, D., Grève, P. & Braquart-Varnier, C. 2010. Variations of immune parameters in terrestrial isopods: a matter of gender, aging and *Wld*<sup>sh</sup>. *Naturwissenschaften*, **97**: 819–826.
- Simm, A., Nass, N., Bartling, B., Hofmann, B., Silber, R.-E. & Navarrete Santos, A. 2008. Potential biomarkers of ageing. *Biochemical Chemistry*, **389**: 257–265.
- Sprott, R.L. 2010. Biomarkers of aging and disease: Introduction and definitions. *Experimental Gerontology*, **45**: 2–4.
- Stanley, D. 2012. Aging and immunosenescence in invertebrates. *Invertebrate Survival Journal*, **9**: 102–109.
- Steel, C.G.H. 1980. Mechanisms of coordination between moulting and reproduction in terrestrial isopod crustacea. *Biological Bulletin*, **159**: 206–218.
- Tidière, M., Gaillard, J.-M., Müller, D.W.H., Lackey, L.B., Giménez, O., Claus, M. & Lemaitre, J.F. 2015. Does sexual selection shape sex differences in longevity and senescence patterns across vertebrates? A review and new insights from captive ruminants. *Evolution*, **69**: 3123–3140.
- Vinogradov, A.E. 1998. Male reproductive strategy and decreased longevity. *Acta Biotheretica*, **46**: 157–160.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C. & von Zglinicki, T. 2009. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell*, **8**: 311–323.



Chapitre IV : Impact de  
l'environnement sur les  
patrons de sénescence  
chez *A. vulgare*

---

## I. Introduction

Comprendre le fonctionnement de la sénescence est un vrai challenge en biogérontologie (Shefferson et al. 2017). En effet, en plus de la grande diversité de patrons de sénescence observés entre les espèces dans le monde vivant, il semblerait qu'entre les populations d'une même espèce, des patrons de sénescence très différents puissent être mis en évidence (Tidière et al. 2016 ; Hassall et al. 2017). Les causes proximales de la sénescence, qu'elles concernent la régulation des gènes ou l'adoption de différentes stratégies d'allocation aux ressources, sont modulées par l'environnement dans lequel vivent les individus.

Ainsi, pour mieux comprendre ce processus, il semble indispensable de développer des connaissances sur l'effet de l'environnement sur les patrons de sénescence. Cette mission n'est pourtant pas si simple. En effet, lorsque les populations sont étudiées dans leur milieu naturel, de nombreux facteurs de stress, biotiques comme abiotiques, peuvent entraîner des réponses physiologiques très différentes, et surtout peuvent interagir entre eux. Ainsi, lorsque la température augmente, le taux d'humidité peut diminuer. Il est donc impossible de délier ces deux pressions abiotiques et de savoir quelle est la variable responsable de la modification du patron de sénescence observé. Ainsi pour mieux comprendre comment les stress environnementaux, de façon indépendante, impactent les populations, il est important de réaliser des études en laboratoire, dans des environnements qu'il est possible de contrôler. Par une approche expérimentale, une seule variable « stress » peut être testée à la fois et c'est l'effet de cette variable qui est mesuré sur les patrons de sénescence. Il est aussi important de prendre en compte l'effet du sexe. En effet, selon le sexe, les stratégies d'allocation aux ressources vont être différentes. Par exemple, chez les mammifères, la présence de certaines espèces pathogènes dans un milieu peut entraîner des réponses immunitaires différentes entre les sexes, et de ce fait accentuer la différence entre les durées de vies des mâles et des femelles (Tidière et al. 2020).

Les invertébrés sont des modèles très intéressants pour étudier l'effet de l'environnement sur la diversification des patrons de sénescence (Archer and Hunt 2015 ; Ram and Costa 2018). En effet, ce sont des organismes ectothermes qui subissent

particulièrement les variations environnementales, comme la température, la photopériode, le degré d'humidité ou encore la disponibilité en ressources dans son milieu. D'ailleurs, certaines études ont déjà mis en évidence l'effet de ces variables sur les traits d'histoire de vie ([Tableau 4](#)). De plus, il est plus facile, de par leur petite taille et leur temps de génération, généralement plus court, de les maintenir dans des conditions d'élevage contrôlées.

Le cloporte est un modèle particulièrement intéressant pour étudier l'effet de l'environnement sur les patrons de sénescence. En effet, de par son adaptation à la vie terrestre, ce petit crustacé a dû développer des modifications morphologiques et comportementales (Smigel and Gibbs 2008) qui font de lui un organisme très sensible aux conditions environnementales (Mocquard et al. 1989 ; Smigel and Gibbs 2008 ; Hassall et al. 2017). Dans le contexte actuel de réchauffement climatique, étudier l'effet de l'environnement sur la sénescence des organismes, permet, au-delà d'apporter des informations sur le mécanisme de la sénescence, d'obtenir des informations sur le devenir des populations dans un futur proche où les conditions environnementales sont amenées à changer. Dans ce contexte, le cloporte est d'autant plus intéressant à étudier, puisque c'est un détritivore, témoin de la qualité de son environnement et occupant une place importante dans la chaîne alimentaire (Souty-Grosset et al. 2005).

[Tableau 4 : Exemple des effets de variables environnementales sur les traits d'histoire de vie des invertébrés](#)

Stress abiotiques	Condition contrôle	Conditions de stress	Effet des stress	Références
Température	Température optimale	Basses températures	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Augmente la survie</li> <li>▪ Diminue la fécondité</li> </ul>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Marshall and Sinclair 2010); <i>Daphnia magna</i> (Korpelainen 1986)
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Augmente la résistance aux basses températures et températures létale</li> </ul>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Le Bourg 2007)
	Températures élevées		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminue la survie</li> <li>▪ Diminue la croissance</li> </ul>	<i>Perna canaliculus</i> (Petes et al. 2007);

CHAPITRE IV : IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES PATRONS DE SENESCENCE  
CHEZ A. VULGARE

---

				<i>Drosophila melanogaster</i> (Hercus et al. 2010); <i>Daphnia magna</i> (Korpelainen 1986)
			▪ Diminue la reproduction	<i>Oniscus asellus</i> (McQueen and Steel 1980)
Photopériode	Photopériode optimale	Augmentation de la durée de jour	▪ Diminue la survie et le succès reproducteur des mâles	<i>Daphnia magna</i> (Korpelainen 1986)
			▪ Période de reproduction anticipée	<i>Oniscus asellus</i> (McQueen and Steel 1980)
Humidité	Humidité optimale	Sécheresse	▪ Diminue la survie et la reproduction des mâles	<i>Daphnia magna</i> (Korpelainen 1986)
			▪ Diminue la survie des descendants ▪ Diminue la fécondité	<i>Cicindela albissima</i> (Knisley et al., 2018)
Ressources alimentaires	<i>ad libitum</i>	Ressources restreintes	▪ Diminue la mobilité	<i>Procellio scaber</i> (Gunn 1936)
			▪ Augmente la survie	<i>Frontinella pyramitela</i> (Austad 1993); <i>Caenorhabditis elegans</i> (Lee et al. 2006a); <i>Aedes aegypti</i> (Joy et al. 2010); <i>Daphnia pulex</i> (Latta et al. 2011)
			▪ Réduit la fécondité totale	<i>Frontinella pyramitela</i> (Austad 1993), <i>Aedes aegypti</i> (Joy et al. 2010)

Ces informations dans la littérature nous ont permis de cibler les stress pouvant affecter les patrons de sénescence. Ainsi, et dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de tester les stress abiotiques liés à la température, à la photopériode et à la carence alimentaire

## II. Impact de la température : Article scientifique en préparation « High temperature effect on actuarial, reproductive, and cellular senescence in the common woodlouse. »

### II.1. Introduction

La température est une variable particulièrement intéressante à étudier chez le cloporte. En effet, au-delà de conditionner l'entrée en reproduction des femelles, la température va être un paramètre déterminant dans la physiologie, le comportement et la distribution de ces organismes (Paris 1963 ; Hassall et al. 2017).

Lors d'une première étude réalisée en 2017 sur l'effet de la température et de la photopériode sur les patrons de sénescence du cloporte, nous avons testé l'effet (1) de 2 températures de stress (10°C et 28°C), comparé à la température « optimale » de 20°C (température de l'élevage) et (2) d'une photopériode stimulante, comparée à la photopériode de Poitiers (46° 35' N, 0° 20' E de janvier à février ; photopériode dans laquelle les animaux sont maintenus dans notre élevage). A la fin de cette expérience, nous avons trouvé des patrons de sénescence inattendus sur l'effet des stress de température, probablement liés aux fortes fluctuations d'humidité observées dans les anciennes enceintes climatiques alors utilisées pour ce stress de température (qui ne garantissaient pas une stabilité de l'humidité, surtout pour le stress à 28°C).

Les résultats ont été déposés en ligne (Annexe 1) afin de partager l'effet de stress environnementaux sur les biomarqueurs utilisés et nous laisser le temps de réitérer la manipulation concernant la température dans des conditions d'hygrométrie contrôlées puisque que le laboratoire a acquis entre temps de nouvelles enceintes climatiques garantissant le maintien de l'humidité même à forte température (28°C), stress finalement retenu pour la nouvelle expérience (cf. II.1). En effet, cette température est stressante pour les animaux mais pas forcément létale.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu co-encadrer Angèle Branger, étudiante en première année de Master BEE à l'Université de Poitiers. Son stage, d'une durée de 2 mois, réalisé lors de la crise sanitaire de la COVID-19 (donc exclusivement en télétravail), a consisté en l'exploitation des données obtenues lors de l'expérience sur l'effet de la température sur la sénescence du cloporte et la co-écriture du papier scientifique.

## II.2. Présentation de l'étude sur l'effet du stress « haute température » sur la sénescence (en contrôlant l'humidité)

Afin de ne tester que l'effet de haute température sur la sénescence chez le cloporte, nous réalisons l'étude suivante (Figure 33) : nous constituons deux groupes de cloportes âgés de 7 mois : le groupe témoin est placé à 20°C tandis que le groupe expérimental est placé à 28°C et ce durant deux mois.

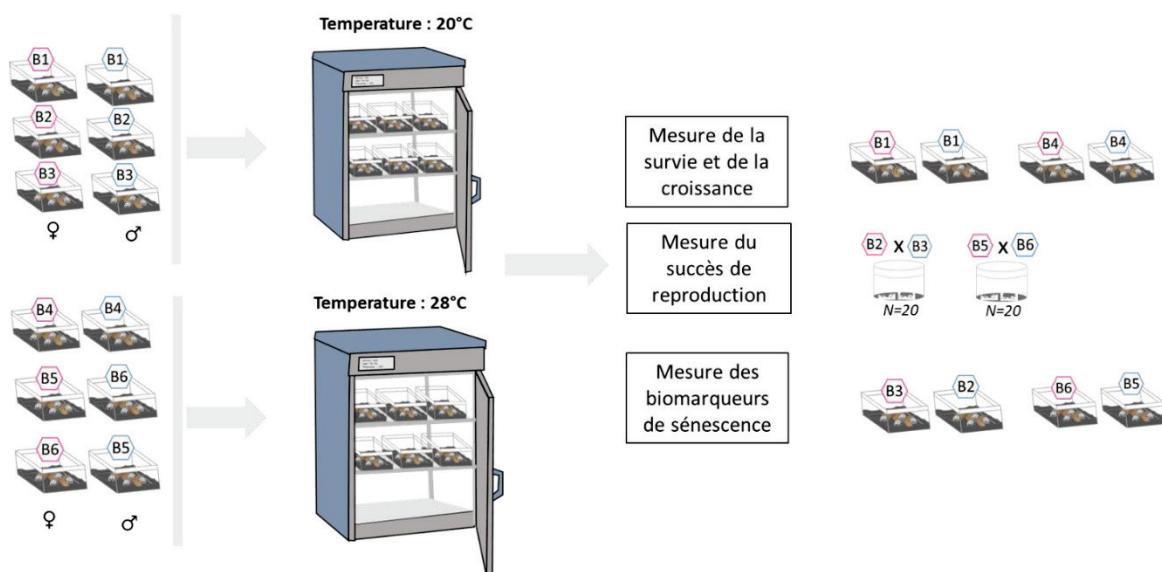


Figure 33 : Design expérimental de l'expérience "effet de la température"

Afin de reproduire les mêmes conditions environnementales en termes de photopériode et de taux d'humidité, nous utilisons les enceintes climatiques programmables nouvellement acquises au laboratoire. Après deux mois dans ces conditions expérimentales, une partie des animaux est sacrifiée pour mesurer et comparer les biomarqueurs de sénescence entre les deux groupes (stressé ou non), une autre partie est utilisée pour mesurer et comparer les paramètres de reproduction, et une dernière

partie pour mesurer et comparer la survie. Nous pouvons ainsi mettre en évidence un effet de la température élevée sur les marqueurs de sénescence, la reproduction, la croissance et la survie (uniquement chez les mâles) (cf. article en préparation suivant).

### **II.3. Article scientifique en préparation**

## High temperature effect on actuarial, reproductive, and cellular senescence in the common woodlouse.

Charlotte DEPEUX<sup>1, 2,\*</sup>, Angèle BRANGER<sup>\*</sup>, Jean-François LEMAÎTRE<sup>2</sup>, Jérôme MOREAU<sup>3,4</sup>, François-Xavier DECHAUME-MONCHARMONT<sup>5</sup>, Tiffany LAVERRE<sup>1</sup>, Hélène PAUHLAC<sup>1</sup>, Jean-Michel GAILLARD<sup>2</sup>, Sophie BELTRAN-BECH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

<sup>2</sup> Université Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR CNRS 558, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

<sup>3</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, 6 Boulevard, Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>4</sup> Centre d'Études Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-bois, France

<sup>5</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, ENTPE, UMR 5023 LEHNA, F-69622, Villeurbanne, France

\* Co first authors

Corresponding author: charlotte.depeux@gmail.fr

### ABSTRACT

Senescence is defined as a decrease in survival and reproductive performances associated with age. This phenomenon is quasi ubiquitous in the living world but can be expressed through different patterns. According to the life history theory, the variability in senescence patterns can be the result of different trade-offs driven by environment. One of the most important stress in invertebrates, ectotherms organism, is the temperature variations. In this study, we observed the effect of an increase of temperature (20°C to 28°C) on actuarial, reproductive and cellular senescence in the common woudlouse *Armadillidium vulgare*. We observed that an increase of temperature led a response to

senescence biomarkers with a decrease in immune cell density and cell size and, an increase in  $\beta$ -galactosidase activity. The increase in temperature also affected the decrease in the growth, reproduction and male's survival. By this study, we showed that an increase in temperature drives sex-specific senescence patterns in *A. vulgare*.

**Keywords:** *Armadillidium vulgare*, environmental impact, cellular senescence, actuarial senescence, reproductive senescence, evolution, trade-offs, invertebrates

## Introduction

Senescence is defined as a decrease in the probability of survival and reproductive success on with age (Carranza et al., 2004 ; Flatt and Schmidt, 2009 ; Jones et al., 2013 ; Nussey et al., 2013). This phenomenon is quasi ubiquitous in the living world but can be expressed through very different pathways. Thus, the senescence patterns could differ between species, according to their life histories: fast such as *Daphnia longispina*, and slow such as *Fulmarus* (Jones et al., 2014). It could also differ between populations, as in *Melanoplus grasshoppers*, where those at higher altitudes have a faster senescence than those at lower altitudes (Tatar et al., 1997). The genre could also lead to different senescence patterns. For example, in polygynous species, including many insects and mammals, males tend to have faster senescence than females (Nussey et al., 2013). An lastly, senescence patterns could also differ between individuals, as in different castes of *Apis mellifera* (Finch, 1991 ; Münch et al., 2013). The causes of such diversity are the key to understand the phenomenon of senescence, its origin and its maintenance in the course of evolution. According to the life history theory (Cody, 1966 ; Stearns, 1992), the variability in patterns of senescence can be the result of different trade-offs. As presented by the disposable soma theory, senescence could be the result of an energy compromise between somatic maintenance and reproduction (Kirkwood, 1977 ; Lemaître et al., 2015). An individual, which has privileged reproduction in early life at the expense of somatic maintenance, will senesce more rapidly (Lemaître et al. 2015). The resource allocation choices governing these trade-offs are impacted by the environment (Nussey et al., 2013; Boggs, 2019). In this context, the diversity of patterns of senescence are linked to different stress affecting individuals during their life (Boggs, 2019).

Among the diversity of biotic and abiotic stress, the dehydration, salinity, toxic compounds (heavy metals) and extreme temperatures (Roelofs et al., 2008) are known to influence the organism lifespan. For example, in *Drosophila*, senescence is accelerated by desiccation (Sinclair et al., 2007) when in *Chironomus riparius*, mortality increases in the presence of cadmium (Postma et al., 1995). The temperature is a major abiotic stress for organism and its study is particularly relevant in the current context of global warming (6°C rise in temperature is expected in 2100) (Seguin and Soussana, 2006). Invertebrates are ectotherms and therefore particularly sensitive to temperature changes. For example, In Hymenoptera and Lepidoptera, survival decreases with increasing temperature (Abou-Shaara et al., 2012; Khadioli et al., 2014). In Lepidoptera, too high or too low temperature prevents hatching, suggesting that there must be an optimal temperature for hatching (Khadioli et al., 2014). In Decapoda, egg size decreases with increasing temperature (Thatje and Hall, 2016). In some Diptera, AGE pigments (cellular markers of senescence) have been shown to accelerate senescence with increasing temperature (Kelly et al., 2013). In short-lived fish *Nothobranchius furzeri*, the activity of the  $\beta$ -galactosidase (cellular biomarkers of senescence) is higher in warm temperature (Valenzano et al., 2006). Major part of the studies on the impact of temperature on individuals are based on molecular markers (rarely of senescence) or on some traits of life. In this context, whether temperature is expected to affect senescence, an integrative experimental study lacks to better understand its effect on senescence both at the molecular and at the demographic points of view.

Among invertebrates, the common woodlice *Armadillidium vulgare* is the only terrestrial crustacean. During course of its evolutionary history, this organism had to adapt to terrestrial life but still very sensitive to changes in moisture and temperature (Hassall et al., 2018). Indeed, it has been previously shown that temperature has an influence on their distribution, behaviour and mortality (Hassall et al., 2018 ; Paris, 1963). The common woodlice is able to live up to three years (Paris and Pitelka, 1962) and produce large litters, that therefore allows to have many animals in a breeding, ideal parameter for experimentation. Its short lifespan, its ease to control and monitor, its sensitivity to temperature as well as the availability of senescence cellular biomarkers (Depeux et al., 2019) make it a good experimental model for studying the role of temperature in the shaping of senescence patterns. In this way we elaborated the following experimental

approach: we placed a control group at 20°C and an experimental group at 28°C for 2 months. Then we compared the cellular, reproductive and actuarial senescence of these two groups. Cellular senescence was observed from cellular biomarkers of senescence, such as immune cells (cell size, density and viability) and  $\beta$ -galactosidase activity recently published (Depeux et al., 2020). Actuarial senescence was measured throughout the thermal stress, based on the number of deaths. We also studied the growth and finally, reproductive senescence was evaluated from the number of clutches. We can make the hypothesis that a rise in temperature will have a negative effect on demographic and cellular senescence. This could suggest that *A. vulgare* can adapt with a new compromise in energy allocation, as predicted by the disposable soma theory.

## Materials & Methods

### *Biological Material*

All individuals of *A. vulgare* used in this study were kept under the same rearing conditions from birth to the beginning of the experiment: natural photoperiod of Poitiers, temperature of 20°C and food (dried lime leaves and carrots) provided ad libitum. To guarantee the virginity of the individuals, we separated the sisters and brothers of each clutch (identified by a unique name and number) into two separate boxes.

### *Design*

The study started in September; individuals were all 7 months old and came from 15 different clutches.

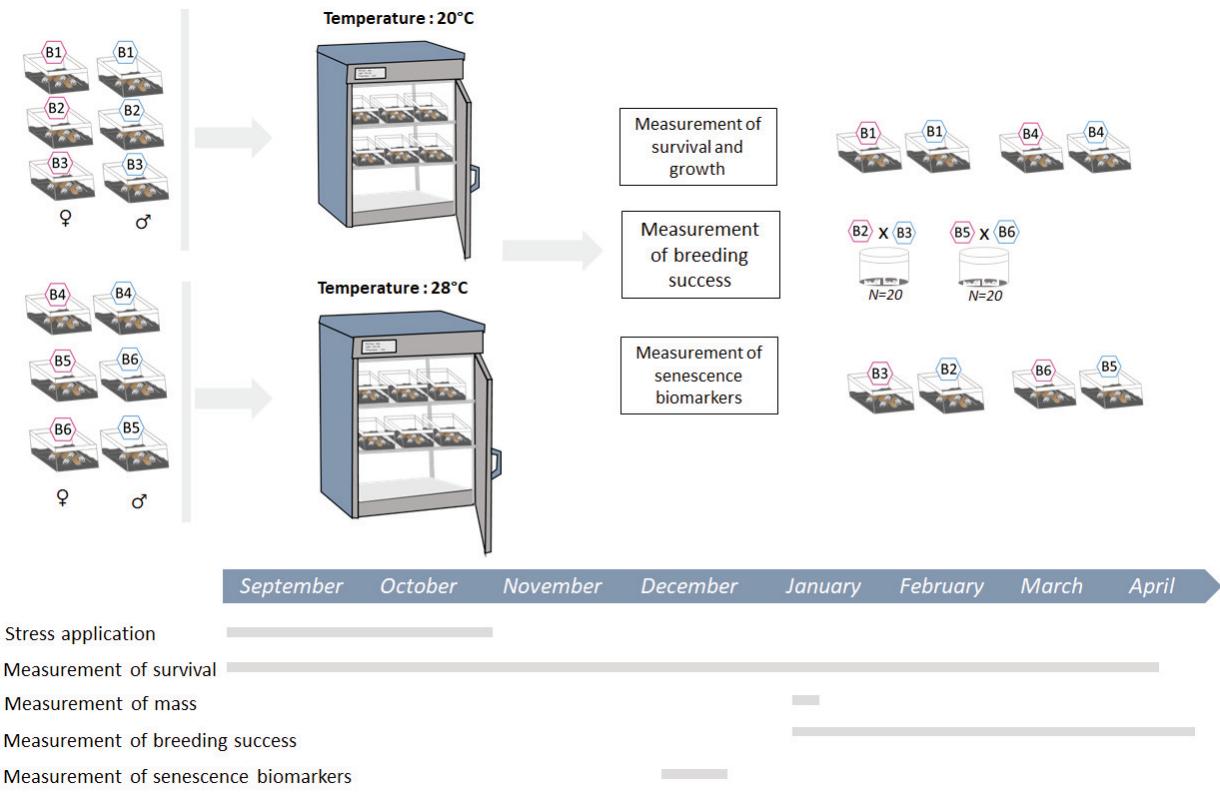
The experiment consists of two groups: a control group and an experimental group. Each group consists of 3 boxes of 30 females and 3 boxes of 30 males from 15 different litters. One box will be devoted to monitoring survival from the beginning to the end of the experiment, another will test cell senescence with senescence biomarkers and the last will evaluate reproductive success. The experiment is in two phases: the application of temperature stress and the evaluation of this stress on cellular, survival and reproductive parameters.

The application of the temperature stress lasted two months and consisted of placing the control group in a 12:12 (L/D) photoperiod study with a humidity of 85% and a temperature of 20°C and the experimental group in a 12:12 (L/D) photoperiod study with a humidity of 85% and a temperature of 28°C. The temperature stress was applied to the control group for two months. Both groups were fed ad libitum.

At the end of the application of temperature stress, 1 box of males and 1 box of females were taken from each group (i.e. control and experimental) and allowed testing the effect of temperature on senescence biomarkers.

Two months after the end of the temperature stress, 1 box of males and 1 box of females were collected from each group to test the reproductive success of the individuals. Thus we formed 20 breeding pairs composed of one male and one female exposed for two months at 20°C (i.e. control group) and 20 breeding pairs composed of one male and one female exposed for two months at 28°C (i.e. experimental group). Each breeding pair was placed in a box (size), at 20°C, with food ad libitum and in a photoperiod of 16:8 (L/D), allowing the stimulation of reproduction (McQueen and Steel 1980). They were maintained in this way for 5 months, during which time each clutch produced was sampled. At the end of this period, the number of clutches produced by the 20 couples was used to evaluate the effect of temperature on reproductive success.

Throughout the stress application, 1 box of males and 1 box of females allowed to study the weight and survival of the individuals every 15 days for another 2 months.



**Figure 1: Global experimental protocol (B=box)**

We composed 12 boxes (B: Box) have in the following way: different clutches were used to compose the boxes, with B1-B4, B2-B5 and B3-B6 composed of brothers and sisters in the same number. In order to test the survival, boxes B1 and B4 were used. To test reproduction, boxes B2 females and B3 males as well as boxes B5 females and B6 males were used. Biomarkers were studied on animals from boxes B3 and B6 females and B2 and B5 males. The boxes from B1 to B3 have been tested at 20°C and the boxes from B4 to B6 have been tested at 28°C.

### Biomarkers

To test the effect of temperature on the cellular senescence we used biomarkers of senescence developed in Depeux et al., 2020.

### Immune cells parameters

Firstly, we tested the impact of temperature in the profile of immune cells. In this way we collected 3 $\mu$ L of haemolymph per individuals and deposited it in 15 $\mu$ L of MAS-EDTA ((EDTA 9 mM, Trisodium citrate 27 mM, NaCl 336 mM, Glucose 115 mM, pH 7, (Rodriguez et al. 1995) We then added 6 $\mu$ L of Trypan Blue at 0.4% (Invitrogen) to discriminate alive and

dead cells. After, 10 $\mu$ L of this solution was deposited in Invitrogen Coutness® counting slide and put in an automated Cell Counter (Invitrogen) to estimate the cell density, viability as well as the cell size.

#### *Beta-galactosidase activity*

After having collected haemolymph for the immune parameters sitdu, and in the way to test the impact of temperature on the Beta-galactosidase activity, we dissected and removed the nerve cord of each individual. We put individually nerve cords in 300 $\mu$ L of Lyse Buffer 1X (CHAPS 5 mM, Citric acid 40 mM, Sodium Phosphate 40 mM, Benzamidine 0.5 mM, PMSF 0.25 mM, pH = 6) (Gary and Kindell, 2005). We centrifuged sample at 15 000g for 30 minutes at 4°C and then we collected and kept the supernatant at -80°C until its utilization. We determined the protein concentration thanks the BCA Assay and we homogenized all sample at the 0.1mg/mL protein concentration. Then, 100 $\mu$ L of these protein extracts were added to 100 $\mu$ L of reactive 4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside (MUG) solution. The synthesis of the fluorescent 4-methylumbelliferone (4-MU), result of the contact of MUG reactive with Beta-galactosidase, was measured using the multimode microplate reader Mithras LB940 133 HTS III, Berthold; excitation filter: 120 nm, emission filter 460 nm, for 120 minutes. We measured two technical replicates for each sample and mean to obtain the measures.

#### *Statistical analyses*

All statistical analyses were performed using the software R 3.6.2 (R Core Development Team 2019).

For all the following models, we have proceeded to a stepwise selection model, starting with the full model. Then, we ranked all nested models according to their AICc. The most parsimonious models, among the top ranked ( $\Delta$  AICc < 2), were selected (Galipaud et al. 2017, Appendix 1). Anova were conducted with the "Anova" function of the "car" package (Fox & Weisberg, 2019).

We tested the effect of temperature (20°C, 28°C) and sex on survival. The full model was a survival model with a Cox regression including temperature and sex as well as the interaction of these two variables as fixed factors. We tested the effect of temperature

(20°C, 28°C) and sex on mass. The full model was a linear model with a Gaussian distribution including temperature and sex as well as the interaction of these two variables as fixed factors. We tested the effect of temperature (20°C, 28°C) and sex on reproduction. The full model was a binomial model with a linear regression including temperature and sex as well as the interaction of these two variables as fixed factors. We tested the effect of temperature (20°C, 28°C) and sex on the density, size and viability of immune cells and  $\beta$ -galactosidase activity. The full model was a linear model with a Gaussian distribution including temperature and sex as well as the interaction of these two variables as fixed factors.

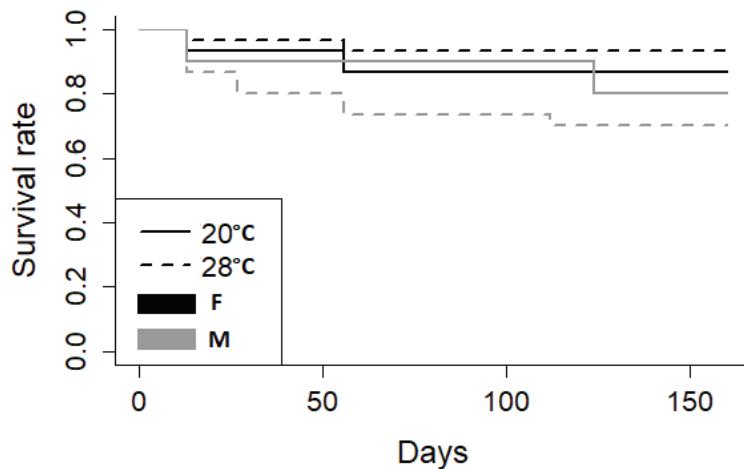
## Results

### *Models*

The temperature model has been selected for reproduction, immune cell size, immune cell density and  $\beta$ -galactosidase activity (Appendix 1). However, for survival and immune cell viability, the model that has been selected is the sex model and the intercept model, respectively (Appendix 1). And for the mass of individuals, the model has been selected is the addition of sex and temperature (Appendix 1).

### *Survival*

The temperature and the sex don't have a significant effect on survival (Respectively:  $X^2_1=0.01$ ,  $p=0.90$  ;  $X^2_1=0.63$ ,  $p=0.43$ , Figure 1). But the interaction of sex and temperature has a significant effect on survival ( $X^2_1=4.63$ ,  $p=0.03$ , Figure 1). Indeed, at 28°C, the males die the most.

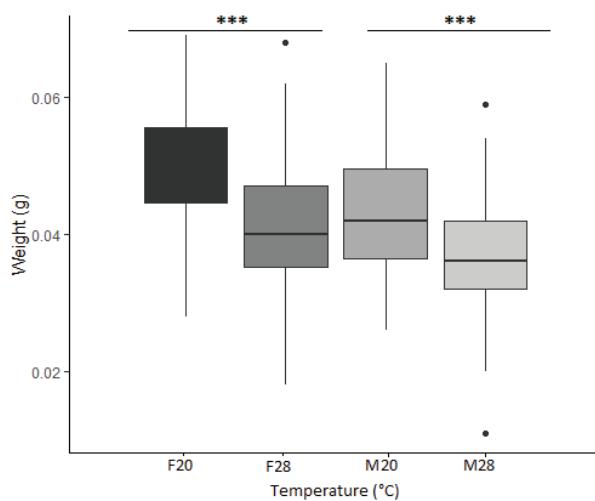


**Figure 1: Survival curve according to temperature**

N = 120 individuals (60 individuals at 20°C (30 males and 30 females); 60 individuals at 28°C (30 males and 30 females))

### Mass

The males are significantly lighter than the females (Estimate  $\pm$  sd =  $-0.0057 \pm 0.0013$ ,  $F_1=19.16$ ,  $p=1.96e-05$ , Appendix 1, Figure 2). At 28°C the individuals are lighter than at 20°C (Estimate  $\pm$  sd =  $-0.0078 \pm 0.0013$ ,  $F_1= 36.368$ ,  $p=8.05e-09$ , Appendix 1, Figure 2).



**Figure 2: The weight at 124 days according to temperature and sex (F20=females at 20°C, F28=females at 28°C, M20=males at 20°C, M28=males at 28°C)**

The thick line depicts the median, the box the interquartile range, and the whisker are bounded to the most extreme data point within 1.5 the interquartile range. The outliers outside this range are displayed as black point.

N=240 individuals: 60 females at 20°C, 60 males at 20°C, 60 females at 28°C, 60 males at 28°C. \*\*\* p < 0.001

### *Reproduction*

The reproductive success is higher at 20°C than at 28°C (Figure 3, Estimate  $\pm$  sd = 1.47  $\pm$  0.68,  $X^2_1=5.02$ , p=0.02, Appendix 1, Figure 3).

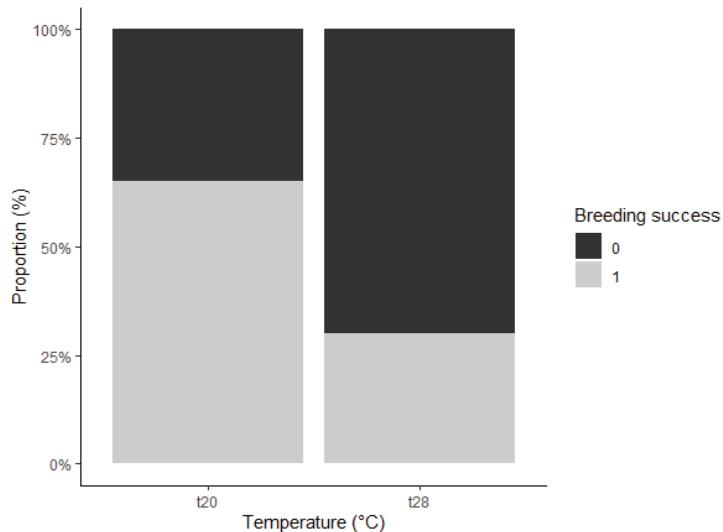


Figure 3: Effect of the temperature on the proportion of breeding success (0=failure, 1=success (i.e. production of a clutch))

N=20 breeding pairs formed from individuals maintained during two months at 20°C;  
N=20 breeding pairs formed from individuals maintained during two months at 28°C.

### *Biomarkers*

#### Immune cells parameter

The cell density is higher in individuals maintained at 20°C than in individuals maintained at 28°C (Estimate  $\pm$  sd = 2131035  $\pm$  344519,  $F_1=38.26$ , p=7.57e-08, Appendix 1, Figure 4A) as well as the cell size (Estimate  $\pm$  sd = 0.28  $\pm$  0.11,  $F_1=6.42$ , p=0.01, Appendix 1, Figure 4B). The temperature does not have a significant effect on cell viability, ( $F_1=0.92$ , p=0.34, Figure 4C).

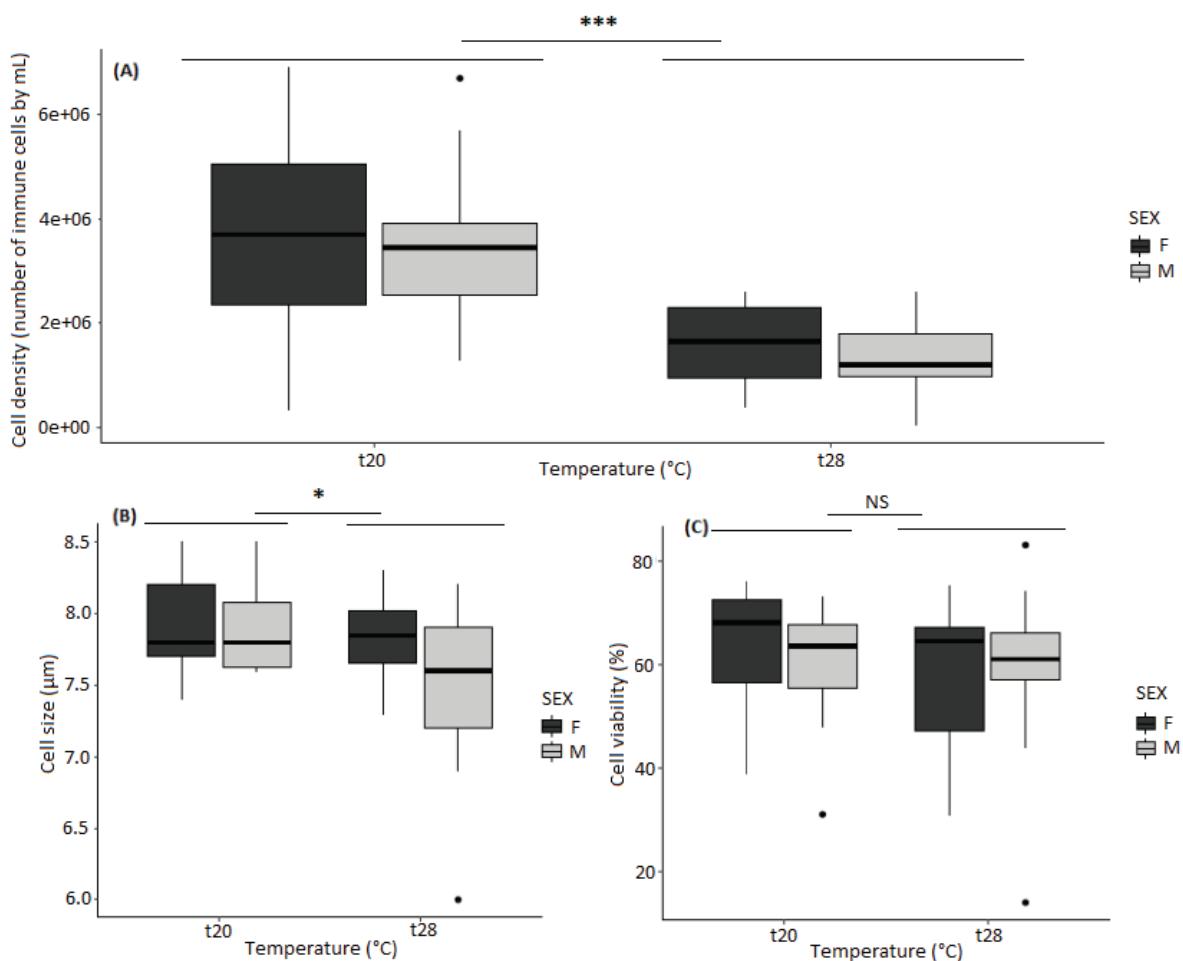


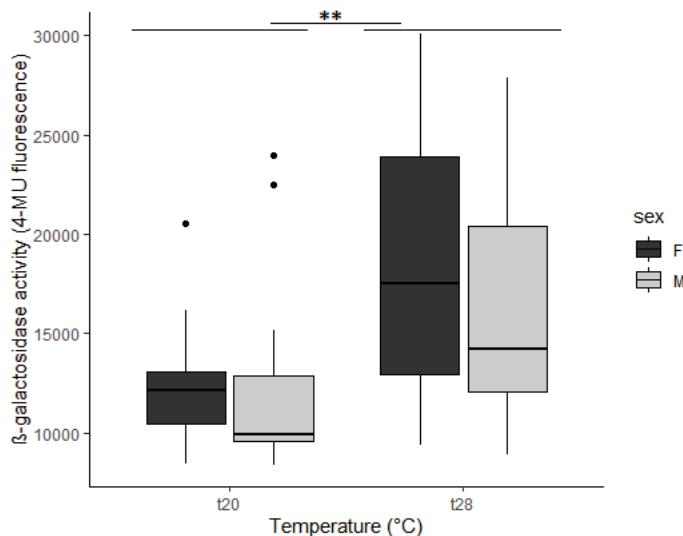
Figure 4: Effect of the temperature on cell density (A), cell size (B) and cell viability (C) by sex (F=females, M=males)

The thick line depicts the median, the box the interquartile range, and the whisker are bounded to the most extreme data point within 1.5 the interquartile range. The outliers outside this range are displayed as black point.

N=59 individuals: 13 females at 20°C, 17 males at 20°C, 12 females at 28°C, 17 males at 28°C. \*\*\* p < 0.001, \* p < 0.05, NS: no significant effect

#### Beta-galactosidase activity

The  $\beta$ -galactosidase activity is higher at 28°C than at 20°C in males and females (Estimate  $\pm$  sd =  $4598.7 \pm 1366.8$ ,  $F_1=11.32$ ,  $p=0.001$ , Appendix 1, Figure 5).



**Figure 5: Effect of the temperature on  $\beta$ -galactosidase activity by sex (F=females, M=males)**

The thick line depicts the median, the box the interquartile range, and the whisker are bounded to the most extreme data point within 1.5 the interquartile range. The outliers outside this range are displayed as black point.

N=59 individuals: 13 females at 20°C, 17 males at 20°C, 12 females at 28°C, 17 males at 28°C. \*\* p < 0.01

## Discussion

In order to understand the different patterns of senescence at demographic scale, it is important to identify the impact of environmental factors on senescence on (i) survival, (ii) growth and (iii) reproduction of individuals. Our experiments showed that (i) temperature increase alone had no significant effect on survival in *A. vulgare*, contrary to what was previously shown in others species. Indeed, in *Antestiopsis thunbergii*, *Calliphora stygia* and *Margaritifera margaritifera*, the increase of temperature reduced the survival of individuals (Abdelmutalab, 2017; Kelly et al., 2013; Hassall et al., 2017). Moreover, in our study, (ii) temperature and sex had an effect on affected mass of individuals. Growth of individuals decreases with temperature increase, as it has already been shown in three other isopods (Angilletta, 2004). One hypothesis of this decrease may be that, at higher temperatures, resources for growth are used for early reproduction (Angilletta, 2004). Even if, in our growth monitoring, the animals had not yet reproduced (which did not prevent them from investing e.g. in parturial moulting in anticipation of the reproduction period), we showed, in our experiment, that (iii) the temperature had also an effect on reproduction, reproductive success being less

important for individuals maintained at 28°C, as observed with the decline in female fecundity with increasing temperature in *Antestiopsis thunbergii* (Abdelmutalab, 2017). In *A. vulgare*, fecundity increases with the corporal mass of the individual (Durand et al., 2018; Lawlor, 1976). The lack of investment in reproduction could be explained by the size difference between females maintained at 20°C and females maintained at 28°C. As females in the stress conditions were smaller, they may have less facilities to access to reproduction. Whether we didn't observe a significant effect of temperature on survival, we observed that growth and reproduction had been impacted by temperature increase which could be the result of an energy reallocation to somatic maintenance and thus survival (Kirkwood, 1977 ; Stearns, 1989). Moreover, individuals of *A.vulgare* are able to maintain themself thanks to behaviours, such as aggregating or sheltering behaviour to resist the heat (Hassall et al., 2018) which also goes in the direction of a hypothesis of fight for somatic maintenance.

Beyond the impact of temperature increase on demographic senescence, our experiments confirmed that temperature had an effect on cellular senescence in particular by observing the biomarkers of senescence (ie. (i) Immune cells, (ii)  $\beta$ -galactosidase activity).

(i) Concerning immune cells, we expected that temperature stress decreased cell density, size and viability (Depeux et al., 2018). Indeed, the size and density of immune cells decreased with increasing temperature, as it has been already observed for haemocytes in clams *Chamelea gallina* (Monari et al., 2007). However, temperature increase had no effect on cell viability. We can assume that a decrease in the number of immune cells translates into a decrease in immune defences. It has been shown that in many invertebrates, an increase in temperature causes a decrease in the immune defences (Cheng et al., 2005; Monari et al., 2007 ; Yu et al., 2009). We might also wonder whether immune cells are bigger at 20°C and are not less viable than those at 28°C. For individuals under stress, we can suppose that the older cells have been damaged faster and therefore have been eliminated and not replaced. In *Crassostrea gigas*, an increase in temperature induces an increase in the mortality of haemocytes, which are involved in the defence mechanisms (Gagnaire et al., 2006). The fact that cells were bigger at 20°C in our study may suggest that they had less loss or more replacement. These results could indicate that temperature increase decreases the investment in immune cell

replacement. (ii) Concerning  $\beta$ -galactosidase activity, we observed that with temperature stress  $\beta$ -galactosidase activity increased, as expected. This biomarker allows us to observe the senescence of the cells (Depeux et al., 2020; Itahana et al., 2007). In our study, we can see that individuals at 28°C had more  $\beta$ -galactosidase activity and thus an higher cellular senescence than those at 20°C. This result suggests that temperature accelerates the cellular senescence of organisms. In *Calliphora stygia*, the accumulation of AGE pigments, another cellular biomarker of senescence, was faster at high temperature, showing an increase in cellular senescence (Kelly et al., 2013). Also in *Nothobranchius furzeri*, it has also been demonstrated, via  $\beta$ -galactosidase activity and lipofuscin accumulation, that a higher temperature induced an acceleration of senescence (Valenzano et al., 2006).

We also observed sex differences in mass and actuarial and cellular senescence but also at 28°C in survival. The theory that the two sexes adopt different resource allocation strategies can explain the differences in senescence patterns observed in *A. vulgare* (Bonduriansky et al., 2008; Vinogradov, 1998). Indeed, females have previously shown a better survival in stress temperature condition than males (what we observed also in the stress temperature condition of the present study), results that we didn't expect because, generally the *A. vulgare* female seems to invest more than the male (Paris and Pitelka, 1962). This may be due to different reproductive strategies. Females build up energy reserves as they invest a lot in the production and care of their young during about one month of incubation in their *marsupium* (Dangerfield and Telford, 1995) while males invest a lot in multiplying their partners (Durand et al., 2020) and therefore could neglect others functions e.g. the search for food or immunocompetence. This hypothesis is consistent with our result on growth with mass inferior in males compared to females also in terms of immunity as the size and number of immune cells were larger in females, illustrating that they had less loss of immune cells than males. With regard to  $\beta$ -galactosidase activity, we shown that even under stress-free conditions, males have a lower production of  $\beta$ -galactosidase than females, as previously published (Depeux et al., 2020). We can deduce that males naturally produce less  $\beta$ -galactosidase than females even though they were dying faster under our stressful conditions. To summary, different patterns were observed between sexes on the demographic and cellular senescence

metrics, which shows how important it is to use several markers in the same experiment in order to have an overall view and to take account the effect of sex.

Our study in *A. vulgare* confirms that the diversity of senescence patterns is the result of complex interactions between sex and environmental conditions. To study senescence, it is therefore important to consider environmental stress. Faced with environmental variations, organisms will adopt different strategies to evolve in the best possible way in their environment, which will influence their senescence. They can differ between the sexes, as can be seen in our study. According to disposable soma theory, these strategies may correspond to a change in energy allocation depending on environmental conditions (Kirkwood, 1977; Lemaître et al., 2015). It is also important to study senescence at different scales in order to be as complete as possible (Gaillard & Lemaitre, 2020). Here, we have shown in *A. vulgare* that an increase in temperature leads to a lack of investment in immune cell replacement and in individuals' growth, which negatively impacts the reproduction of individuals. An increase in temperature also induced an increase in  $\beta$ -galactosidase activity and thus an acceleration of cellular senescence, even if globally temperature did not significantly affect the survival of *A. vulgare*.

## References

- Abdelmutalab G.A.Azrag et al. 2017. « Temperature-Dependent Models of Development and Survival of an Insect Pest of African Tropical Highlands, the Coffee Antestia Bug Antestiopsis Thunbergii (Hemiptera\_ Pentatomidae) | Elsevier Enhanced Reader ». (70): 27- 36.
- Abou-Shaara, Hossam F, Ahmad A Al-Ghamdi, and Abdelsalam A Mohamed. 2012. « Tolerance of Two Honey Bee Races to Various Temperature and Relative Humidity Gradients ». : 6.
- Angilletta, M. J. 2004. « Temperature, Growth Rate, and Body Size in Ectotherms: Fitting Pieces of a Life-History Puzzle ». *Integrative and Comparative Biology* 44(6): 498- 509.
- Boggs, Carol L. 2009. « Understanding Insect Life Histories and Senescence through a Resource Allocation Lens ». *Functional Ecology* 23(1): 27- 37.

- Bonduriansky, R., A. Maklakov, F. Zajitschek, and R. Brooks. 2008. « Sexual Selection, Sexual Conflict and the Evolution of Ageing and Life Span ». *Functional Ecology* 22(3): 443- 53.
- Carranza, Juan et al. 2004. « Disposable-Soma Senescence Mediated by Sexual Selection in an Ungulate ». *Nature* 432(7014): 215- 18.
- Cheng, Winton, Long-Uong Wang, and Jiann-Chu Chen. 2005. « Effect of Water Temperature on the Immune Response of White Shrimp *Litopenaeus Vannamei* to *Vibrio Alginolyticus* ». *Aquaculture* 250(3): 592- 601.
- Cody, Martin L. 1966. « A General Theory of Clutch Size ». *Evolution* 20(2): 174- 84.
- Dangerfield, J. Mark, and S. R. Telford. 1995. « Tactics of Reproduction and Reproductive Allocation in Four Species of Woodlice from Southern Africa ». *Journal of Tropical Ecology* 11(4): 641- 49.
- Depeux, Charlotte et al. 2018. « Temperature and Photoperiod Influence Survival and Biomarkers of Senescence in Common Woodlouse ». *bioRxiv*: 433011.
- Depeux, Charlotte et al. 2019. « Common Biomarkers of Vertebrate Senescence Respond to Age Variation in the Invertebrate *Armadillidium Vulgare* ». *bioRxiv*: 583914.
- Depeux, Charlotte et al. 2020. « The Crustacean *Armadillidium Vulgare* (Latreille, 1804) (Isopoda: Oniscoidea), a New Promising Model for the Study of Cellular Senescence ». *Journal of Crustacean Biology* 40(2): 194- 99.
- Durand, Sylvine et al. 2018. « Producing Offspring in *Armadillidium Vulgare*: Effects of Genetic Diversity and Inbreeding ». *Evolution & Development* 20(2): 65- 77.
- Durand, Sylvine, Christine Braquart-Varnier, and Sophie Beltran-Bech. 2020. « Promiscuity and Sex Ratio in the Terrestrial Isopod *Armadillidium Vulgare* and Consequences on Genetic Diversity ». *Behavioural Processes* 171: 104030.
- Finch, Caleb E. 1991. « New Models for New Perspectives in the Biology of Senescence ». *Neurobiology of Aging* 12(6): 625- 34.
- Flatt, Thomas, and Paul S. Schmidt. 2009. « Integrating Evolutionary and Molecular Genetics of Aging ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790(10): 951- 62.
- Fox, John et al. 2019. « Package “effects” ». <ftp://gnualpha.uib.no/pub/cran/web/packages/effects/effects.pdf> (1 juin 2020).
- Gagnaire, Beatrice et al. 2006. « Effects of Temperature and Salinity on Haemocyte

- Activities of the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* (Thunberg) ». *Fish & Shellfish Immunology* 20(4): 536- 47.
- Gaillard, Jean-Michel, and Jean-François Lemaître. 2020. « An Integrative View of Senescence in Nature ». *Functional Ecology* 34(1): 4- 16.
- Galipaud, Matthias, Mark A. F. Gillingham, and François-Xavier Dechaume-Moncharmont. 2017. « A Farewell to the Sum of Akaike Weights: The Benefits of Alternative Metrics for Variable Importance Estimations in Model Selection ». *Methods in Ecology and Evolution* 8(12): 1668- 78.
- Gary, Ronald K., and Susan M. Kindell. 2005. « Quantitative Assay of Senescence-Associated  $\beta$ -Galactosidase Activity in Mammalian Cell Extracts ». *Analytical Biochemistry* 343(2): 329- 34.
- Hassall, C. et al. 2017. « Population-Level Variation in Senescence Suggests an Important Role for Temperature in an Endangered Mollusc ». *Journal of Zoology* 301(1): 32- 40.
- Hassall, Mark, Anna Moss, Bernice Dixie, and James J. Gilroy. 2018. « Interspecific Variation in Responses to Microclimate by Terrestrial Isopods: Implications in Relation to Climate Change ». *ZooKeys* 801: 5- 24.
- Itahana, Koji, Judith Campisi, and Goberdhan P. Dimri. 2007. « Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence ». In *Biological Aging: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology™*, éd. Trygve O. Tollefsbol. Totowa, NJ: Humana Press, 21- 31. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-361-5_3) (17 juin 2020).
- Jones, Owen R. et al. 2014. « Diversity of ageing across the tree of life ». *Nature* 505(7482): 169- 73.
- Kelly, Megan A., Adam P. Zieba, William A. Buttemer, and A. J. Hulbert. 2013. « Effect of Temperature on the Rate of Ageing: An Experimental Study of the Blowfly *Calliphora stygia* ». *PLoS ONE* 8(9). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3760806/> (14 mai 2020).
- Khadioli, N. et al. 2014. « Effect of Temperature on the Phenology of *Chilo Partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera, Crambidae); Simulation and Visualization of the Potential Future Distribution of *C. Partellus* in Africa under Warmer Temperatures through the Development of Life-Table Parameters ». *Bulletin of Entomological Research* 104(6): 809- 22.

- Kirkwood. 1977. « Evolution of ageing | Nature ». 270. <https://www.nature.com/articles/270301a0> (25 mai 2020).
- Lawlor, Lawrence R. 1976. « Parental Investment and Offspring Fitness in the Terrestrial Isopod *Armadillidium Vulgare* (Latr.) (Crustacea: Oniscoidea) ». *Evolution* 30(4): 775- 85.
- Lemaître, Jean-François et al. 2015. « Early-Late Life Trade-Offs and the Evolution of Ageing in the Wild ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1806): 20150209.
- Mocquard, J. P., P. Juchault, and C. Souty-Grosset. 1989. « The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) ». *Monografia. Monitore zoologico italiano* 4: 455- 75.
- Monari, Marta et al. 2007. « Effects of High Temperatures on Functional Responses of Haemocytes in the Clam Chamelea Gallina ». *Fish & Shellfish Immunology* 22(1): 98- 114.
- Münch, Daniel et al. 2013. « Obtaining Specimens with Slowed, Accelerated and Reversed Aging in the Honey Bee Model ». *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (78): e50550.
- Nussey, Daniel H. et al. 2013. « Senescence in Natural Populations of Animals: Widespread Evidence and Its Implications for Bio-Gerontology ». *Ageing Research Reviews* 12(1): 214- 25.
- Paris, Oscar H. 1963. « The Ecology of *Armadillidium Vulgare* (Isopoda: Oniscoidea) in California Grassland: Food, Enemies, and Weather ». *Ecological Monographs* 33(1): 1- 22.
- Paris, Oscar H., and Frank A. Pitelka. 1962. « Population Characteristics of the Terrestrial Isopod *Armadillidium Vulgare* in California Grassland ». *Ecology* 43(2): 229- 48.
- Postma, J. F., A. van Kleunen, and W. Admiraal. 1995. « Alterations in Life-History Traits of Chironomus Riparius (Diptera) Obtained from Metal Contaminated Rivers ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29(4): 469- 75.
- Rodriguez, J, V Boulo, E Mialhe, and E Bachere. 1995. « Characterisation of Shrimp Haemocytes and Plasma Components by Monoclonal Antibodies ». (108): 8.
- Roelofs, D., M. G. M. Aarts, H. Schat, and N. M. Van Straalen. 2008. « Functional Ecological Genomics to Demonstrate General and Specific Responses to Abiotic

- Stress ». *Functional Ecology* 22(1): 8- 18.
- Seguin, Bernard, et Jean-François Soussana. 2006. « Le réchauffement climatique (prédictions futures et observations récentes) en lien avec les émissions de GES ». : 13.
- Sinclair, B. J., A. G. Gibbs, and S. P. Roberts. 2007. « Gene Transcription during Exposure to, and Recovery from, Cold and Desiccation Stress in *Drosophila Melanogaster* ». *Insect Molecular Biology* 16(4): 435- 43.
- Stearns, S. C. 1989. « Trade-Offs in Life-History Evolution ». *Functional Ecology* 3(3): 259.
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Tatar, Marc, Dennis W. Gray, and James R. Carey. 1997. « Altitudinal Variation for Senescence in *Melanoplus* Grasshoppers ». *Oecologia* 111(3): 357- 64.
- Thatje, Sven, and Sally Hall. 2016. « The Effect of Temperature on the Evolution of parental Offspring Investment in a Globally Distributed Family of Marine Invertebrates (Crustacea: Decapoda: Lithodidae) ». *Marine Biology* 163(3): 48.
- Valenzano, Dario R. et al. 2006. « Temperature Affects Longevity and Age-Related Locomotor and Cognitive Decay in the Short-Lived Fish *Nothobranchius Furzeri* ». *Aging Cell* 5(3): 275- 78.
- Vinogradov, A.E. Male Reproductive Strategy and Decreased Longevity. *Acta Biotheor* 46, 157–160 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1001181921303>
- Yu, Jin Ha, Jae Hee Song, Min Chul Choi, and Sung Woo Park. 2009. « Effects of Water Temperature Change on Immune Function in Surf Clams, *Mactra Veneriformis* (Bivalvia: Mactridae) ». *Journal of Invertebrate Pathology* 102(1): 30- 35.

## Annexe 1: Temperature effect: Model selection

Models						
	Model	Variables	df	AICc	delta	weight
Survival	Survival Model (Cox regression)	Temperature	1	361.6	0.68	0.237
		Sex	1	361.0	0.06	0.323
		Temperature + Sex	2	363.2	2.28	0.107
		Temperature * Sex	3	360.9	0.00	0.333
Mass	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	-1250.8	43.08	0.000
		Temperature	3	-1277.4	16.47	0.000
		Sex	3	-1262.1	31.78	0.000
		Temperature + Sex	4	-1293.9	0.00	0.583
		Temperature * Sex	5	-1293.2	0.67	0.417
Reproduction	Binomial Model (Linear regression)	Intercept	1	57.5	2.8	0.198
		Temperature	2	54.7	0.0	0.802
Immune cell viability	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	466.3	0.00	0.471
		Temperature	3	467.6	1.28	0.249
		Sex	3	468.4	2.08	0.166
		Temperature + Sex	4	469.8	3.51	0.081
		Temperature * Sex	5	471.6	5.32	0.033
Immune cell size	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	73.8	4.30	0.038
		Temperature	3	69.7	0.23	0.288
		Sex	3	73.1	3.60	0.054
		Temperature + Sex	4	69.7	0.17	0.297
		Temperature * Sex	5	69.5	0.00	0.323
Immune cell density	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	1831.1	27.98	0.000
		Temperature	3	1803.1	0.00	0.662
		Sex	3	1832.3	29.20	0.000
		Temperature + Sex	4	1805.0	1.89	0.257
		Temperature * Sex	5	1807.3	4.22	0.080
$\beta$ -Galactosidase activity	Linear Model (Gaussian distribution)	Intercept	2	1127.9	8.42	0.009
		Temperature	3	1119.5	0.00	0.597
		Sex	3	1129.7	10.20	0.004
		Temperature + Sex	4	1121.1	1.55	0.276
		Temperature * Sex	5	1122.8	3.30	0.115

### III. Impact de la photopériode

#### III.1. Introduction

La photopériode correspond au rapport entre la durée du jour et la durée de la nuit. Elle est très importante dans la vie des organismes car elle va permettre aux organismes d'adapter leur physiologie en fonction des saisons, et ainsi d'optimiser certains traits, comme la reproduction (Pittendrigh and Daan 1976).

Chez le cloporte, la reproduction est saisonnière afin d'optimiser la survie des descendants à leur naissance. Ainsi c'est la photopériode et la température qui vont permettre l'entrée en reproduction notamment par la mise en place des mues de reproduction (McQueen and Steel 1980). Comme ce stress environnemental est indispensable à la reproduction de cette espèce, nous testons son effet sur la survie et les marqueurs de sénescence.

#### III.2. Matériel et Méthodes

##### III.2.1. Matériel biologique

Afin de tester l'effet d'une photopériode stimulante 18:6 (D/N) sur les marqueurs de sénescence du cloporte commun *A. vulgare*, nous réalisons deux groupes : un groupe témoin non stressé qui reste en photopériode naturelle de Poitiers (46.58°N, 0.34°E, de janvier à mars) et un groupe expérimental stressé placé en photopériode stimulante durant 2 mois (durée approximative d'un tel stress de photopériode dans la nature à nos latitudes). Au total, l'effet de la photopériode est évalué sur 120 animaux : 60 femelles et 60 mâles en photopériode stimulante et 60 femelles et 60 mâles en photopériode naturelle de Poitiers de janvier à mars à raison de 20 individus par boîte triés par sexe (soit 6 boîtes par condition) (Mat et Met, I.5. Elevage). A la suite de ces deux mois de stress, les animaux des deux groupes sont comptés pour estimer et comparer leur survie et pesés pour évaluer et comparer leur croissance. Ensuite, 10 individus de chaque boîte sont prélevés et sacrifiés pour mesurer l'effet de la photopériode sur leurs biomarqueurs de sénescence.

### *III.2.2. Statistiques*

Nous avons testé l'effet de la photopériode sur la survie par un modèle généralisé avec une distribution binomiale. Afin de tester l'effet de la photopériode sur l'activité lysosomale de la Bêta-galactosidase, nous utilisons un modèle linéaire à effet mixte à l'aide du package lme4 (Bates et al. 2014). Pour tester l'effet de la photopériode sur la taille et la viabilité des cellules, nous utilisons un modèle linéaire avec distribution Gaussienne. Pour la densité des cellules, et comme ce sont des données de comptage, nous utilisons une transformation logarithmique (Ives and Freckleton Robert 2015).

### **III.3. Résultats**

La photopériode stimulante n'a aucun effet sur la survie des mâles et des femelles (respectivement :  $X^2_1= 0.20$ ,  $p=0.65$  and  $X^2_1=1.96$ ,  $p=0.16$ ). Aucune différence de masse n'est détectée entre les deux groupes (stressé ou non). La taille des cellules, ainsi que leur densité ou leur viabilité, ne sont pas influencées par une photopériode stimulante (respectivement :  $F_{1,108}=0.264$ ,  $p=0.61$ , ;  $F_{1,108}=0.54$ ,  $p=0.54$  ;  $F_{1,108}=0.83$ ,  $p=0.86$  ; [Figure 34](#)). En revanche, nous observons une augmentation de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase en photopériode stimulante ( $X^2_1=3.86$ ,  $p=0.05$ , [Figure 35](#)), et ce de façon plus importante chez les femelles que chez les mâles.

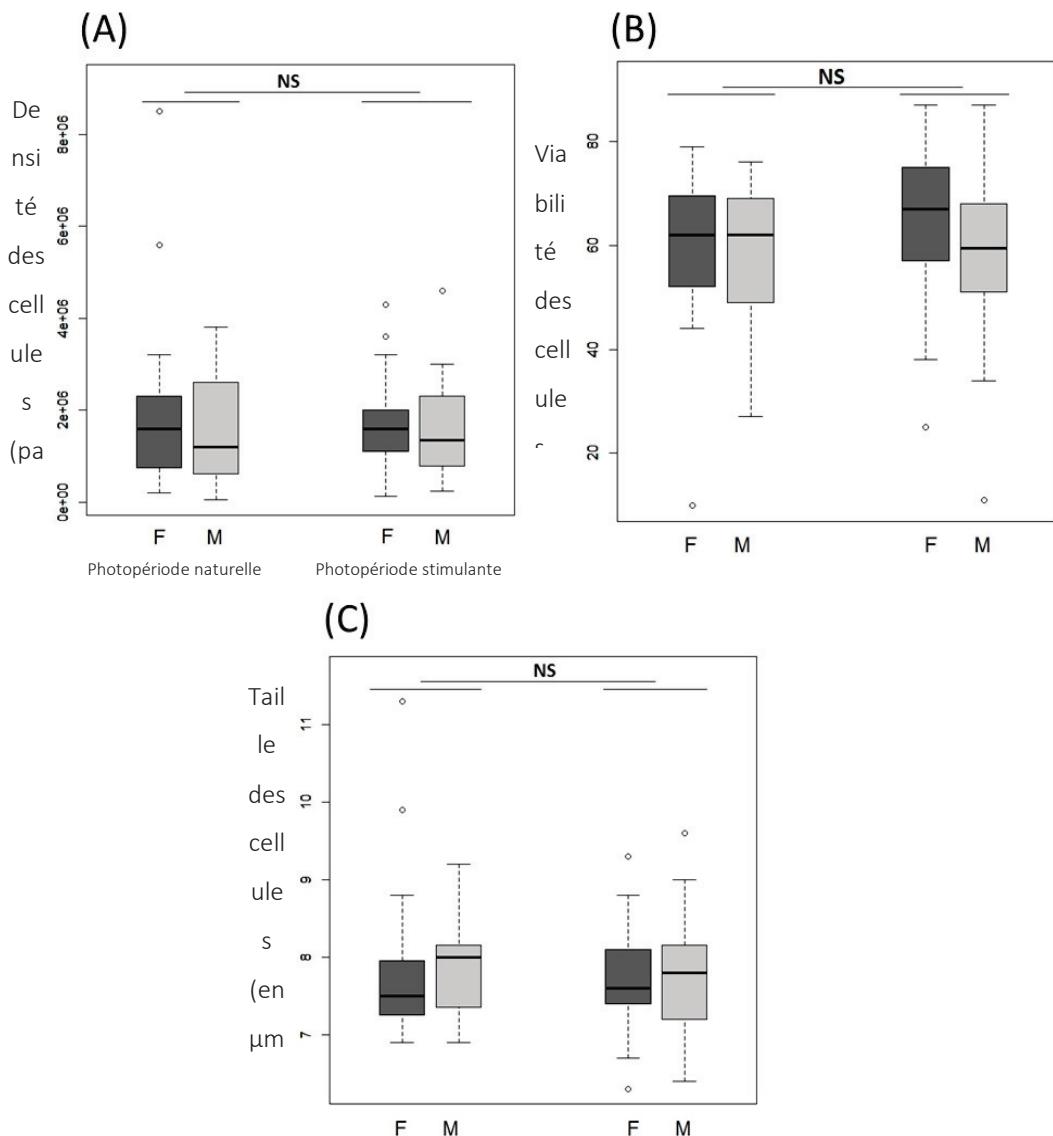


Figure 34 : Effet de la photopériode stimulante sur les paramètres immunitaires

NS : non significatif

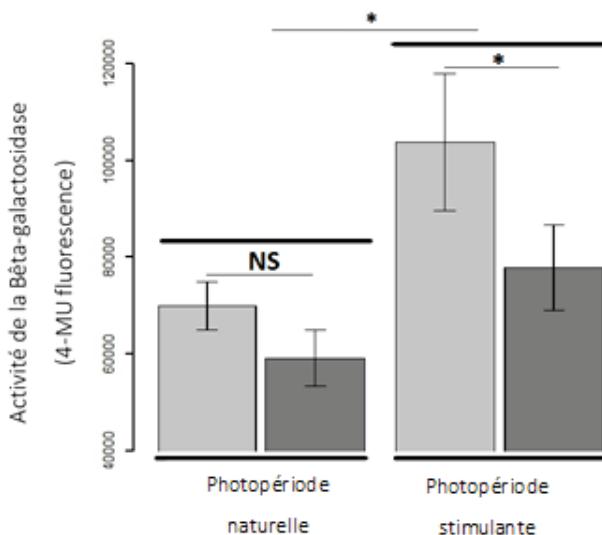


Figure 35 : Effet de la photopériode stimulante sur l'activité de la Bêta-galactosidase

\* :  $P < 0.05$  ; NS : non significatif

### III.4. Discussion

Le changement de photopériode est un paramètre indispensable à la reproduction du cloporte (Souty-Grosset et al. 1988 ; Mocquard et al. 1989). En testant son effet sur les patrons de sénescence chez cette espèce, nous constatons qu'une photopériode stimulante n'a aucun effet ni sur la survie du cloporte ni sur le profil des cellules immunitaires. Une augmentation de l'activité de la Bêta-galactosidase est cependant observée, et de façon plus marquée chez les femelles. Nous pensons que la photopériode stimule la physiologie de la reproduction, et plus particulièrement, participe à la mise en place de mues partielles chez les femelles. Cet investissement dans la reproduction pourrait donc marquer l'âge chronologique des individus, retranscrit en augmentation de la Bêta-galactosidase, et étant plus élevé chez le sexe ayant ces mues particulières. Il serait intéressant, dans une prochaine étude, de suivre les individus dans les mêmes conditions expérimentales que dans cette étude jusqu'à la fin de leur vie pour voir si une photopériode stimulante affecte également la survie des individus.

Nos résultats sur ce stress sont cohérents avec la physiologie de ces organismes. En effet si ce stress de photopériode stimulante n'est pas létal, puisqu'il est indispensable à la reproduction de l'espèce, il affecte les compromis énergétiques engagés par les individus. Ce n'est probablement pas directement qu'une photopériode stimulante entraîne une

modification des patrons de sénescence, mais elle déclenche la mise en place de la reproduction et entraîne une ré-allocation d'énergie couteuse pour l'organisme, ce qui a des répercussions, comme le prédit la théorie du soma jetable (Kirkwood 1977) sur l'âge biologique des organismes et dans notre cas, en particulier celui des femelles.

## IV. Impact de la carence alimentaire

### IV.1. Introduction

Dans leur milieu, les organismes ont rarement accès à de la nourriture en quantité illimité. Pour autant, il semble qu'une diminution de l'apport calorique, aussi appelé restriction calorique, peut entraîner une augmentation de la survie et retarder l'onset de sénescence chez certains vertébrés, notamment chez des rongeurs et certains primates (Weindruch et al. 1986 ; Masoro 2005 ; Speakman and Mitchell 2011 ; Mattison et al. 2017). Ce processus, dont les mécanismes sont souvent débattus, serait lié à une diminution du métabolisme basal et par conséquent, de la quantité de réactifs oxygénés produits (Alugoju et al. 2020 ; Mladenovic Djordjevic et al. 2020).

Chez les invertébrés, un allongement de la durée de vie est aussi observé lors d'une restriction calorique, notamment chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Partridge et al. 2005 ; Lee et al. 2006b ; Kapahi et al. 2017). Cependant, ce processus ne semble pas être lié à l'allocation à la reproduction ou à la réduction du taux métabolique, et nécessitent des études plus approfondies (Partridge et al. 2005). Comme les mécanismes impliqués dans cette même réponse semblent différents entre les vertébrés et les invertébrés, il semble indispensable de développer des connaissances sur un panel plus important d'organismes. Chez le cloporte, l'apport nutritionnel, au moins d'un point de vue qualitatif, influence de façon importante ses traits d'histoire de vie, son microbiote, et en particulier sa croissance et sa fécondité (Rushton and Hassall 1983 ; Horvathova et al. 2016). Nous supposons donc que cet apport nutritionnel peut avoir de forts impacts sur les patrons de sénescence chez *A. vulgare*.

## IV.2. Matériels et Méthodes

### IV.2.1. Matériel biologique

Afin de tester l'effet de la carence alimentaire sur les patrons de sénescence du cloporte commun *A. vulgare*, nous constituons deux groupes de 120 individus (60 femelles et 60 mâles répartis par sexe dans des boîtes de 20 individus). Le protocole expérimental est illustré en [Figure 36](#). Tous les individus sont vierges et ont 8 mois, nous avons souhaité réaliser cette expérience avant la saison de reproduction afin de pouvoir tester l'effet d'un stress de température sur celle-ci. Nous pesons tous les individus de chaque boîte pour fournir en nourriture 1/10 de leur poids au groupe expérimental (groupe avec application d'un stress « carence alimentaire ») et 1/1 de leur poids au groupe témoin (groupe non stressé). Ces quantités ont été choisi après des tests préliminaires menés pendant un mois et permettant le maintien des animaux. Nous laissons les individus dans ces conditions pendant trois mois, le stress devait durer 6 mois, mais comme il était très léthal pour les mâles nous avons décidé de l'arrêter plus tôt. Les animaux sont ensuite renourris *ad libitum*. A la fin de l'exposition au stress, (1) nous comptons le nombre de survivants afin d'estimer et comparer la survie post stress entre les deux groupes (animaux stressés ou non), (2) nous pesons chaque individu afin d'estimer et comparer leur croissance, et (3) nous mettons en reproduction 20 femelles carencées avec 20 mâles non carencés, et 20 femelles non carencées avec 20 mâles non carencés pour estimer l'effet de la carence alimentaire sur la reproduction. Nous n'avons pas pu tester l'effet du stress de carence alimentaire sur les mâles carencés puisque le nombre de mort était trop important et nous n'avions plus assez d'effectifs. Nous sacrifions également 20 mâles et 20 femelles non carencés et 12 mâles (totalité des mâles restants) et 20 femelles carencés pour mesurer l'effet du stress « carence alimentaire » sur le profil des cellules immunitaires et l'activité de la Bêta-galactosidase (biomarqueurs de sénescence).

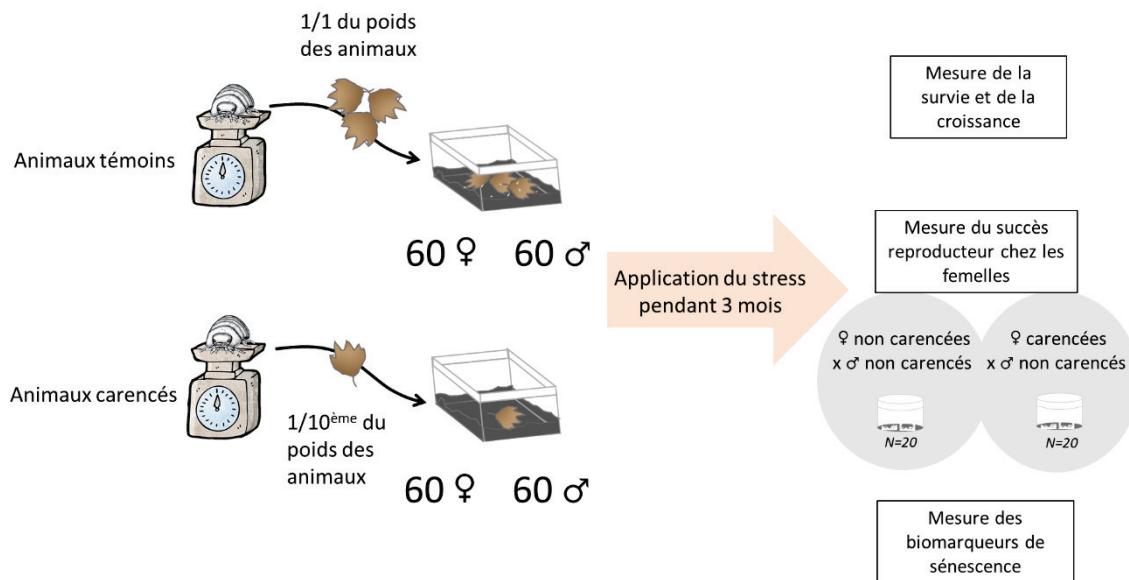


Figure 36 : Design expérimental de l'expérience "effet de la carence alimentaire"

#### IV.2.2. Statistiques

Pour chaque modèle suivant, nous réalisons une sélection de modèle par la méthode stepwise et AICc, le modèle complet comprenant, l'effet du sexe et de l'âge en interaction. Ainsi, les modèles sélectionnés sont présentés Tableau 5. Parmi les modèles dont le delta est inférieur à 2, nous sélectionnons le modèle le plus parcimonieux (contenant le moins de variables ou le moins d'interactions) (Galipaud et al. 2014).

Tableau 5 : Tableau de sélection de modèle pour l'effet de la carence alimentaire

En gras, les modèles sélectionnés.

	Modèles	Variables	df	AICc	delta	weight
Survie	Modèle linéaire généralisé (Distribution binomiale)	Sexe	1	296.9	59.41	0
		Carence	2	290.2	52.67	0
		<b>Sexe + Carence</b>	<b>3</b>	<b>239.4</b>	<b>1.95</b>	<b>0.273</b>
		Sexe * Carence	4	237.5	0.00	0.724
Masse	Modèle linéaire (distribution Gaussienne)	Intercept	1	-1217.2	83.77	0.397
		Sexe	2	-1222.5	78.46	0.359
		<b>Carence</b>	<b>2</b>	<b>-1300.0</b>	<b>0.97</b>	<b>0.245</b>
		Sexe + Carence	3	-1300.7	0.20	0

## CHAPITRE IV : IMPACT DE L'ENVIRONNEMENT SUR LES PATRONS DE SENESCENCE CHEZ A. VULGARE

---

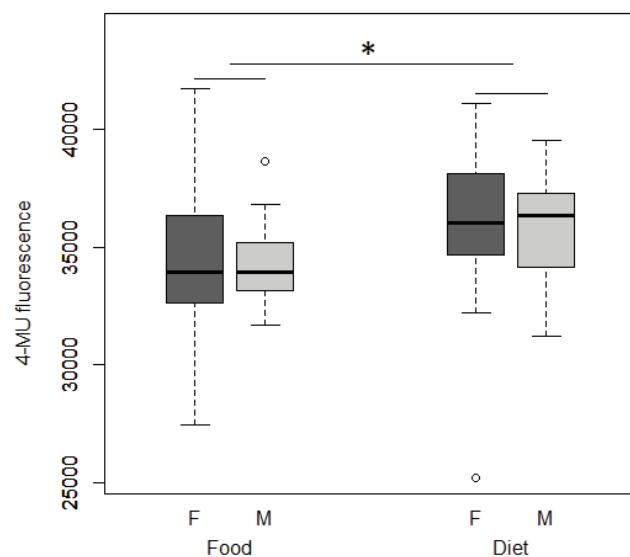
		Sexe * Carence	4	-1300.9	0.00	0
Beta-galactosidase	(distribution Gaussienne)	Intercept	1	1976,2	2.58	0.154
		Modèle linéaire Sexe	2	1281.8	4.75	0.052
		<b>Carence</b>	<b>2</b>	<b>1277,0</b>	<b>0</b>	<b>0.557</b>
		Sexe + Carence	3	1279.3	2.26	0.180
		Sexe * Carence	4	1281.6	4.55	0.057
Densité des cellules immunitaires	(distribution logarithmique)	Intercept	1	172.4	17.56	0
		Modèle linéaire Sexe	2	170.8	15.96	0
		Carence	2	<b>158.2</b>	3.41	0.121
		<b>Sexe + Carence</b>	<b>3</b>	<b>154.8</b>	<b>0.00</b>	<b>0.667</b>
		Sexe * Carence	4	157.1	2.30	0.211
Viabilité des cellules immunitaires	(distribution Gaussienne)	Intercept	1	<b>501.0</b>	<b>0.76</b>	<b>0.291</b>
		Modèle linéaire Sexe	2	503.2	2.94	0.098
		Carence	2	500.2	0.00	0.425
		Sexe + Carence	3	502.5	2.24	0.138
		Sexe * Carence	4	504.6	4.36	0.048
Taille des cellules immunitaires	(distribution Gaussienne)	Intercept	1	192.0	3.42	0.108
		Modèle linéaire Sexe	2	194.1	5.51	0.038
		<b>Carence</b>	<b>2</b>	<b>188.6</b>	<b>0</b>	<b>0.595</b>
		Sexe + Carence	3	190.8	2.20	0.197
		Sexe * Carence	4	193.1	4.51	0.062

### IV.3. Résultats

La carence alimentaire impacte négativement la survie des individus ( $\text{Chisq}_1 = 52.71$ ,  $p < 0.001$ ,  $\text{Estimate} \pm \text{sd} = -2.34 \pm -0.37$ ). Les mâles présentent une survie significativement plus faible que les femelles ( $\text{Chisq}_1 = 10.99$ ,  $P < 0.001$ ,  $\text{Estimate} \pm \text{sd} = -1.06 \pm 0.34$ ). Les individus placés en carence alimentaire présentent une masse plus faible à la fin de l'expérience ( $F\text{-value}_{1,165} = 109.3$ ,  $p < 0.001$ ,  $\text{Estimate} \pm \text{sd} = -0.008 \pm 0.0007$ ).

Concernant la reproduction, 12 couples d'individus non carencés (sur 20 couples mis en reproduction) produisent une portée, alors qu'aucun des couples composés d'une femelle carencée ne sont en mesure de se reproduire. La carence alimentaire a donc un impact significatif sur la reproduction des femelles ( $\text{Chisq}_1 = 17.14$ ,  $p < 0.001$ ).

Concernant les biomarqueurs de sénescence, la carence alimentaire entraîne une augmentation de l'activité de la Bêta-galactosidase ( $F\text{-value}_{1,66} = 4.79$ ,  $p=0.03$  ; Estimate  $\pm$   $sd = 1502.2 \pm 687.6$  ; [Figure 37](#)). La densité des cellules, quant-à-elle, diminue à la suite de la carence alimentaire ( $F\text{-value}_{1,65} = 4.46$ ,  $p<0.001$  ; Estimate  $\pm$   $sd = -0.80 \pm 0.17$  ; [Figure 38A](#)). Les mâles présentent significativement moins de cellules immunitaires que les femelles ( $F\text{-value}_{1,65} = 2.97$ ,  $p=0.02$  ; Estimate  $\pm$   $sd = -0.42 \pm 0.17$  ; [Figure 38A](#)). La viabilité des cellules n'est pas modifiée suite au traitement de carence alimentaire (modèle avec intercept sélectionné ; [Figure 38B](#)). Enfin, la taille des cellules immunitaires est plus importante chez les individus ayant rencontré la période de carence alimentaire ( $F\text{-value}_{1,66} = 5.67$ ,  $p=0.02$ , Estimate  $\pm$   $sd = 0.55 \pm 0.22$  ; [Figure 38C](#)).



[Figure 37 : Impact de la carence alimentaire sur l'activité de la Bêta-galactosidase](#)

\*  $P<0.05$

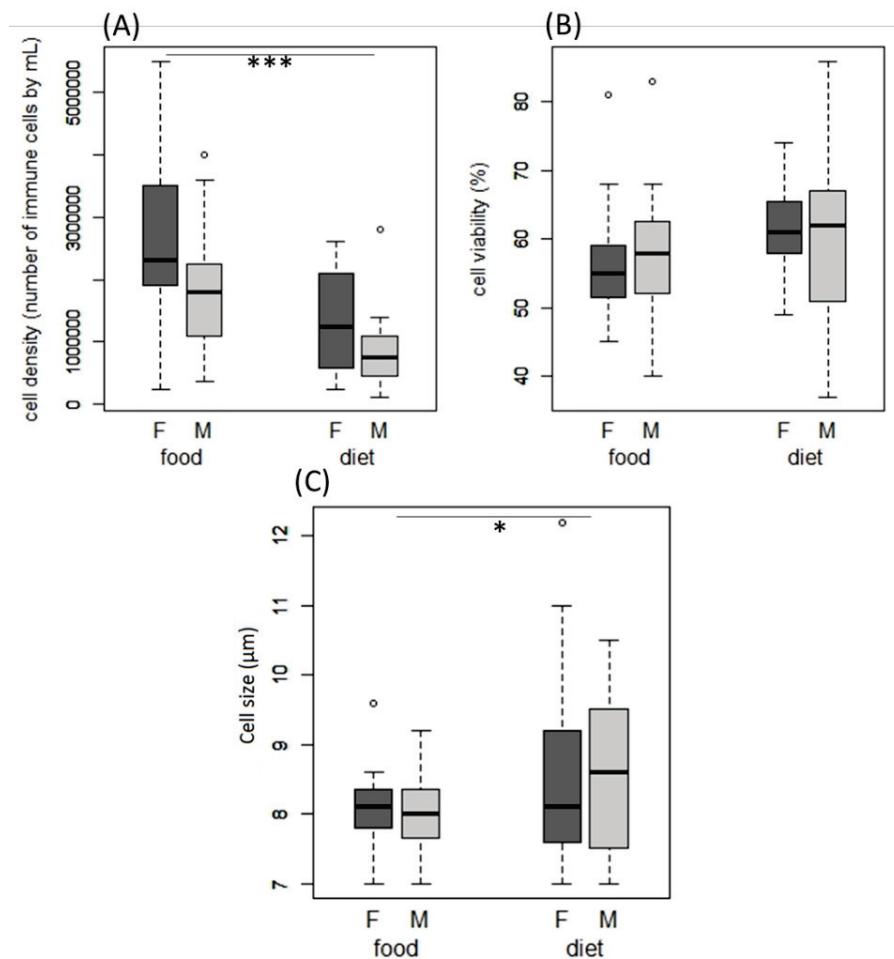


Figure 38 : Impact de la carence alimentaire sur le profil des cellules immunitaires

\*  $P<0.05$ , \*\*\*  $P<0.001$

#### IV.4. Discussion

##### IV.4.1. Carence alimentaire : stress important chez le cloporte ?

La carence alimentaire, à raison de 1/10 du poids en nourriture pendant 3 mois, entraîne une diminution de la survie, plus marquée chez les mâles, ainsi qu'une diminution de la croissance et de la reproduction chez *A. vulgare*. D'un point de vue cellulaire, la carence alimentaire entraîne aussi une hausse de l'activité de la Bêta-galactosidase, une diminution du nombre de cellules, plus importante chez les mâles, ainsi qu'une augmentation de la taille des cellules. Ainsi, la diminution d'un apport en calories entraîne chez le cloporte une augmentation de la sénescence démographique et cellulaire, avec un effet plus important chez les mâles.

La restriction calorique est connue pour entraîner chez de nombreux modèles une augmentation de la survie (Latta et al. 2011 ; Mattison et al. 2017 ; Mladenovic Djordjevic et al. 2020). A l'inverse de ce qui est obtenu chez ces autres organismes, la carence alimentaire chez le cloporte a un effet létal. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer les résultats observés :

(1) Si le stress de carence alimentaire avait entraîné un ralentissement du métabolisme, nous n'aurions pas observé un taux de mortalité si élevé. Il est donc possible que les cloportes ne connaissent pas de ralentissement métabolique en cas de carence alimentaire. Nous savons en effet que les mécanismes qui régissent ce processus de ralentissement métabolique sont différents selon les organismes étudiés (Kapahi et al. 2017 ; Mladenovic Djordjevic et al. 2020). Il est tout à fait possible qu'un tel type de mécanisme ne soit pas observé sur certains organismes comme le cloporte. Ce mécanisme adaptatif a peut-être été sélectionné chez des organismes pouvant fréquemment rencontrer des périodes de carences alimentaires. Ainsi par ces mécanismes ils peuvent se maintenir dans leur milieu même quand celui-ci ne présente pas des ressources alimentaires en grandes quantités. En tant que détritivore, le cloporte ne rencontre peut-être pas de difficultés à trouver de la nourriture en quantité suffisante et par conséquent, n'a pas adopté ce mécanisme.

(2) La carence alimentaire d' $1/10^{\text{ème}}$  du poids de l'animal appliquée dans nos expériences pourrait être trop forte pour avoir un effet « bénéfique » sur la survie des individus. En effet, la restriction calorique ne vise pas à affamer les organismes mais à leur apporter une ressource minime, permettant tout de même à l'organisme de subsister. Dans un contexte où cette restriction serait trop forte, il est possible qu'elle entraîne un stress physiologique trop important, qui mènerait, à une sénescence plus rapide et plus forte. De plus, nous savons que selon l'âge, l'acquisition des ressources peut avoir des conséquences importante sur les traits d'histoire de vie (Richardson and Smiseth 2019). Les individus dans nos expériences ont moins de 1 an quand ils sont exposés au stress de carence alimentaire. Ils pourraient ne pas disposer d'assez de ressources pour faire face à une diminution significative des apports en nourriture.

Quel que soit l'hypothèse explicative de nos résultats, ce qu'il est important de souligner, c'est que d'après ces résultats, en cas d'appauvrissement sévère du milieu, les

populations de cloportes du genre *A. vulgare*, ne seraient pas en mesure de résister et seraient probablement vouées à disparaître. En effet, les capacités de dispersion (inférieures à 100m) du cloporte ne leur permettent pas de se déplacer assez pour changer radicalement de milieu (Durand et al. 2019), surtout dans le contexte actuel d'homogénéisation et de fragmentation des paysages (Newbold et al. 2015).

#### *IV.4.2. Un effet sexe très marqué*

Nous remarquons un effet plus marqué chez les mâles, qui subissent une mortalité si importante que nous n'avons pas pu tester l'effet de la carence alimentaire sur leur reproduction ni poursuivre notre expérience aussi longtemps que nous l'avions prévu. La différence entre les deux sexes pourrait être due à des stratégies d'alimentation et de stockages différents. En effet, nous savons que la femelle cloporte, va, au cours de la reproduction, porter ses petits au sein de son *marsupium*. Cet acte est couteux pour la femelle (Surbida and Wright 2001), et nécessite donc un apport énergétique important. Nous pouvons supposer qu'en prévision de la reproduction, les femelles stockent des réserves. A l'inverse, lors de la reproduction, les mâles sont à la recherche des femelles, ils sont donc plus dispersifs que les femelles (Durand et al. 2019), et vont pouvoir acquérir des ressources plus facilement que les femelles, qui, une fois le *marsupium* formé auront certainement plus de difficultés à se mouvoir. La différence de stratégie reproductive pourrait être à l'origine des résultats que nous observons. En l'absence de stock énergétique, les mâles peuvent, en effet, et de façon plus importante, subir le stress de carence alimentaire. Ces résultats confirment des réponses différentes entre les sexes chez le cloporte. Elle est un indice supplémentaire de l'importance des différences de stratégies de reproduction entre les deux sexes sur la diversité des patrons de sénescence (Zajitschek et al. 2009 ; Maklakov and Lummaa 2013a).

## V. Discussion

### **V.I. Patrons de sénescence : variabilité des traits en fonction du stress**

Au cours de ces trois études sur l'effet de la température, de la photopériode et de la carence alimentaire, nous observons que selon le stress appliqué, les patrons de sénescence varient (Synthèse des résultats sur les stress [Tableau 7](#)).

Le stress environnemental affectant le moins les traits liés à la sénescence est la photopériode. Comme discuté précédemment, ce stress environnemental est indispensable pour l'entrée en reproduction des cloportes. De ce fait, il ne semble pas être directement lié à une sénescence précoce, mais plutôt à une stimulation physiologique. Nous savons que selon les populations, et en fonction de leur latitudes, l'onset de reproduction des cloportes est différent. Il serait très intéressant d'étudier l'impact d'une photopériode stimulante sur des individus prélevés de populations échantillonnées à des latitudes très différentes.

Les deux stress impactant le plus les cloportes en termes de survie et de reproduction sont les stress de température et de carence alimentaire. La carence alimentaire ayant même eu un effet très létal sur les mâles.

Pour chacun des trois stress, nous observons un effet sur l'activité de la Bêta-galactosidase, y compris pour le stress de photopériode stimulante. Ce biomarqueur semble être un marqueur fiable de l'âge chronologique des individus.

Les paramètres immunitaires, notamment la viabilité et la taille des cellules, peuvent parfois avoir un profil allant à l'inverse du profil obtenu chez de vieux individus. Ces deux traits sont liés au renouvellement cellulaire, or, le processus de renouvellement des cellules en temps de stress est encore peu connu chez le cloporte. Nous pouvons supposer, aux vues de nos résultats, que ce renouvellement cellulaire peut être impacté de façon importante par des stress environnementaux. Le nombre de cellules immunitaires diminue dans les deux situations où les stress ont entraînés un effet sur la survie, ils semblent donc être de bons marqueurs de sénescence.

Stress	Condition de contrôle	Condition de stress	Sexe des individus	Profil des cellules immunitaires			Activité de la Beta-galactosidase	Masse	Succès de Reproduction	Survie
				Nombre de cellules	Viabilité des cellules	Taille des cellules				
Age	1 an	3 ans	mâle	↘	↘	↗	↗	↗	↘	↘
			femelle	↘	↘	↗	↗	↗	↘	↘
Température	20°C	28°C	mâle	↘	↘	↘	↗	↙	↘	N.S
			femelle	↘	↘	↘	↗	↙	↘	
Photopériode	12:12	18:6	mâle	N.S	N.S	N.S	↗	N.S	/	N.S
			femelle	N.S	N.S	N.S	↗	N.S	/	N.S
Carence alimentaire	Poids de l'animal en nourriture	1/10 ème du poids de l'animal en nourriture	mâle	↘	↗	↗	↗	↙	↘	↘
			femelle	↘	N.S	↗	↗	↙	↘	↘

Tableau 6 : Tableau synthétique des patrons de sénescence obtenus à la suite des stress en comparaison avec les patrons obtenus chez des individus âgés de 2 à 3 ans (Chapitre III)

La flèche orientée vers le haut signifie que le trait/biomarqueur réagit par une augmentation entre la condition de contrôle et la condition de stress. A l'inverse, la flèche orientée vers le bas indique une diminution entre la condition de contrôle et la condition de stress. Les « / » signifient une absence d'observation du trait en question. Les N.S indiquent une absence de changement significatif entre la condition de contrôle et la condition de stress.

## V.II. Sensibilité du cloporte à des stress environnementaux : impact sur les populations

Grace à l'étude de la sénescence actuarielle, reproductive et cellulaire, nous mettons en évidence l'effet de trois stress environnementaux. Plus particulièrement nous observons des réponses très fortes à une augmentation de la température et à une réduction de l'apport en nourriture chez le cloporte. Ainsi, dans le contexte actuel du changement climatique prédisant une augmentation de température allant de 1.5°C à 4°C d'ici 2100 (Field et al. 2014), et en absence d'adaptation suffisamment rapide de ces espèces, il est fort probable qu'une diminution des populations de cloportes soit observée dans les années à venir pour plusieurs raisons. En effet, au-delà d'une augmentation certaine de la température prévue dans les prochaines années, les milieux vont être modifiés de façon drastique. Ainsi, en plus de leur faible capacité de dispersion (Durand et al. 2019) et leur fragilité face à une diminution des apports et de leur qualité (Rushton and Hassall 1983),

les cloportes ne pourront certainement pas se maintenir dans les zones qu'ils occupent actuellement et difficilement émigrer de façon assez importante pour survivre aux modifications climatiques (capacité de dispersion inférieure à 100m (Durand et al. 2019)). Ce petit isopode terrestre est, rappelons-le, un indicateur de la qualité des milieux (Souty-Grosset et al. 2005). De plus, c'est une espèce détritivore, et donc un élément important dans la dynamique de la chaîne alimentaire. Sa perte pourrait donc entraîner une perturbation de la chaîne alimentaire et des organismes qui la composent.

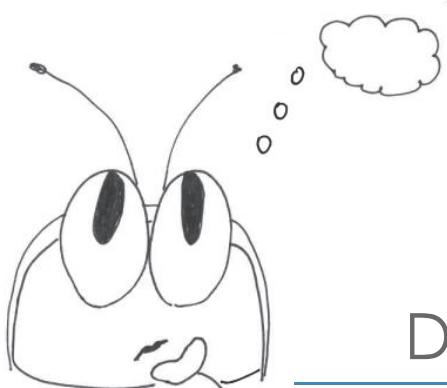
### V.III. Pistes futures et propositions d'expérimentation

Au cours de ces travaux, nous avons observé 3 stress de type abiotique. Pour étudier la sénescence cellulaire, nous avons utilisé des biomarqueurs de sénescence mis en place dans le chapitre III. Nous avons pu remarquer que ces marqueurs pouvaient réagir de façon plus ou moins similaire en fonction des stress et nous supposions qu'ils réagissaient de façon différente et à des seuils différents en fonction de l'âge chronologique des individus. Il serait particulièrement intéressant de mettre en place des stress allant en intensité ascendante et de tester leurs effets sur les biomarqueurs. Ainsi, nous nous attendons à ce que la Bêta-galactosidase soit le premier marqueur à réagir et que son activité augmente au fur et à mesure de l'augmentation du stress.

Nous avons pu mettre en évidence un effet important de l'environnement sur les patrons de sénescence, cependant, nous avons étudié des stress abiotiques. Nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier l'effet du degré d'humidité sur les patrons de sénescence. Pourtant, comme nous le savons (Smigel and Gibbs 2008), et comme nous avons pu l'observer dans notre étude préliminaire sur la température (Annexe 1), ce stress semble avoir de forts impacts sur les patrons de sénescence du cloporte et serait une variable extrêmement intéressante à étudier. Au-delà de toutes ces variables abiotiques, nous savons aussi que des variables de types biotiques, comme la densité ou des infections, peuvent avoir, elles aussi, de forts impacts sur les traits d'histoire de vie et la sénescence des invertébrés (voir exemples [Tableau 7](#)). Il serait donc également intéressant de tester l'impact de ces variables sur les patrons de sénescence du cloporte.

Tableau 7 : Effets de stress abiotiques sur des modèles invertébrés

Densité	Densité optimale	Forte densité	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution de la survie larvaire</li> <li>▪ Diminution de la masse larvaire</li> </ul>	<i>Chrysomya megacephala</i> (Goodbrod and Goff 1990), <i>Coenagrion pttella</i> (Banks and Thompson 1987), <i>Periplaneta americana</i> (Wharton et al. 1968)
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution du succès reproducteur</li> </ul>	<i>Macrobrachium amazonicum</i> (Moraes-Valenti et al. 2010)
		Faible densité	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution de la survie larvaire</li> <li>▪ Diminution de la masse larvaire</li> <li>▪ Perturbations développementales</li> </ul>	<i>Chrysomya megacephala</i> (Goodbrod and Goff 1990)  <i>Aphis fabae</i> (Shaw 1970)
Infections	Non-infecté	Infecté par Wolbachia	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminution de la survie</li> <li>▪ Diminution de la fécondité</li> <li>▪ Diminution des fonctions immunitaires</li> <li>▪ Diminution de la survie</li> </ul>	<i>Ceratitis capitata</i> (Sarakatsanou et al. 2011); <i>Trichogramma sp</i> (Tagami et al. 2001)
		Infecté par la bactérie <i>Salmonella</i>		<i>Armadillidium vulgare</i> (Braquart-Varnier et al. 2008)
				<i>Armadillidium vulgare</i> (Braquart-Varnier et al. 2015)



Discussion générale

---

## I. Résumé des résultats obtenus chez *A. vulgare*

Au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence le processus de sénescence chez le cloporte commun *A. vulgare*.

- Dans le premier chapitre, nous avons exploré la sénescence actuarielle chez les femelles. Nous avons mis en évidence un onset avoisinant 400 jours, et un effet important des événements de reproduction sur la survie.
- Dans le second chapitre, nous avons mis en évidence l'effet de l'âge sur le succès de reproduction. Nous avons en effet observé une diminution de la *fitness* chez les descendants issus de couples de vieux parents (âgés de 3 ans). De plus, nous avons mis en évidence l'impact de l'âge sur l'allocation à la reproduction des vieux mâles. Lors de l'expérience d'épuisement des mâles, nous avons observé que les vieux mâles fécondaient moins de femelles et allouaient moins d'énergie à la reproduction que les jeunes mâles.
- Dans le troisième chapitre, nous avons développé sur notre modèle biologique *A. vulgare* des biomarqueurs de sénescence connus chez les vertébrés. Ces marqueurs sont (1) la Béta-galactosidase qui augmente lorsque les cellules sont en sénescence ; (2) le profil des cellules immunitaires, marqué par la taille des cellules qui augmente, la viabilité et la densité qui diminuent lors du processus de sénescence ; et enfin (3) l'expression du gène TERT, sous unité indispensable à la télomérase, qui diminue avec le temps en particulier dans la chaîne nerveuse et dont l'expression est plus élevée chez les femelles dans les gonades et décroît avec l'âge comme observé chez les mâles.
- Dans le quatrième et dernier chapitre, nous avons mis en évidence l'effet de stress environnementaux sur la sénescence du cloporte. L'ensemble des résultats est présenté en [Tableau 6](#). Brièvement, l'augmentation de la température de 20°C à 28°C ainsi que la carence alimentaire (*ad libitum* vs 1/10 du poids de l'animal) ont eu des effets (1) sur la survie, avec une diminution de la survie à la suite de

l'augmentation de la température, mais aussi après application du stress de carence alimentaire, (2) sur le succès de reproduction (qui diminue avec le stress) et (3) sur l'expression de la Bêta-galactosidase et la taille des cellules immunitaires révélant que les animaux stressés vieillissent prématûrement. La viabilité et la densité des cellules semblent réagir de façon différente en fonction des stress. Pour ce qui est de l'effet de l'application d'une photopériode stimulante (18:8 D/N), nous observons une augmentation de l'activité de la Bêta-galactosidase, les autres marqueurs et la survie n'étant pas modifiés par ce stress.

## I. De la sénescence chez un organisme à croissance indéterminée : stratégies évolutives et sénescence

Le terme « organisme à croissance indéterminée » a été abordé à de nombreuses reprises au sein de ce manuscrit. Cette caractéristique de croissance est un point important dans notre étude. En choisissant d'étudier un organisme à croissance indéterminée, nous nous sommes exposés à un problème majeur : l'augmentation de la taille avec l'âge. Comment dissocier l'âge de la taille, et quelle importance cela peut-il avoir ? Il est vrai que la taille est un élément primordial, car elle est habituellement gage de qualité des individus (Calder 1996). Les connaissances sur la sénescence des organismes à croissance indéterminée sont bien moins développées que pour les mammifères ou les invertébrés à croissance déterminée.

Très longtemps, l'augmentation de la taille des individus a été associée à une augmentation de leur performance de reproduction (Vaupel et al. 2004) avec des performances de reproduction la plupart du temps établies sur le trait « nombre de descendants produits ». Pourtant, sur d'autres traits, les organismes à croissance indéterminée peuvent connaître une diminution de leur performance. Chez les guppys, les mâles âgés possèdent des spermatozoïdes nombreux mais présentant une vitesse moins importante (Gasparini et al. 2010). Chez le poisson zèbre, ce n'est pas la qualité des spermatozoïdes qui entraîne une diminution du succès de reproduction avec l'âge chez les mâles mais ce sont le comportement de reproduction et/ou l'attractivité qui ne permettent pas aux vieux mâles d'accéder à la reproduction avec le même succès que les jeunes mâles (Kanuga et al. 2011). Les résultats obtenus lors de cette thèse semblent

confirmer le fait que malgré une quantité de spermatozoïdes disponibles plus importante avec l'âge chez ces organismes, la sénescence reproductive intervient bel et bien, mais sur d'autres traits liés au succès de la reproduction ([Figure 32](#) : Schéma simplifié de l'effet de l'âge sur les traits affectant le succès reproducteur chez les mâles *A. vulgare*).

De manière logique, une question survient alors : « Si ces organismes allouent de l'énergie à croître tout au long de leur vie mais que celle-ci ne confère pas d'avantage en terme de reproduction, pourquoi cette stratégie est-elle maintenue au fil de l'évolution ? » Il est possible que la réponse réside dans la question. En effet, si sur certains traits, les performances diminuent avec l'âge, notamment en termes de succès auprès des femelles ou si les gamètes de ces organismes se dégradent avec l'âge, des stratégies évolutives permettant tout de même la production d'une descendance ont pu être sélectionnées. Ainsi, le système de croissance indéterminée pourrait permettre aux cloportes, en augmentant leur taille et donc leur capacité physiologique pour la reproduction (en particulier chez les mères, pour qui il faut assez de place pour le développement des petits au sein de leur *marsupium*), de compenser la diminution des performances en termes de qualité par des performances en termes de quantité. Cela nous ramène aux espèces « fast » et « slow » (Stearns 1992). Les « Slow-species », anciennement décrites comme ayant adopté la stratégie K : espèces à vie longue, qui vont privilégier la survie des descendants à leur quantité (Pianka 1972 ; Stearns 1992). Les « Fast-Species », qui correspondent à la stratégie « r », représentées par des espèces qui vivent peu de temps et qui privilégient la production de descendants en terme de quantité plutôt qu'en terme de qualité (Pianka 1972; Stearns 1992).

Rappelons aussi que les individus âgés sont très peu nombreux dans la nature, et que, la stratégie principale est tout de même la production de descendants en qualité la première année de vie. La croissance étant elle aussi couteuse, il semblerait que le cloporte ait trouvé un certain équilibre. Ainsi, les individus survivants à cette première saison de reproduction maximiseront leur *fitness* en produisant d'autres individus de moins bonne qualité, certes, mais pouvant permettre tout de même la transmission de leurs gènes. Ainsi, nous proposons que l'augmentation de taille permettrait, dans un certain équilibre, de pallier la diminution de la qualité des descendants par l'augmentation de leur quantité. Une étude transgénérationnelle menée sur des animaux

d'âges graduels entre 1 an et 3 ans, nous permettrait de comprendre à partir de quel moment l'effet de l'âge entraîne un vrai coût chez la descendance afin d'expliquer les patrons de dynamique des populations observés dans la nature.

## II. Stress et environnement

### II.1. Effet des stress sur les patrons de sénescence

Comme nous l'attendions, les stress environnementaux ont impacté les patrons de sénescence chez le cloporte. Les stress sont connus pour impacter de façon importante la physiologie (Webster 1983 ; Breuner and Hahn 2003), et plus particulièrement la sénescence des organismes (Korpelainen 1986 ; Valenzano et al. 2006 ; Mladenovic Djordjevic et al. 2020). En effet, dans des conditions de stress, les organismes doivent allouer plus d'énergie à leur maintenance somatique qu'à leur reproduction ou leur croissance. Ce mécanisme perturbe donc les stratégies d'allocation aux ressources (Cody 1966 ; Stearns 1992), à la base de la théorie du soma jetable (Kirkwood 1977). Comme chaque stress peut entraîner des réponses physiologiques différentes, les patrons de sénescence observés peuvent être complètement différents. La diversité des patrons de sénescence est un élément clef pour comprendre les mécanismes sous-jacents à ce processus quasi-ubiquiste. Les effets des différents stress sur le cloporte a permis à la fois de mieux comprendre l'impact de variables environnementales telle que la température sur ces organismes mais aussi de mettre en évidence des stratégies différentes selon les sexes.

### II.2. Population de laboratoire vs Population naturelle : vers une utilisation de l'étude de la sénescence en gestion des populations

Par notre approche expérimentale, nous avons pu mettre en évidence l'effet propre de chaque stress étudié sur les patrons de sénescence. En effet, les études réalisées en conditions naturelles, ne permettent pas de déterminer l'impact de chaque variable environnementale de façon indépendante, et ce, notamment parce que ces variables environnementales interagissent entre elles. Maintenant que nous avons connaissance de l'impact indépendant de la température ou de la carence alimentaire sur les patrons de sénescence du cloporte, nous pouvons plus facilement interpréter les observations réalisées sur le terrain et même prédire la capacité des populations à répondre aux stress

environnementaux. De plus, au vue des perspectives concernant l'évolution des températures dans les prochaines années à venir, avec une augmentation des températures allant de 1.5°C et 4°C attendue d'ici 2100 (Field et al. 2014), on peut supposer que cette espèce qui aujourd'hui ne présente pas de risque d'extinction devienne à risque si elle n'a pas le temps de s'adapter. Cela devient problématique quand on sait le rôle important qu'elle joue dans les services écosystémiques (David and Handa 2010), et notamment dans le processus de décomposition et le cycle nutritif (Paoletti and Hassall 1999 ; Bredon et al. 2018).

Notre approche pluridisciplinaire permet de mettre en évidence la sénescence à deux échelles : démographique et cellulaire. Etudier la sénescence des populations pourrait, au-delà de nous apporter de précieuses informations sur l'évolution de la sénescence, permettre de participer aux études populationnelles dans un but de conservation (Plot et al. 2012). En effet, l'étude de la sénescence pourrait apporter des informations sur l'état global des organismes et de leur âge chronologique et ainsi donner une indication sur le chemin que prennent les populations selon les perturbations de type environnementales.

### II.3. Conclusion et perspectives

Comprendre quels sont les mécanismes de la sénescence est indiscutablement un réel challenge en biologie évolutive. En prenant en compte des variables pouvant affecter des patrons de sénescence à l'échelle individuelle, les mécanismes régissant ce processus pourront être mis en évidence et permettront à long terme de comprendre comment un tel processus a pu évoluer au cours du temps.

## III. Sexe et patrons de sénescence

L'intensité de la sénescence actuarielle est connue pour varier entre les sexes (Clutton-Brock and Isvaran 2007 ; Maklakov and Lummaa 2013b ; Adler and Bonduriansky 2014). Dans les populations naturelles de *A. vulgare*, les femelles connaissent une mortalité vraisemblablement plus forte que les mâles après l'âge de 1 an (Paris and Pitelka 1962). Alors que lors des stress environnementaux appliqués en début de vie, nos résultats montrent que ce sont les mâles qui connaissent un taux de mortalité plus élevé suite à ces stress. Les différences entre ces observations peuvent être expliquées par différentes

hypothèses, comme par exemple les différences de stratégies de reproduction ou l'hétérogamétie.

### **III.1. Sexe et stratégies de reproduction**

Les mâles et les femelles de l'espèce *A. vulgare* n'ont pas les mêmes stratégies de reproduction. Bien que ce soit une espèce grégaire et que le système d'appariement soit promiscuaire (Durand et al. 2020), les femelles semblent investir beaucoup plus d'énergie que les mâles dans la reproduction. En effet, par la mise en place de mues particulières, la femelle met en place un *marsupium* qui protège ses embryons lors de leur développement (environ 4 semaines) (Warburg and Rosenberg 1996 ; Surbida and Wright 2001 ; Bech et al. 2017). C'est donc cet investissement important dans la reproduction (et dans le soin aux jeunes) qui semble moduler leur sénescence actuarielle, et c'est effectivement ce que nous observons dans le Chapitre I. Ainsi, nos données s'ajoutent aux nombreuses études soulignant l'impact des stratégies reproductives sur la différence dans les patrons de sénescence entre les deux sexes (Clutton-Brock and Isvaran 2007 ; Maklakov and Lummaa 2013 ; Adler and Bonduriansky 2014).

### **III.2. Sénescence et chromosome sexuel**

Dans l'introduction, nous présentons la théorie du sexe hétérogamétique (Marais et al. 2018). Pour rappel, selon cette théorie, les différences de longévité entre mâles et femelles pourraient s'expliquer par le fait que l'un des deux sexes (le sexe hétérogamétique), ne possède qu'une version du chromosome sexuel et est, par conséquent, plus exposé à voir des mutations délétères s'exprimer (Xirocostas et al. 2020). Chez *A. vulgare*, le sexe hétérogamétique est le sexe femelle (Chebbi et al. 2019), dont la longévité dans les populations naturelles est moins élevée que les mâles (Paris and Pitelka 1962). Les femelles sont donc peut-être plus sujettes à l'expression de mutations délétères. Chez une autre espèce de cloporte très proche de la nôtre : *Armadillidium nasatum*, le sexe hétérogamétique est le sexe mâle (Becking et al. 2017). Il serait donc particulièrement intéressant de comparer les patrons de sénescence entre ces deux espèces afin de vérifier si cette théorie du sexe hétérogamétique explique la différence dans les patrons de sénescence entre sexes.

### III.3. Conclusion et perspectives

Chez *A. vulgare*, les stratégies de reproduction différentes entre les sexes mais aussi la présence de chromosomes sexuels peut expliquer les différences observées. Encore une fois, nos résultats suggèrent un effet important de l'allocation aux ressources, et ici à la reproduction, sur les patrons de sénescence. Il serait particulièrement intéressant d'étudier l'effet du sexe sur des organismes dont les sexes s'investissent de façon très différente ou très similaire dans la reproduction afin d'évaluer l'impact de ces différences d'investissement sur les différences de sénescence actuarielle mâle et femelle.

## IV. Théories évolutives : les apports des études sur *A. vulgare*

Comprendre les causes et le fonctionnement de la sénescence est aujourd'hui le but commun des scientifiques de nombreuses disciplines (Wolf 2010 ; López-Otín et al. 2013 ; Shefferson et al. 2017b). Dans l'introduction de cette thèse, nous évoquons les principales théories avancées pour expliquer le processus de sénescence, dont la théorie du soma jetable et la théorie de la pléiotropie antagoniste. Au cours de cette thèse, nous avons pu observer que cet organisme à croissance indéterminée présentait des altérations de ses performances avec le temps, notamment en termes de survie et de reproduction, mais aussi au niveau cellulaire avec une augmentation des réponses des biomarqueurs de sénescence avec l'âge, mais aussi sous l'effet de certains stress environnementaux, et notamment les stress de température et de carence alimentaire. De plus, nous avons, dans la majeure partie des expériences, une différence d'effet selon le sexe.

### IV.1. Allocation aux ressources et stress : théorie du soma jetable chez *A. vulgare*

La théorie du soma jetable explique la sénescence comme un compromis entre les ressources allouées à la reproduction et celles allouées à la survie. L'un des premiers indices allant dans le sens de cette théorie est mis en évidence dès le chapitre I. En effet, l'allocation à la reproduction est plus forte lors de la première saison de reproduction. Les cloportes ayant produits plus de petits lors de cette première saison que les deux autres additionnées. Ce compromis entre l'allocation à la reproduction précoce au dépit de la

reproduction tardive est déjà bien renseignée dans le monde animal (Lemaître et al. 2015).

La reproduction a toujours été soupçonnée d'être une fonction couteuse, et notamment pour les femelles qui doivent assurer, dans notre modèle biologique, des mues particulières et des soins parentaux au travers de leur *marsupium*, justifiant une mortalité plus élevée dans les populations naturelles (Paris and Pitelka 1962 ; Warburg and Rosenberg 1996 ; Surbida and Wright 2001). Cependant, face à une augmentation de la température ou à une carence alimentaire, les mâles semblent être moins résistants que les femelles, en particulier au début de leur vie. En effet, dans nos expériences sur ces deux stress, la survie des mâles stressés est plus faible que celle des femelles stressés. Ces deux stress étant appliqués avant la saison de reproduction, aucune allocation n'a alors pu encore être dédiée à cette fonction, ce qui pourrait signifier que pour un même stress, les mâles subissent un coût en terme de survie plus important, alors que lors de la première saison de reproduction, le coût est davantage porté par les femelles (Paris and Pitelka 1962).

Dans le cadre de la théorie du soma jetable (Kirkwood 1977), nous pouvons émettre l'hypothèse que les femelles, qui allouent vraisemblablement plus d'énergie à la reproduction que les mâles, peuvent utiliser cette énergie pour résister d'avantage aux stress appliqués avant reproduction. Ainsi, la mortalité des mâles est plus importante suite à un stress, et la fécondité est réduite chez les femelles ; exactement le schéma que nous observons à la suite de l'application de nos stress. En effet, nous supposons l'existence d'un *trade-off* chez notre espèce entre l'énergie allouée à la reproduction et celle allouée à la maintenance somatique. Nous savons que le cloporte *A. vulgare*, espèce grégaire, est capable de choisir ses partenaires selon des critères génétiques (Durand et al. 2015, 2017a) et que les mâles dispersent plus que les femelles (Durand et al. 2019). Par le processus de dispersion, les mâles peuvent certainement augmenter leur probabilité de rencontrer des femelles génétiquement plus éloignées de lui, évitant ainsi la consanguinité et favorisant sa *fitness* (Durand et al. 2019). Cependant, la dispersion doit aussi être couteuse pour le mâle et intervient forcément avant la première saison de reproduction de façon à ce que ce mâle ne se reproduise pas avec ses sœurs. Ainsi les

jeunes mâles pourraient être plus actifs que les femelles en début de vie. En allouant plus d'énergie à la prospection avant l'arrivée d'un stress, ils ne sont pas en mesure de réallouer autant d'énergie que les femelles à la lutte contre ce stress (Figure 39). D'autant plus que les femelles, en vue de leur reproduction pourraient adopter la stratégie d'un stockage de ressources.

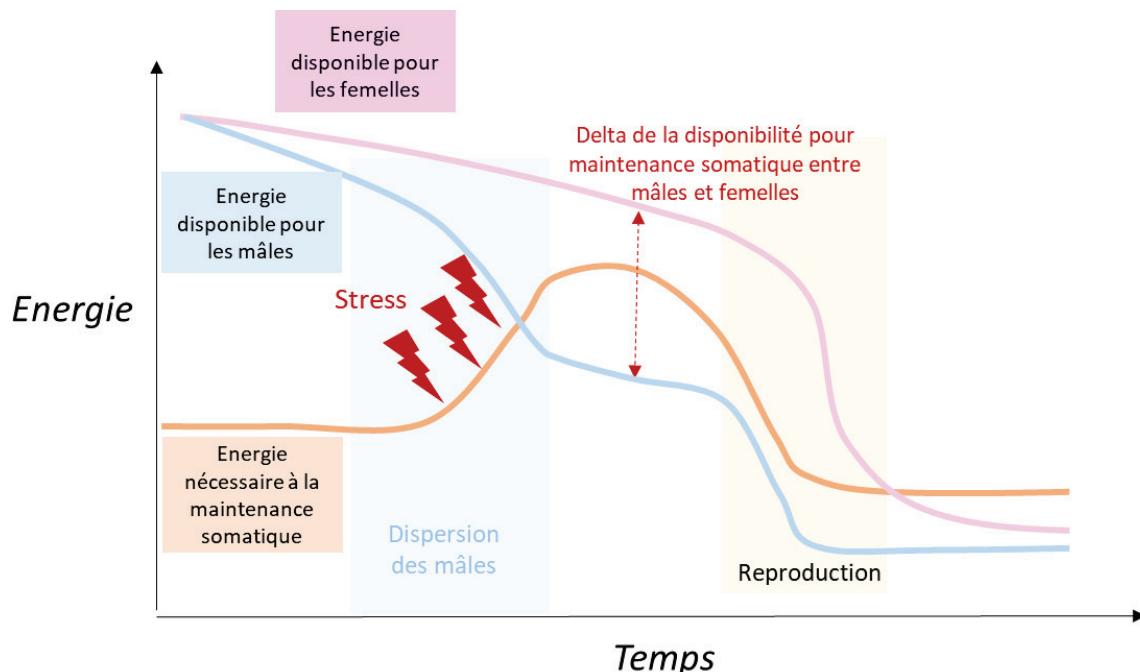


Figure 39 : Schéma théorique des différences d'allocations énergétiques entre mâles et femelles et réponse à la survenue d'un stress

*Les femelles et les mâles allouent l'énergie de façon différente. Les femelles vont investir beaucoup dans la reproduction, il est donc possible qu'elles stockent en attendant la première saison de reproduction. Les mâles eux, vont allouer de l'énergie à d'autres fonctions et notamment, à la dispersion. Lors de la survenue d'un stress (éclair rouge sur le schéma), l'énergie nécessaire à la maintenance somatique (en orange) augmente. Les mâles ne disposent pas assez d'énergie pour leur maintenance somatique, alors que les femelles, elles, vont pouvoir réallouer leur stock disponible pour la reproduction.*

#### IV.2. Théorie de la pléiotropie antagoniste : chez le cloporte *A. vulgare* ?

La théorie de la pléiotropie antagoniste décrit la sénescence comme étant le résultat de l'expression de certains gènes qui apportent des bénéfices en début de vie mais deviennent délétères en fin de vie. Lors de nos expériences, nous avons observé un effet

transgénérationnel de l'âge. Chez les vieux et gros cloportes (de par la stratégie de croissance indéterminée), le nombre de petits issus de chaque portée est plus important que pour les jeunes couples, mais les petits sont de moins bonnes qualités en terme de survie et de reproduction. Lors de la première saison de reproduction, et à âge égal, les femelles les plus grandes vont produire plus de petits, il y a donc un effet bénéfique de la taille (Durand et al. 2015). Cet effet bénéfique de la taille est donc perdu à un âge plus avancé. Ces observations vont dans le sens de la pléiotropie antagoniste. La taille, favorisant dans une première partie de vie une portée contenant plus de petits, sera au contraire délétère en fin de vie avec des descendants certes plus nombreux, mais de mauvaises qualités. Nos observations chez cette espèce, renforçant la théorie de la pléiotropie antagoniste viennent s'additionner aux éléments précédemment évoqués dans la théorie du soma jetable. Nos résultats s'inscrivent donc dans ces deux théories pour expliquer les patrons de sénescence observés chez cette espèce.

### IV.3. Critiques et perspectives

Afin de mieux comprendre les allocations aux ressources et la place de la reproduction dans celles-ci, il serait intéressant de réitérer les expériences de stress mais à des moments différents de la vie. Par exemple, si les stress sont appliqués après une première saison de reproduction, un effet plus important chez les femelles est attendu, en lien avec le fait qu'elles auront alloué beaucoup d'énergie à la reproduction.

Le principe de la théorie du soma jetable réside en l'existence de compromis d'allocation aux ressources entre différents traits (Cody 1966 ; Stearns 1992). Il est souvent aisément de mesurer l'allocation à deux grands traits comme la survie et la reproduction. Ainsi, de nombreuses études tendent à affirmer que la sénescence observée n'est vérifiable que si l'on se place du point de vue de la théorie du soma jetable (da Silva 2019). En est-il possible autrement ? Lorsque le compromis d'allocation aux ressources est clairement observable puisqu'il intervient entre deux grandes fonctions comme la reproduction, la croissance ou la survie, il est facile de conclure et de s'inscrire dans la théorie du soma jetable. Mais pouvons-nous réellement réfuter cette théorie lorsqu'un *trade-off* entre survie et reproduction n'est pas clairement identifié ? En effet, pour pouvoir réfuter la survenue d'un compromis énergétique entre plusieurs traits, il faudrait être en capacité

de mesurer tous les traits, et donc toutes les fonctions physiologiques d'un organisme. Or, cela paraît tout bonnement impossible. La théorie du soma jetable, qui est la plupart du temps mise en évidence, pourrait, même si elle n'est pas observable, régir l'ensemble des patrons de sénescence que nous observons. Si tel n'est pas le cas, il semble bien difficile de la réfuter.

## V. Conclusion

Comprendre un mécanisme et processus tant présent et si complexe que la sénescence nécessite un développement massif des connaissances, et ce, sur un nombre très important d'espèces présentant des caractéristiques différentes (Shefferson et al. 2017b). Il paraît en effet évident qu'un processus tel que la sénescence, si liée aux traits d'histoire de vie des organismes, s'exprime de façon différente au sein du monde vivant. Pour autant, quelques soient les différences de patrons de sénescence observables, ils mènent au même résultat : une diminution de la *fitness* avec l'âge. Notre approche originale et pluridisciplinaire aura permis de mettre en évidence des patrons de sénescence différents, à la fois entre les sexes mais aussi entre les individus en fonction des stress environnementaux qu'ils auront rencontrés sur un modèle biologique jusqu'alors non étudié sur la sénescence. Pour cela, nous aurons lié deux grands champs disciplinaires de l'étude de la sénescence : l'approche cellulaire/biomoléculaire, et l'approche démographique. Bien que souvent étudiés de façon parallèle ces deux domaines complémentaires ne sont que trop rarement étudié ensemble. Cette thèse nous aura aussi permis de nous inscrire dans deux des principales théories de la sénescence et apporter des éléments de réponses quant aux éléments régissant ces mécanismes. Ainsi, nous pensons qu'il est indispensable de développer les approches expérimentales et pluridisciplinaires afin d'apporter chaque petite pierre à l'édifice de la compréhension de ce mystérieux et complexe processus qu'on appelle la sénescence.

## EPILOGUE

---

Au cours de cette thèse j'aurais acquis de bien nombreuses compétences (cf. CV). J'ai, bien évidemment développé des connaissances et des compétences dans le domaine de la recherche scientifique et j'ai vraiment adoré mon sujet de thèse, la pluridisciplinarité de mes recherches et l'autonomie qui m'a été accordée. J'ai aussi pu découvrir l'enseignement, et c'est aussi une partie de ma thèse que j'ai beaucoup apprécié, l'échange avec les étudiants n'a fait que m'enrichir tant sur le plan professionnel que personnel. D'un point de vue personnel la thèse est un exercice fort enrichissant. Elle nous permet d'apprendre à faire face aux critiques, et à se relever toujours plus fort. Elle nous pousse à donner le meilleur de nous-même et à toujours essayer de nous surpasser. La thèse c'est aussi un apprentissage sur le point de vue humain. Grâce à elle j'aurais appris qui je veux être et qui je ne veux pas être. Je sors grandie de cette merveilleuse expérience et je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont permis vivre cette belle aventure.

# CURRICULUM VITAE

---

## Charlotte DEPEUX

### ADRESSE

8 chemin du Pipoirier  
86800 Sèvres-Anxaumont

### TELEPHONE

06.59.58.58.42

### EMAIL

charlotte.depeux@gmail.com



**CURRICULUM VITAE**

## FORMATION UNIVERSITAIRE

---

**Depuis octobre 2017 :** Doctorat de Biologie.

*Ecole doctorale E2M2, co-encadrement Université de Lyon 1 (69) et Université de Poitiers (86)*

**2015-2017 :** Master Ecologie et Biologie des Populations.

**2016-2017 :** Master 2 Biologie, Ecologie, Evolution.

**2015-2016 :** Master 1 Ecologie et Biologie des Populations.

*Université de Poitiers (86)*

**2012-2015 :** Licence Sciences de la Vie, parcours Ecologie et Biologie des Organismes.

*Université de Poitiers (86)*

## ACTIVITES DE RECHERCHE

---

**Depuis septembre 2020 :** Attachée temporaire d'Enseignement et de Recherche.

*Université de Poitiers (86)*

**2017-2020 :** Thèse "Impact de l'environnement dans l'évolution de la sénescence chez le cloporte commun *Armadillidium vulgare*" (encadrement : Sophie Beltran-Bech et Jean-Michel Gaillard)

Etude de la sénescence actuarielle, reproductive et cellulaire chez le cloporte commun. Impact de la température, de la photopériode, de la carence alimentaire et de la densité sur les patrons de sénescence.

*Laboratoire Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université de Lyon 1 (69)*

*Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers (86)*

**2017 : Stage de M2 : « Exploration des processi de sénescence induite par des stress chez *Armadillidium vulgare* » (encadrement : Sophie Beltran-Bech et Jean-Michel Gaillard)**

Mise en place de marqueurs cellulaires de sénescence (profils des cellules hémocytaires, activité de la Béta-galactosidase) chez le cloporte commun *Armadillidium vulgare*. Etude de l'impact de stress biotiques et abiotiques, des compromis évolutifs et allocations aux ressources.

*Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267, Université de Poitiers (86)*

**2016 : Stage de M1 : « Sélection sexuelle chez *Armadillidium vulgare*, atlas génétique des choix de partenaires sexuels et des multipaternités » (encadrement : Sophie Beltran-Bech et Nicolas Bech)**

Cartographie géo-génétique des multipaternités au sein de la poche marsupiale du cloporte commun *Armadillidium vulgare*. Projet alliant des outils biomoléculaires et empruntés aux sciences spatiales pour répondre à des questions évolutives.

*Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions UMR CNRS 7267, Université de Poitiers (86)*

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

---

### Articles scientifiques publiés

[Depeux, C., J. Lemaître, J. Moreau, F. Dechaume-Moncharmont, T. Laverre, H. Pauhlac, J. Gaillard, and S. Beltran-Bech.](#) (2020) Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *Journal of Evolutionary Biology*, doi: 10.1111/jeb.13667.

[Depeux C., Samba-Louaka A., Braquart-Varnier C. Moreau J., Lemaitre J.-F., Laverre T., Paulhac H., Dechaume-Moncharmont F.-X., Gaillard J.-M., Beltran-Bech S.](#) (2020) The crustacean *Armadillidium vulgare*, a new promising model for the study of cellular senescence. *Journal of Crustacean Biology*.

[Depeux C., Bech N., Durand S., Debenest C., Lafitte A., Beltran-Bech S.](#) (2017) When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*. *Genetica*, 145:503-512. DOI: 10.1007/s10709-017-9992-8.

### Congrès

[Depeux C., Lemaître J.F., Moreau J., Gaillard J.M., Samba-Louaka A. & Beltran-Bech S.](#) : « Impact of environment on senescence patterns: genetic, physiological and demographical approaches to understand diversity across the living world », *Evolution 2018* (Montpellier, août 2018). Communication orale.

[Bech N., Depeux C., Durand S., Prigot C., Debenest C., Beltran-Bech S.](#) Atlas géo-génétique de la sélection sexuelle chez les isopodes terrestres. (Présenté au Petit Pois Déridé, Août 2016). Communication orale

[Depeux C., Lemaître J.-F., Moreau J., Dechaume-Moncharmond F.-X., Laverre T., Paulhac H., Gaillard J.-M. & Beltran-Bech S.](#) : « When old individuals produce quantity, young individuals produce quality: evidence of reproductive senescence in the common woodlouse? » *6th Young Natural History scientists' Meeting* (Paris, mars 2019). Poster.

Depeux C., Bech N., Debenest C., Durand S., Lafitte A. & Beltran-Bech S. : « La cartographie en biologie : le *marsupium* du cloporte », Le printemps des cartes, Festival de cartographie (Montmorillon, avril 2018). Poster.

Depeux C., Lemaître J.F., Moreau J., Gaillard J.M., Samba-Louaka A. & Beltran-Bech S. : « The woodlouse: a new model to understand the role of environment on senescence pattern variations », Evolutionary demography society 5<sup>th</sup> annual meeting (Lyon, janvier 2018). Poster.

## ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

---

**Depuis septembre 2020 :** Attachée temporaire d'Enseignement et de Recherche.  
Université de Poitiers (86)

**2017-2020 : Vacances à l'Université de Poitiers**

Licence 2 SVT : TP Diversité du vivant (locomotion) (10h), TP Sexualité et Reproduction (8h)

Licence 3 EBO : TP Développement des organismes (9h), TP Biologie des Populations (8h)

Licence 3 hydrobiologie : TP SIG (12h)

Master 1 EE, GE et PAL : TP statistiques (création et mise en place du TP sur les modèles linéaires sur le logiciel R) (12h), TP SIG (12h), TD et TP génétique des Populations (16h)

Master 2 EE: TP Systèmes symbiotiques (Immunité cloporte) (24h)

**2020 : Co-encadrement de stage M1 (Angèle Branger)**

« Impact de la température sur la sénescence chez *Armadillidium vulgare* »  
Université de Poitiers (86)

**2018 : Co-encadrement de stage M1 (Simon Roy)**

« Impact de l'âge sur le succès reproducteur des mâles chez *Armadillidium vulgare* »  
Université de Poitiers (86)

**2017-2019 : Programme Action +**

Ateliers et visites chaque année de laboratoires à des lycéens (environ 20h)

Université de Poitiers (86)

**2015 : Stage de L3 : « Pédagogie et Sensibilisation au sein d'un parc animalier »**

Réalisation d'ateliers avec des groupes scolaires de différents niveaux : introduire la zoologie, l'évolution et la conservation des espèces.

Bioparc, Doué la Fontaine (49)

**2015 : Projet en autonomie construction d'un abri à insectes et découverte des invertébrés avec une classe de CM2**

Ecole de Loudun (86)

## RESPONSABILITES

---

**Depuis septembre 2020 :** Responsable coordination Action+

**Août 2018 :** Volontaire à l'organisation du congrès international Evolution 2018 à Montpellier (compté comme une formation de 20h à l'école doctorale)

**2017-2020** : Membre du comité d'organisation des séminaires de l'équipe ESS

## VULGARISATION SCIENTIFIQUE

---

**2016, 2017, 2019** : Participation à la fête de la science de Poitiers (86), tenue d'un stand et accueil du grand public.

## FORMATIONS DIVERSES

---

**2020** : Introduction à la statistique avec R, MOOC, formation à distance – Module de 20h

**2018** : Ethique de la recherche – MOOC, formation à distance – Module de 25h

**2018** : Paléontologie et Evolution : le message des fossiles – Module de 20h – Villeurbanne (64)

## LANGUES ET INFORMATIQUE

---

**Langues** : Anglais (TOEIC 735), Espagnol (bases)

**Informatique** : Pack Office, Inkscape, QGis, Logiciel R.

## REFERENCES

---

- Ackermann, M. 2003. Senescence in a Bacterium with Asymmetric Division. *Science* 300:1920–1920.
- Adler, M. I., and R. Bonduriansky. 2014. Sexual Conflict, Life Span, and Aging. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6:a017566–a017566.
- Afanas'ev, I. 2010. Signaling and damaging functions of free radicals in aging—Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging Dis* 1:75–88.
- Alugoju, P., L. Periyasamy, and M. Dyavaiah. 2020. Protective effect of quercetin in combination with caloric restriction against oxidative stress-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Lett Appl Microbiol* 71:272–279.
- Archer, C. R., and J. Hunt. 2015. Understanding the link between sexual selection, sexual conflict and aging using crickets as a model. *Experimental gerontology* 71:4–13.
- Austad, S. N. 1989. Life extension by dietary restriction in the bowl and doily spider, *Frontinella pyramitela*. *Experimental Gerontology* 24:83–92.
- Austad, S. N. 1993. Retarded senescence in an insular population of Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Journal of Zoology* 229:695–708.
- Baker, G. T., and R. L. Sprott. 1988. Biomarkers of aging. *Experimental Gerontology* 23:223–239.
- Balbontín, J., and M. Ferrer. 2005. Condition of large brood in Bonelli's Eagle *Hieraetus fasciatus*. *Bird Study* 52:37–41.
- Banks, M. J., and D. J. Thompson. 1987. Regulation of damselfly populations: the effects of larval density on larval survival, development rate and size in the field. *Freshwater Biology* 17:357–365.

## REFERENCES

---

- Bates, D., M. Mächler, B. Bolker, and S. Walker. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint arXiv:1406.5823.
- Baudisch, A. 2011. The pace and shape of ageing: Pace and shape of ageing. Methods in Ecology and Evolution 2:375–382.
- Beauché, F., and F.-J. Richard. 2013. The Best Timing of Mate Search in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea). PLoS ONE 8:e57737.
- Bech, N., C. Depeux, S. Durand, C. Debenest, A. Lafitte, and S. Beltran-Bech. 2017. When GIS zooms in: spatio-genetic maps of multipaternity in *Armadillidium vulgare*. Genetica 145:503–512.
- Becking, T., I. Giraud, M. Raimond, B. Moumen, C. Chandler, R. Cordaux, and C. Gilbert. 2017. Diversity and evolution of sex determination systems in terrestrial isopods. Sci Rep 7:1084.
- Bernadotte, A., V. M. Mikhelson, and I. M. Spivak. 2016. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. Aging 8:3–11.
- Binet, R. 2011. Identification et caractérisation d'un nouveau marqueur de la sénescence cellulaire : la protéine WNT16B. Université Grenoble Alpes.
- Bonduriansky, R., A. Maklakov, F. Zajitschek, and R. Brooks. 2008. Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. Functional Ecology 22:443–453.
- Bouwhuis, S., A. Charmantier, S. Verhulst, and B. C. Sheldon. 2010. Individual variation in rates of senescence: natal origin effects and disposable soma in a wild bird population. Journal of Animal Ecology 79:1251–1261.
- Braquart-Varnier, C., M. Altinli, R. Pigeault, F. D. Chevalier, P. Grève, D. Bouchon, and M. Sicard. 2015. The Mutualistic Side of Wolbachia–Isopod Interactions: Wolbachia

## REFERENCES

---

- Mediated Protection Against Pathogenic Intracellular Bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6.
- Braquart-Varnier, C., M. Lachat, J. Herbinière, M. Johnson, Y. Caubet, D. Bouchon, and M. Sicard. 2008. Wolbachia mediate variation of host immunocompetence. *PLoS One* 3:e3286.
- Bredon, M., J. Dittmer, C. Noël, B. Moumen, and D. Bouchon. 2018. Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome* 6:162.
- Bretman, A., M. J. G. Gage, and T. Chapman. 2011. Quick-change artists: male plastic behavioural responses to rivals. *Trends in Ecology & Evolution* 26:467–473.
- Breuner, C. W., and T. P. Hahn. 2003. Integrating stress physiology, environmental change, and behavior in free-living sparrows. *Hormones and Behavior* 43:115–123.
- Brock, P. M., S. J. Goodman, A. J. Hall, M. Cruz, and K. Acevedo-Whitehouse. 2015. Context-dependent associations between heterozygosity and immune variation in a wild carnivore. *BMC Evol Biol* 15:242.
- Brooks, R. 2001. Can older males deliver the good genes? *Trends in Ecology & Evolution* 16:308–313.
- Burness, G., S. J. Casselman, A. I. Schulte-Hostedde, C. D. Moyes, and R. Montgomerie. 2004. Sperm swimming speed and energetics vary with sperm competition risk in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 56:65–70.
- Calder, W. A. 1996. Size, function, and life history. Dover Publications, Mineola, N.Y.
- Campisi, J., and F. d'Adda di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8:729.

## REFERENCES

---

- Camus, M. F., D. J. Clancy, and D. K. Dowling. 2012. Mitochondria, Maternal Inheritance, and Male Aging. *Current Biology* 22:1717–1721.
- Carazo, P., P. Molina-Vila, and E. Font. 2011. Male reproductive senescence as a potential source of sexual conflict in a beetle. *Behavioral Ecology* 22:192–198.
- Caubet, Y. 1998. Individual life histories in terrestrial isopods populations: a simulation program. *Israel Journal of Zoology* 423–437.
- Chapman, J. R., S. Nakagawa, D. W. Coltman, J. Slate, and B. C. Sheldon. 2009. A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology* 18:2746–2765.
- Chebbi, M. A., T. Becking, B. Moumen, I. Giraud, C. Gilbert, J. Peccoud, and R. Cordaux. 2019. The Genome of *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda) Provides Insights into Sex Chromosome Evolution in the Context of Cytoplasmic Sex Determination. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msz010.
- Chevalier, F., J. Herbinière-Gaboreau, D. Charif, G. Mitta, F. Gavory, P. Wincker, P. Grève, C. Braquart-Varnier, and D. Bouchon. 2012. Feminizing Wolbachia: a transcriptomics approach with insights on the immune response genes in *Armadillidium vulgare*. *BMC Microbiology* 12:S1.
- Clutton-Brock, T. H., and K. Isvaran. 2007. Sex differences in ageing in natural populations of vertebrates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:3097–3104.
- Cody, M. L. 1966. A general theory of clutch size. *Evolution* 20:174–184.
- Cohen, A. A., B. K. Kennedy, U. Anglas, A. M. Bronikowski, J. Deelen, F. Dufour, G. Ferbeyre, L. Ferrucci, C. Franceschi, D. Frasca, B. Friguet, P. Gaudreau, V. N. Gladyshev, E. S. Gonos, V. Gorbunova, P. Gut, M. Ivanchenko, V. Legault, J.-F.

## REFERENCES

---

- Lemaître, T. Lointis, G.-H. Liu, M. Liu, A. B. Maier, O. T. Nóbrega, M. G. M. Olde Rikkert, G. Pawelec, S. Rheault, A. M. Senior, A. Simm, S. Soo, A. Traa, S. Ukraintseva, Q. Vanhaelen, J. M. Van Raamsdonk, J. M. Witkowski, A. I. Yashin, R. Ziman, and T. Fülöp. 2020. Lack of consensus on an aging biology paradigm? A global survey reveals an agreement to disagree, and the need for an interdisciplinary framework. *Mechanisms of Ageing and Development* 191:111316.
- Comfort, A. 1964. *Ageing: The biology of senescence*. Routledge Kegan Paul. London.
- Conboy, I. M., and T. A. Rando. 2012. Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle* 11:2260–2267.
- Coppée, A., T. Mathy, M.-C. Cammaerts, F. J. Verheggen, M. Terzo, S. Iserbyt, I. Valterová, and P. Rasmont. 2011. Age-dependent attractivity of males' sexual pheromones in *Bombus terrestris* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Chemoecology* 21:75–82.
- Dangerfield, J. M., and M. Hassall. 1992. Phenotypic variation in the breeding phenology of the woodlouse *Armadillidium vulgare*. *Oecologia* 89:140–146.
- Darwin, C. 1859. On the origin of the species by natural selection.
- David, J.-F., and I. T. Handa. 2010. The ecology of saprophagous macroarthropods (millipedes, woodlice) in the context of global change. *Biological Reviews* no-no.
- Davies, S., R. Kattel, B. Bhatia, A. Petherwick, and T. Chapman. 2005. The effect of diet, sex and mating status on longevity in Mediterranean fruit flies, Diptera: Tephritidae. *Experimental Gerontology* 40:784–792.
- de Jesus, B. B., and M. A. Blasco. 2012. Assessing cell and organ senescence biomarkers. *Circulation research* 111:97–109.

## REFERENCES

---

- Depeux, C., J. Lemaître, J. Moreau, F. Dechaume-Moncharmont, T. Laverre, H. Pauhlac, J. Gaillard, and S. Beltran-Bech. 2020. Reproductive senescence and parental effects in an indeterminate grower. *Journal of Evolutionary Biology*, doi: 10.1111/jeb.13667.
- Durand, S., F. Beauché, F.-J. Richard, and S. Beltran-Bech. 2015. How Do Females' Genetic Characteristics Influence Male Mate Preference in the Terrestrial Isopod *Armadillidium vulgare*? *Ethology* 121:1122–1130.
- Durand, S., C. Braquart-Varnier, and S. Beltran-Bech. 2020. Promiscuity and sex ratio in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* and consequences on genetic diversity. *Behavioural Processes* 171:104030.
- Durand, S., A. Cohas, C. Braquart-Varnier, and S. Beltran-Bech. 2017a. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71.
- Durand, S., A. Cohas, C. Braquart-Varnier, and S. Beltran-Bech. 2017b. Paternity success depends on male genetic characteristics in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Behav Ecol Sociobiol* 71:90.
- Durand, S., F. Grandjean, I. Giraud, R. Cordaux, S. Beltran-Bech, and N. Bech. 2019. Fine-scale population structure analysis in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea) reveals strong female philopatry. *Acta Oecologica* 101:103478.
- Durand, S., V. Loiseau, C. Prigot, C. Braquart-Varnier, and S. Beltran-Bech. 2018. Producing offspring in *Armadillidium vulgare*: Effects of genetic diversity and inbreeding. *Evolution & Development* 20:65–77.
- Durieux, J., S. Wolff, and A. Dillin. 2011. The Cell-Non-Autonomous Nature of Electron Transport Chain-Mediated Longevity. *Cell* 144:79–91.

## REFERENCES

---

- Emlen, J. M. 1970. Age Specificity and Ecological Theory. *Ecology* 51:588–601.
- Field, C. B., V. R. Barros, and Intergovernmental Panel on Climate Change (eds). 2014. Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability: Working Group II contribution to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York, NY.
- Fitzpatrick, J. L., and S. Lüpold. 2014. Sexual selection and the evolution of sperm quality. *MHR: Basic science of reproductive medicine* 20:1180–1189.
- Flatt, T., and P. S. Schmidt. 2009. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790:951–962.
- Fontana, L., L. Partridge, and V. D. Longo. 2010. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328:321–326.
- Fortin, M. 2016. Influence de la bactérie féminisante Wolbachia sur le comportement de choix du partenaire et la fitness de son hôte *Armadillidium vulgare*. Université de Poitiers.
- Fortin, M., C. Vitet, C. Souty-Grosset, and F.-J. Richard. 2018. How do familiarity and relatedness influence mate choice in *Armadillidium vulgare*? *PLoS ONE* 13:e0209893.
- Fox, J., and S. Weisberg. 2019. An {R} Companion to Applied Regression.
- Freitas, A. A., and J. P. De Magalhaes. 2011. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. *Mutation Research* 728:12–22.
- Fricke, C., and M. Koppik. 2019. Male reproductive ageing - a tale of the whole ejaculate. *Reproduction*, doi: 10.1530/REP-18-0579.
- Fricke, C., and A. A. Maklakov. 2007. Male age does not affect female fitness in a polyandrous beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Animal Behaviour* 74:541–548.

## REFERENCES

---

- Gaillard, J., and J. Lemaître. 2020. An integrative view of senescence in nature. *Funct Ecol* 34:4–16.
- Gaillard, J.-M., and J.-F. Lemaître. 2017. The Williams' legacy: A critical reappraisal of his nine predictions about the evolution of senescence: THE WILLIAMS' LEGACY. *Evolution* 71:2768–2785.
- Gaillard, J.-M., D. Pontier, D. Allainé, J. D. Lebreton, J. Trouvilliez, J. Clobert, and D. Allaine. 1989. An Analysis of Demographic Tactics in Birds and Mammals. *Oikos* 56:59.
- Galipaud, M., M. A. F. Gillingham, M. David, and F.-X. Dechaume-Moncharmont. 2014. Ecologists overestimate the importance of predictor variables in model averaging: a plea for cautious interpretations. *Methods in Ecology and Evolution* 5:983–991.
- Gary, R. K., and S. M. Kindell. 2005. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.* 343:329–334.
- Gasparini, C., I. A. M. Marino, C. Boschetto, and A. Pilastro. 2010. Effect of male age on sperm traits and sperm competition success in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Journal of Evolutionary Biology* 23:124–135.
- Gems, D., and L. Partridge. 2013. Genetics of Longevity in Model Organisms: Debates and Paradigm Shifts. *Annu. Rev. Physiol.* 75:621–644.
- Girndt, A., C. W. T. Chng, T. Burke, and J. Schroeder. 2018. Male age is associated with extra-pair paternity, but not with extra-pair mating behaviour. *Scientific Reports* 8.
- Goodbrod, J. R., and M. L. Goff. 1990. Effects of Larval Population Density on Rates of Development and Interactions between Two Species of Chrysomya (Diptera: Calliphoridae) in Laboratory Culture. *Journal of Medical Entomology* 27:338–343.
- Greer, E. L., T. J. Maures, A. G. Hauswirth, E. M. Green, D. S. Leeman, G. S. Maro, S. Han, M. R. Banko, O. Gozani, and A. Brunet. 2010. Members of the H3K4 trimethylation

## REFERENCES

---

- complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466:383–387.
- Gregg, S. Q., V. Gutiérrez, A. Rasile Robinson, T. Woodell, A. Nakao, M. A. Ross, G. K. Michalopoulos, L. Rigatti, C. E. Rothermel, I. Kamileri, G. A. Garinis, D. Beer Stolz, and L. J. Niedernhofer. 2012. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology* 55:609–621.
- Grimes, A., and S. B. Chandra. 2009. Significance of cellular senescence in aging and cancer. *Cancer Research and Treatment* 41:187–195.
- Gruber, R., H. Koch, B. A. Doll, F. Tegtmeier, T. A. Einhorn, and J. O. Hollinger. 2006. Fracture healing in the elderly patient. *Experimental Gerontology* 41:1080–1093.
- Gunn, D. L. 1936. The Humidity Reactions of the Woodlouse, *Porcellio scaber* (Latreille). *Journal of Experimental Biology* 14:178–186.
- Haldane, J. B. S. 1941. New paths in genetics. *New paths in genetics*.
- Hamilton, W. D. 1966. The moulding of senescence by natural selection. *Journal of Theoretical Biology* 12:12–45.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* 11:298–300.
- Hassall, C., R. Amaro, P. Ondina, A. Outeiro, A. Cordero-Rivera, and E. San Miguel. 2017. Population-level variation in senescence suggests an important role for temperature in an endangered mollusc. *J Zool* 301:32–40.
- Hayflick, L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 37:614–636.

## REFERENCES

---

- Hercus, M. J., V. Loeschke, and S. I. S. Rattan. 2010. Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. Proc. R. Soc. B 936–969.
- Hoeijmakers, J. H. J. 2009. DNA Damage, Aging, and Cancer. N Engl J Med 361:1475–1485.
- Hoekstra, L. A., T. S. Schwartz, A. M. Sparkman, D. A. W. Miller, and A. M. Bronikowski. 2020. The untapped potential of reptile biodiversity for understanding how and why animals age. Funct Ecol 34:38–54.
- Horvathova, T., W. Babik, and U. Bauchinger. 2016. Biofilm feeding: Microbial colonization of food promotes the growth of a detritivorous arthropod. ZK 577:25–41.
- Hothorn, T., F. Bretz, P. Westfall, and R. M. Heiberger. 2016. Package ‘multcomp’ (ed. CRAN).
- Howard, H. W. 1943. Length of Life of Sperms in the Woodlouse *Armadillidium vulgare* Latr. Nature 152:331–331.
- Hughes, K. A., and R. M. Reynolds. 2005. Evolutionary and mechanistic theories of aging. Annu. Rev. Entomol. 50:421–445.
- Itaya, PatriciaW. 1979. Electron microscopic investigation of the formation of spermatophores of *Armadillidium vulgare*. Cell Tissue Res. 196.
- Ives, A. R., and Freckleton Robert. 2015. For testing the significance of regression coefficients, go ahead and log-transform count data. Methods in Ecology and Evolution 6:828–835.
- Jaskelioff, M., F. L. Muller, J.-H. Paik, E. Thomas, S. Jiang, A. C. Adams, E. Sahin, M. Kost-Alimova, A. Protopopov, J. Cadiñanos, J. W. Horner, E. Maratos-Flier, and R. A.

## REFERENCES

---

- DePinho. 2011. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469:102–106.
- Johnson, S. L., and N. J. Gemmell. 2012. Are old males still good males and can females tell the difference? *BioEssays* 34:609–619.
- Johnson, S. L., S. Zellhuber-McMillan, J. Gillum, J. Dunleavy, J. P. Evans, S. Nakagawa, and N. J. Gemmell. 2018. Evidence that fertility trades off with early offspring fitness as males age. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285:20172174.
- Johnson, T. E. 2006. Recent results: Biomarkers of aging. *Experimental Gerontology* 41:1243–1246.
- Jones, O. R., A. Scheuerlein, R. Salguero-Gómez, C. G. Camarda, R. Schaible, B. B. Casper, J. P. Dahlgren, J. Ehrlén, M. B. García, E. S. Menges, P. F. Quintana-Ascencio, H. Caswell, A. Baudisch, and J. W. Vaupel. 2013. Diversity of ageing across the tree of life. *Nature* 505:169–173.
- Jones, T. M., and M. A. Elgar. 2004. The role of male age, sperm age and mating history on fecundity and fertilization success in the hide beetle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271:1311–1318.
- Joy, T. K., A. J. Arik, V. Corby-Harris, A. A. Johnson, and M. A. Riehle. 2010. The impact of larval and adult dietary restriction on lifespan, reproduction and growth in the mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Gerontology* 45:685–690.
- Jump, A. S., R. Marchant, and J. Peñuelas. 2009. Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science* 14:51–58.

## REFERENCES

---

- Kanuga, M. K., M. J. Benner, J. A. Doble, J. G. Wilson-Leedy, B. D. Robison, and R. L. Ingermann. 2011. Effect of aging on male reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 315A:156–161.
- Kapahi, P., M. Kaerlein, and M. Hansen. 2017. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Research Reviews* 39:3–14.
- Karkach, A. 2006. Trajectories and models of individual growth. *DemRes* 15:347–400.
- Kaushik, S., and A. M. Cuervo. 2015. Proteostasis and aging. *Nat Med* 21:1406–1415.
- Kelly, C. D., and M. D. Jennions. 2011. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews* 86:863–884.
- Kennedy, B. K., S. L. Berger, A. Brunet, J. Campisi, A. M. Cuervo, E. S. Epel, C. Franceschi, G. J. Lithgow, R. I. Morimoto, J. E. Pessin, T. A. Rando, A. Richardson, E. E. Schadt, T. Wyss-Coray, and F. Sierra. 2014. Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease. *Cell* 159:709–713.
- Kimura, M. 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. 1st ed. Cambridge University Press.
- Kirkwood, T. B. L. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270:301–304.
- Kirkwood, T. B. L. 2005. Understanding the Odd Science of Aging. *Cell* 120:437–447.
- Koga, H., S. Kaushik, and A. M. Cuervo. 2011. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Research Reviews* 10:205–215.
- Korpelainen, H. 1986. The effects of temperature and photoperiod on life history parameters of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology* 16:615–620.
- Kowald, A., and T. B. L. Kirkwood. 2016. Can aging be programmed? A critical literature review. *Aging Cell* 15:986–998.

## REFERENCES

---

- Lagouge, M., and N.-G. Larsson. 2013. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal medicine* 273:529–543.
- Lande, R., and S. J. Arnold. 1983. The Measurement of Selection on Correlated Characters. *Evolution* 37:1210.
- Laplante, M., and D. M. Sabatini. 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149:274–293.
- Latta, L. C., S. Frederick, and M. E. Pfrenger. 2011. Diet restriction and life history trade-offs in short- and long-lived species of *Daphnia*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 315A:610–617.
- Lavasani, M., A. R. Robinson, A. Lu, M. Song, J. M. Feduska, B. Ahani, J. S. Tilstra, C. H. Feldman, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer, and J. Huard. 2012. Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun* 3:608.
- Le Bourg, É. 2007. Hormetic effects of repeated exposures to cold at young age on longevity, aging and resistance to heat or cold shocks in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* 8:431–444.
- Lee, B. Y., J. A. Han, J. S. Im, A. Morrone, K. Johung, E. C. Goodwin, W. J. Kleijer, D. DiMaio, and E. S. Hwang. 2006a. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging cell* 5:187–195.
- Lee, G. D., M. A. Wilson, M. Zhu, C. A. Wolkow, R. de Cabo, D. K. Ingram, and S. Zou. 2006b. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5:515–524.
- Lefebvre, F. 2002. Reproductive strategies in terrestrial isopod crustaceans. Université de Poitiers.

## REFERENCES

---

- Lefebvre, F., F.-J. Richard, J. Moreau, T. Rigaud, and Y. Caubet. 2019. Mass drives mating success in *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Oniscidea). *Behavioural Processes* 168:103944.
- Lemaître, J.-F., V. Berger, C. Bonenfant, M. Douhard, M. Gamelon, F. Plard, and J.-M. Gaillard. 2015. Early-late life trade-offs and the evolution of ageing in the wild. *Proc Biol Sci* 282.
- Lemaître, J.-F., and J.-M. Gaillard. 2013. Male survival patterns do not depend on male allocation to sexual competition in large herbivores. *Behavioral Ecology* 24:421–428.
- Lemaître, J.-F., and J.-M. Gaillard. 2017. Reproductive senescence: new perspectives in the wild. *Biol Rev* n/a-n/a.
- Lemaître, J.-F., V. Ronget, M. Tidière, D. Allainé, V. Berger, A. Cohas, F. Colchero, D. A. Conde, M. Garratt, A. Liker, G. A. B. Marais, A. Scheuerlein, T. Székely, and J.-M. Gaillard. 2020. Sex differences in adult lifespan and aging rates of mortality across wild mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 117:8546–8553.
- Leroi, A. M., A. Bartke, G. D. Benedictis, C. Franceschi, A. Gartner, E. Gonos, M. E. Feder, T. Kivisild, S. Lee, N. Kartal-Özer, M. Schumacher, E. Sikora, E. Slagboom, M. Tatar, A. I. Yashin, J. Vijg, and B. Zwaan. 2005. What evidence is there for the existence of individual genes with antagonistic pleiotropic effects? *Mechanisms of Ageing and Development* 126:421–429.
- López-Otín, C., M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, and G. Kroemer. 2013. The Hallmarks of Aging. *Cell* 153:1194–1217.

## REFERENCES

---

- Makai, G., R. Rodríguez-Muñoz, J. J. Boonekamp, P. Hopwood, and T. Tregenza. 2020. Males and females differ in how their behaviour changes with age in wild crickets. *Animal Behaviour* 164:1–8.
- Maklakov, A. A., and S. Immler. 2016. The Expensive Germline and the Evolution of Ageing. *Current Biology* 26:R577–R586.
- Maklakov, A. A., and V. Lummaa. 2013a. Evolution of sex differences in lifespan and aging: Causes and constraints: Prospects & Overviews. *BioEssays* 35:717–724.
- Maklakov, A. A., and V. Lummaa. 2013b. Evolution of sex differences in lifespan and aging: Causes and constraints: Prospects & Overviews. *BioEssays* 35:717–724.
- Maklakov, A. A., L. Rowe, and U. Friberg. 2015. Why organisms age: Evolution of senescence under positive pleiotropy? *BioEssays* 37:802–807.
- Marais, G. A. B., J.-M. Gaillard, C. Vieira, I. Plotton, D. Sanlaville, F. Gueyffier, and J.-F. Lemaitre. 2018. Sex gap in aging and longevity: can sex chromosomes play a role? *Biology of Sex Differences* 9.
- Marshall, K. E., and B. J. Sinclair. 2010. Repeated stress exposure results in a survival–reproduction trade-off in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277:963–969.
- Martínez, D. E. 1998. Mortality Patterns Suggest Lack of Senescence in Hydra. *Experimental Gerontology* 33:217–225.
- Masoro, E. J. 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of ageing and development* 126:913–922.
- Mattison, J. A., R. J. Colman, T. M. Beasley, D. B. Allison, J. W. Kemnitz, G. S. Roth, D. K. Ingram, R. Weindruch, R. de Cabo, and R. M. Anderson. 2017. Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat Commun* 8:14063.

## REFERENCES

---

- McCulloch, D., and D. Gems. 2003. Evolution of male longevity bias in nematodes. *Aging Cell* 2:165–173.
- McDonald, G. C., L. G. Spurgin, E. A. Fairfield, D. S. Richardson, and T. Pizzari. 2017. Pre- and postcopulatory sexual selection favor aggressive, young males in polyandrous groups of red junglefowl: SEXUAL SELECTION FAVORS AGGRESSIVE, YOUNG MALES. *Evolution* 71:1653–1669.
- McQueen, D. J., and C. G. H. Steel. 1980. The role of photoperiod and temperature in the initiation of reproduction in the terrestrial isopod *Oniscus asellus* Linnaeus. *Can. J. Zool.* 58:235–240.
- Mead, F. A. 1973. Recherches sur la reproduction et le comportement sexuel des Isopodes terrestres. Université de Provence.
- Medawar, P. B. 1952. An unsolved problem of biology. College.
- Metcalfe, N. 2003. Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Experimental Gerontology* 38:935–940.
- Milewski, L. A. K. 2010. The evolution of ageing. *Bioscience Horizons* 3:77–84.
- Miller, R. H., and G. N. Cameron. 1987. Effects of temperature and rainfall on populations of *Armadillidium vulgare*(Crustacea: Isopoda) in Texas. *American Midland Naturalist* 192–198.
- Mladenovic Djordjevic, A., N. Loncarevic-Vasiljkovic, and E. S. Gonos. 2020. Dietary restriction and oxidative stress: friends or enemies? *Antioxidants & Redox Signaling* ars.2019.7959.
- Mocquard, J. P., P. Juchault, and C. Souty-Grosset. 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial

## REFERENCES

---

- isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). Monografia. Monitore zoologico italiano 4:455–475.
- Monaghan, P., A. Charmantier, D. H. Nussey, and R. E. Ricklefs. 2008. The evolutionary ecology of senescence. *Functional Ecology* 22:371–378.
- Monaghan, P., and N. B. Metcalfe. 2019. The deteriorating soma and the indispensable germline: gamete senescence and offspring fitness. *Proc. R. Soc. B* 286:20192187.
- Moraes-Valenti, P., P. de Moraes, B. de Lima Preto, and W. Valenti. 2010. Effect of density on population development in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic Biology* 9:291–301.
- Moreau, J., and T. Rigaud. 2002. The Shape of Calcium Carbonate Deposits as an External Marker for Female Reproductive Status in Terrestrial Isopods. *Journal of Crustacean Biology* 22:353–356.
- Moreau, J., S. Seguin, Y. Caubet, and T. Rigaud. 2002. Female remating and sperm competition patterns in a terrestrial crustacean. *Animal behaviour* 64:569–577.
- Moskalev, A., A. Aliper, Z. Smit-McBride, A. Buzdin, and A. Zhavoronkov. 2014. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle* 13:1063–1077.
- Mostoslavsky, R., K. F. Chua, D. B. Lombard, W. W. Pang, M. R. Fischer, L. Gellon, P. Liu, G. Mostoslavsky, S. Franco, M. M. Murphy, K. D. Mills, P. Patel, J. T. Hsu, A. L. Hong, E. Ford, H.-L. Cheng, C. Kennedy, N. Nunez, R. Bronson, D. Frendewey, W. Auerbach, D. Valenzuela, M. Karow, M. O. Hottiger, S. Hursting, J. C. Barrett, L. Guarente, R. Mulligan, B. Demple, G. D. Yancopoulos, and F. W. Alt. 2006. Genomic Instability and Aging-like Phenotype in the Absence of Mammalian SIRT6. *Cell* 124:315–329.

## REFERENCES

---

- Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, and J. R. Wu. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. PNAS 85:6622–6626.
- Müller, D. W. H., D. Codron, J. Werner, J. Fritz, J. Hummel, E. M. Griebeler, and M. Clauss. 2012. Dichotomy of eutherian reproduction and metabolism. Oikos 121:102–115.
- Nelson, G., J. Wordsworth, C. Wang, D. Jurk, C. Lawless, C. Martin-Ruiz, and T. von Zglinicki. 2012. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence: Senescence induces senescence. Aging Cell 11:345–349.
- Newbold, T., L. N. Hudson, S. L. L. Hill, S. Contu, I. Lysenko, R. A. Senior, L. Börger, D. J. Bennett, A. Choimes, B. Collen, J. Day, A. De Palma, S. Díaz, S. Echeverria-Londoño, M. J. Edgar, A. Feldman, M. Garon, M. L. K. Harrison, T. Alhusseini, D. J. Ingram, Y. Itescu, J. Kattge, V. Kemp, L. Kirkpatrick, M. Kleyer, D. L. P. Correia, C. D. Martin, S. Meiri, M. Novosolov, Y. Pan, H. R. P. Phillips, D. W. Purves, A. Robinson, J. Simpson, S. L. Tuck, E. Weiher, H. J. White, R. M. Ewers, G. M. Mace, J. P. W. Scharlemann, and A. Purvis. 2015. Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. Nature 520:45–50.
- Norry, F. M., P. Sambucetti, A. C. Scannapieco, and V. Loeschcke. 2006. Altitudinal patterns for longevity, fecundity and senescence in *Drosophila buzzatii*. Genetica 128:81–93.
- Nussey, D. H., H. Froy, J.-F. Lemaitre, J.-M. Gaillard, and S. N. Austad. 2013. Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology. Ageing research reviews 12:214–225.

## REFERENCES

---

- Oberdoerffer, P., and D. A. Sinclair. 2007. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:692–702.
- Ogrodnik, M., H. Salmonowicz, and V. N. Gladyshev. 2019. Integrating cellular senescence with the concept of damage accumulation in aging: Relevance for clearance of senescent cells. *Aging Cell* 18:e12841.
- Packer, C., M. Tatar, and A. Collins. 1998. Reproductive cessation in female mammals. *Nature* 392:807–811.
- Paoletti, M. G., and M. Hassall. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74:157–165.
- Paris, O. H. 1963. The Ecology of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscoidea) in California Grassland: Food, Enemies, and Weather. *Ecological Monographs* 33:1–22.
- Paris, O. H., and F. A. Pitelka. 1962. Population characteristics of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology* 43:229–248.
- Partridge, L., and N. H. Barton. 1993. Optimally, mutation and the evolution of ageing. *Nature* 362:305–311.
- Partridge, L., M. D. W. Piper, and W. Mair. 2005. Dietary restriction in *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development* 126:938–950.
- Petes, L. E., B. A. Menge, and G. D. Murphy. 2007. Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 351:83–91.
- Pianka, E. R. 1972. r and K Selection or b and d Selection? *The American Naturalist* 106:581–588.

## REFERENCES

---

- Pittendrigh, C. S., and S. Daan. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: IV. Entrainment: Pacemaker as clock. *J. Comp. Physiol.* 106:291–331.
- Pizzari, T., R. Dean, A. Pacey, H. Moore, and M. B. Bonsall. 2008. The evolutionary ecology of pre- and post-meiotic sperm senescence. *Trends in Ecology & Evolution* 23:131–140.
- Plot, V., F. Criscuolo, S. Zahn, and J.-Y. Georges. 2012. Telomeres, Age and Reproduction in a Long-Lived Reptile. *PLoS ONE* 7:e40855.
- Powers, E. T., R. I. Morimoto, A. Dillin, J. W. Kelly, and W. E. Balch. 2009. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* 78:959–991.
- Preston, B. T., M. Saint Jalme, Y. Hingrat, F. Lacroix, and G. Sorci. 2015. The sperm of aging male bustards retards their offspring's development. *Nature Communications* 6.
- Promislow, D. 2003. Mate choice, sexual conflict, and evolution of senescence. *Behavior genetics* 33:191–201.
- Promislow, D. E., and P. H. Harvey. 1990a. Living fast and dying young: A comparative analysis of life-history variation among mammals. *Journal of Zoology* 220:417–437.
- Promislow, D. E. L. 1992. Costs of Sexual Selection in Natural Populations of Mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 247:203–210.
- Promislow, D. E. L., and P. H. Harvey. 1990b. Living fast and dying young: A comparative analysis of life-history variation among mammals. *Journal of Zoology* 220:417–437.

## REFERENCES

---

- Radwan, J. 2003. Male age, germline mutations and the benefits of polyandry: Germline mutations, ageing and polyandry. *Ecology Letters* 6:581–586.
- Ram, J. L., and A. J. Costa. 2018. Invertebrates as Model Organisms for Research on Aging Biology \*. Pp. 445–452 in Conn’s Handbook of Models for Human Aging. Elsevier.
- Rando, T. A., and H. Y. Chang. 2012. Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. *Cell* 148:46–57.
- Rera, M., S. Bahadorani, J. Cho, C. L. Koehler, M. Ulgherait, J. H. Hur, W. S. Ansari, T. Lo, D. L. Jones, and D. W. Walker. 2011. Modulation of Longevity and Tissue Homeostasis by the Drosophila PGC-1 Homolog. *Cell Metabolism* 14:623–634.
- Richardson, J., and P. T. Smiseth. 2019. Effects of variation in resource acquisition during different stages of the life cycle on life-history traits and trade-offs in a burying beetle. *J Evol Biol* 32:19–30.
- Ricklefs, R. E., and A. Scheuerlein. 2001. Comparison of aging-related mortality among birds and mammals. *Experimental Gerontology* 36:845–857.
- Roach, D. A., and E. F. Smith. 2020. Life-history trade-offs and senescence in plants. *Funct Ecol* 34:17–25.
- Robins, C., and K. N. Conneely. 2014. Testing evolutionary models of senescence: traditional approaches and future directions. *Human Genetics* 133:1451–1465.
- Rockhill, E., K. Schammel, A. Reyes-Guzman, Z. Harris, and J. Wright. 2019. Nitrogen excretion during marsupial development in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 227:92–99.

## REFERENCES

---

- Rodriguez, J., V. Boulo, E. Mialhe, and E. Bachere. 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science* 108:1043–1050.
- Rodríguez-Muñoz, R., J. J. Boonekamp, X. P. Liu, I. Skicko, D. N. Fisher, P. Hopwood, and T. Tregenza. 2019. Testing the effect of early-life reproductive effort on age-related decline in a wild insect. *Evolution* 73:317–328.
- Ronget, V., and J. Gaillard. 2020. Assessing ageing patterns for comparative analyses of mortality curves: Going beyond the use of maximum longevity. *Funct Ecol* 34:65–75.
- Rushton, S. P., and M. Hassall. 1983. The effects of food quality on the life history parameters of the terrestrial isopod (*Armadillidium vulgare*(Latreille)). *Oecologia* 57:257–261.
- Russell, S. J., and C. R. Kahn. 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:681–691.
- Sager, R. 1991. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environmental Health Perspectives* 93:59–62.
- Salminen, A., K. Kaarniranta, and A. Kauppinen. 2012. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 4:166–175.
- Sarakatsanou, A., A. D. Diamantidis, S. A. Papanastasiou, K. Bourtzis, and N. T. Papadopoulos. 2011. Effects of Wolbachia on fitness of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Wolbachia affects the fitness of *C. capitata*. *Journal of Applied Entomology* 135:554–563.

## REFERENCES

---

- Sasson, D. A., S. L. Johnson, and H. J. Brockmann. 2012. The role of age on sperm traits in the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Animal Behaviour* 84:975–981.
- Seddon, N., W. Amos, R. A. Mulder, and J. A. Tobias. 2004. Male heterozygosity predicts territory size, song structure and reproductive success in a cooperatively breeding bird. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271:1823–1829.
- Sharp, S. P., and T. H. Clutton-Brock. 2010. Reproductive senescence in a cooperatively breeding mammal. *Journal of Animal Ecology* 79:176–183.
- Shaw, A. C., S. Joshi, H. Greenwood, A. Panda, and J. M. Lord. 2010. Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology* 22:507–513.
- Shaw, M. J. P. 1970. Effects of population density on alienicolae of *Aphis fabae* Scop.: II. The effects of crowding on the expression of migratory urge among alatae in the laboratory. *Annals of Applied Biology* 65:197–203.
- Shay, J. W., and W. E. Wright. 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26:867–874.
- Shefferson, R. P., O. R. Jones, and R. Salguero-Gómez. 2017a. Introduction: Wilting Leaves and Rotting Branches: Reconciling Evolutionary Perspectives on Senescence. Pp. 1–20 in R. P. Shefferson, O. R. Jones, and R. Salguero-Gómez, eds. *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Shefferson, R. P., O. R. Jones, and R. Salguero-Gómez (eds). 2017b. *The Evolution of Senescence in the Tree of Life*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Siebold, A. P., R. Banerjee, F. Tie, D. L. Kiss, J. Moskowitz, and P. J. Harte. 2010. Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:169–174.

## REFERENCES

---

- Simm, A., N. Nass, B. Bartling, B. Hofmann, R.-E. Silber, and A. Navarrete Santos. 2008. Potential biomarkers of ageing. *Biological Chemistry* 389.
- Skulachev, V. P. 1997. Aging is a specific biological function rather than the result of a disorder in complex living systems: biochemical evidence in support of Weismann's hypothesis. *Biochemistry Mosc.* 62:1191–1195.
- Smigel, J. T., and A. G. Gibbs. 2008. Conglobation in the pill bug, *Armadillidium vulgare*, as a water conservation mechanism. *J Insect Sci* 8.
- Souty-Grosset, C. 1984. Contribution à l'étude de la synthèse des constituants du vitellus protéique et de son contrôle humoral chez deux Crustacés isopodes *Idotea balthica* ba ster i Audouin (Valvifère) et *Porcellio dilatatus* Brandt (Oniscoïde). Université de Poitiers.
- Souty-Grosset, C., I. Badenhausser, J. D. Reynolds, and A. Morel. 2005. Investigations on the potential of woodlice as bioindicators of grassland habitat quality. *European Journal of Soil Biology* 41:109–116.
- Souty-Grosset, C., A. Chentoufi, J. P. Mocquard, and P. Juchault. 1988. Seasonal reproduction in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille): geographical variability and genetic control of the response to photoperiod and temperature. *International journal of invertebrate reproduction and development* 14:131–151.
- Souty-Grosset, C., K. Nasri, P. Juchault, D. Bouchon, W. Jassem, and J. P. Mocquard. 1993. Reproduction et diversité de la réponse à la température et à la photopériode chez les crustacés isopodes terrestres. *Bull. Soc. Ecophysiol* 18:5–21.
- Speakman, J. R., and S. E. Mitchell. 2011. Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine* 32:159–221.

## REFERENCES

---

- Sprott, R. L. 2010. Biomarkers of aging and disease: Introduction and definitions. *Experimental Gerontology* 45:2–4.
- Stearns, S. C. 1992. The evolution of life histories. Oxford University Press Oxford.
- Storer, M., A. Mas, A. Robert-Moreno, M. Pecoraro, M. C. Ortells, V. Di Giacomo, R. Yosef, N. Pilpel, V. Krizhanovsky, J. Sharpe, and W. M. Keyes. 2013. Senescence Is a Developmental Mechanism that Contributes to Embryonic Growth and Patterning. *Cell* 155:1119–1130.
- Surbida, K., and J. C. Wright. 2001. Embryo tolerance and maternal control of the marsupial environment in *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). *Physiological and Biochemical Zoology* 74:894–906.
- Suzuki, S. 2001. Structural changes of the female genitalia during a reproductive cycle in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*. *Invertebrate Reproduction & Development* 40:9–15.
- Suzuki, S., and A. Ziegler. 2005. Structural investigation of the female genitalia and sperm-storage sites in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Isopoda). *Arthropod Structure & Development* 34:441–454.
- Tagami, Y., K. Miura, and R. Stouthamer. 2001. How Does Infection with Parthenogenesis-Inducing Wolbachia Reduce the Fitness of *Trichogramma*? *Journal of Invertebrate Pathology* 78:267–271.
- Takeda, N. 1980. The aggregation pheromone of some terrestrial isopod crustaceans. *Experientia* 36:1296–1297.
- Thorin-Trescases, N., G. Voghel, N. Farhat, A. Drouin, M.-È. Gendron, and È. Thorin. 2010. Âge et stress oxydant vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *médecine/sciences* 26:875–880.

## REFERENCES

---

- Tidière, M. 2016. The diversity of actuarial senescence across mammals : demographic data from captive populations reveal the influence of sexual selection. Université de Lyon.
- Tidière, M., A. Badruna, D. Fouchet, J.-M. Gaillard, J.-F. Lemaître, and D. Pontier. 2020. Pathogens Shape Sex Differences in Mammalian Aging. *Trends in Parasitology* 36:668–676.
- Tidière, M., J.-M. Gaillard, V. Berger, D. W. Müller, L. B. Lackey, O. Gimenez, M. Clauss, and J.-F. Lemaître. 2016. Comparative analyses of longevity and senescence reveal variable survival benefits of living in zoos across mammals. *Scientific reports* 6:36361.
- Valenzano, D. R., E. Terzibasi, A. Cattaneo, L. Domenici, and A. Cellerino. 2006. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 5:275–278.
- van Deursen, J. M. 2014. The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509:439–446.
- Vandel, A. 1962. Faune de France 64 et 66 : les Isopodes terrestres, tome 1 et 2. Paul LECHEVALIER, Paris.
- Vandel, A. 1960. Isopodes terrestres (première partie). Paul LECHEVALIER. Paris.
- Vaupel, J., A. Baudisch, M. Dölling, D. A. Roach, and J. Gampe. 2004. The case for negative senescence. *Theoretical Population Biology* 65:339–351.
- Vega-Trejo, R., R. J. Fox, M. Iglesias-Carrasco, M. L. Head, and M. D. Jennions. 2019. The effects of male age, sperm age and mating history on ejaculate senescence. *Funct Ecol* 33:1267–1279.

## REFERENCES

---

- Venturelli, P. A., B. J. Shuter, and C. A. Murphy. 2009. Evidence for harvest-induced maternal influences on the reproductive rates of fish populations. *Proc. R. Soc. B* 276:919–924.
- Wallace, A. R. 1889. The action of natural selection in producing old age, decay and death [A note by Wallace written “some time between 1865 and 1870.”]. *P. in In:* Weismann A. Essays Upon Heredity and Kindred Biological Problems. Clarendon Press, Oxford.
- Warburg, M. R., and M. Rosenberg. 1996. Brood-pouch structures in terrestrial isopods. *Invertebrate Reproduction & Development* 29:213–222.
- Webster, A. J. F. 1983. Environmental Stress and the Physiology, Performance and Health of Ruminants. *Journal of Animal Science* 57:1584–1593.
- Wedell, N., M. J. G. Gage, and G. A. Parker. 2002. Sperm competition, male prudence and sperm-limited females. *Trends in Ecology & Evolution* 17:313–320.
- Weindruch, R., R. L. Walford, S. Fligiel, and D. Guthrie. 1986. The Retardation of Aging in Mice by Dietary Restriction: Longevity, Cancer, Immunity and Lifetime Energy Intake. *The Journal of Nutrition* 116:641–654.
- Weismann, A. 1982. Das Keimplasma: eine Theorie der Vererbung. Fischer. Jena, Germany.
- Wharton, D. R. A., J. E. Lola, and M. L. Wharton. 1968. Growth factors and population density in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology* 14:637–653.
- Wickham, H. 2011. ggplot2: ggplot2. *WIREs Comp Stat* 3:180–185.

## REFERENCES

---

- Wiersma, P., A. Munoz-Garcia, A. Walker, and J. B. Williams. 2007. Tropical birds have a slow pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:9340–9345.
- Williams, G. C. 1957. Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Evolution* 11: 398-411. 1966 *Adaptation and Natural Selection*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Williams, S. L. 2001. REDUCED GENETIC DIVERSITY IN EELGRASS TRANSPLANTATIONS AFFECTS BOTH POPULATION GROWTH AND INDIVIDUAL FITNESS. *Ecological Applications* 11:1472–1488.
- Wolf, N. S. (ed). 2010. *The Comparative Biology of Aging*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Xirocostas, Z. A., S. E. Everingham, and A. T. Moles. 2020. The sex with the reduced sex chromosome dies earlier: a comparison across the tree of life. *Biol. Lett.* 16:20190867.
- Zajitschek, F., R. Bonduriansky, S. R. K. Zajitschek, and R. C. Brooks. 2009. Sexual Dimorphism in Life History: Age, Survival, and Reproduction in Male and Female Field Crickets *Teleogryllus commodus* under Seminatural Conditions. *The American Naturalist* 173:792–802.
- Zajitschek, F., S. Zajitschek, and R. Bonduriansky. 2020. Senescence in wild insects: Key questions and challenges. *Funct Ecol* 34:26–37.
- Zhang, C., and A. M. Cuervo. 2008. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat Med* 14:959–965.

Zhang, G., J. Li, S. Purkayastha, Y. Tang, H. Zhang, Y. Yin, B. Li, G. Liu, and D. Cai. 2013.  
Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH.  
Nature 497:211–216.

## ANNEXE 1 : Résultats préliminaires tests environnementaux

---

## **Impact of temperature and photoperiod on survival and biomarkers of senescence in common woodlouse**

Charlotte DEPEUX<sup>1,2\*</sup>, Ascel SAMBA-LOUAKA<sup>1</sup>, Christine BRAQUART-VARNIER<sup>1</sup>, Jérôme MOREAU<sup>3</sup>, Jean-François LEMAÎTRE<sup>2</sup>, Tiffany LAVERRE<sup>1</sup>, Hélène PAUHLAC<sup>1</sup>, François-Xavier DECHAUME-MONCHARMONT<sup>3</sup>, Jean-Michel GAILLARD<sup>2</sup>, Sophie BELTRAN-BECH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Poitiers, Laboratoire Ecologie et Biologie des interactions, UMR CNRS 7267, 5 rue Albert Turpin, TSA 51106 86073 POITIERS Cedex 9, France.

<sup>2</sup> Université de Lyon, F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France

<sup>3</sup> Biogéosciences, UMR 6282 CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

\* Corresponding author: [charlotte.depeux@gmail.com](mailto:charlotte.depeux@gmail.com)

Declarations of interest: none

### **Abstract**

Most living organisms display a decline in physiological performances when ageing, a process called senescence that is most often associated with increased mortality risk. Previous researches have shown that both the timing and the intensity of senescence vary a lot within and among species, but the role of environmental factors in this variation is still poorly understood. To fill this knowledge gap, we investigated the impact of environmental conditions on the strength of senescence using an experimental design applied to a population of common woodlouse *Armadillidium vulgare* intensively monitored in the lab. Cellular senescence biomarkers are available in woodlouse and are age-related. These biomarkers provide relevant biomarkers to test the impact of environmental conditions, through changes in temperature and photoperiod, on individuals of the same age maintained in different environmental conditions. We found different effects of the environmental changing: the increasing of day light modification leaded the same effect as age on our senescence biomarkers while temperature modifications leaded the opposite effect as age on the  $\beta$ -

galactosidase activity and cell size. We also demonstrated the existence of sex-specific responses to changes in environmental conditions. By using an experimental approach and biomarkers of senescence in woodlouse, we show that environmental conditions and sex both shape the diversity observed in senescence patterns of woodlouse and underline the importance of identifying senescence biomarkers to understand how environmental conditions influence the evolution of senescence.

### Keywords

*Armadillidium vulgare*, cellular senescence, immunosenescence, environmental impact, invertebrates

### 1. Introduction

Senescence is generally defined as a progressive decline in physiological performances that leads to a decrease in the probability to reproduce (i.e. reproductive senescence) or survive (i.e. actuarial senescence) with increasing age (Monaghan et al., 2008). This process is nearly ubiquitous in the living world ((Nussey et al., 2013)) but displays a tremendous diversity of patterns across the tree of life (Jones et al., 2014; Shefferson et al., 2017). Whatever the studied trait, both timing and intensity of senescence strongly vary across species (Jones et al., 2014; Nussey et al., 2011), populations (Hassall et al., 2017; Tidière et al., 2016), and individuals (Bérubé et al., 1999). Many studies aiming to understand the diversity of senescence patterns at different levels of the biological organization have suggested that environmental conditions are likely to play a significant role (Fontana et al., 2010; Martin et al., 1996). For instance, resource competition in early life can strengthen both actuarial and body mass senescence in wild populations of mammals (Nussey et al., 2007; Beirne et al., 2015). However, environmental conditions can potentially influence senescence in a sex-specific way, as evidenced for other life-history traits. For instance, in the neriid fly (*Telostylinus angusticollis*), a dietary restriction caused the complete female infertility, whereas in males, the negative effect of dietary restriction on reproduction was effective only when they received a rich larval diet and when they were housed with females (Adler et al., 2013). In the Alpine marmot, (*Marmota marmota*), the social environment lead strongly different actuarial senescence patterns between males and females (Berger et al., 2018). Sex-specific effects of environmental conditions on senescence thus need to be investigated. Moreover, to thoroughly understand how

environmental conditions modulate observed patterns of senescence, their specific impact on organisms must be separately quantified. Here, we provide such a study by investigating cellular senescence in the common woodlouse *Armadillidium vulgare*. This terrestrial isopod can live up to three years (Paris and Pitelka, 1962) and is highly sensitive to environmental conditions, especially when they involve changes in photoperiod and temperature. In fact, these parameters are closely related to reproduction and water loss (Brody et al., 1983; Hassall et al., 2018; Mocquard et al., 1989, 1980; Smigel and Gibbs, 2008; Souty-Grosset et al., 1988). Overall, woodlouse can be easily controlled and monitored in the laboratory and thereby constitutes a very relevant model to test whether and how environmental conditions impact senescence patterns.

Biomarkers of senescence correspond to biological parameters that allow predicting the functional capability of an organism better than its chronological age (Baker and Sprott, 1988). At the cellular scale, senescence corresponds to the cellular deterioration leading stop of the cellular cycle (Campisi and di Fagagna, 2007). As ageing is associated with cellular senescence (Herbig et al., 2006; Lawless et al., 2010; Wang et al., 2009), cellular biomarkers provide reliable metrics to study senescence. One of the most popular biomarker of senescence is based on the lysosomal activity of the  $\beta$ -galactosidase enzyme, which increases when the cell enters in senescence (Dimri et al., 1995; Itahana et al., 2007). The activity of the  $\beta$ -galactosidase has mostly been used to study the senescence of mammalian cells (Gary and Kindell, 2005), but has also been successfully used to detect both senescence in honeybees (Hsieh and Hsu, 2011) and effect of lower temperature on senescence of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* (Valenzano et al., 2006). Likewise, the decline in immune performance with increasing age (i.e. immunosenescence) can also provide a suitable biomarker of senescence. A diminution of the number of effective immune cells has thus been reported in wild vertebrates (Cheynel et al., 2017) but also in invertebrates including mosquitoes *Aedes aegypti* (Hillyer et al., 2004) and crickets *Gryllus assimilis* (Park et al., 2011). In this later species, the immunosenescence also involves a decrease of the melanotic module formation, which increases damage of immune cells, and then modifies the immune cell composition (Park et al., 2011). Moreover, senescent cells are bigger than non-senescent cells (Hayflick, 1965; Rodier and Campisi, 2011). Overall the viability and the size of immune cells reliably indicate the level of individual immunosenescence. In biomedical research, biomarkers of

immunosenescence are routinely used to assess the role of stressful environmental conditions on ageing (Piazza et al., 2010).

In this study, we used measurements of senescence biomarkers specific to *A. vulgare* (Depeux et al., 2019) as metrics to quantify the impact of changes in temperature and photoperiod on individuals of the same age experimentally maintained in different conditions of temperature or photoperiod. We expected the effect of temperature and photoperiod to shape specific variations on the senescence biomarkers and survival in female and male woodlice.

## 2. Materials & Methods

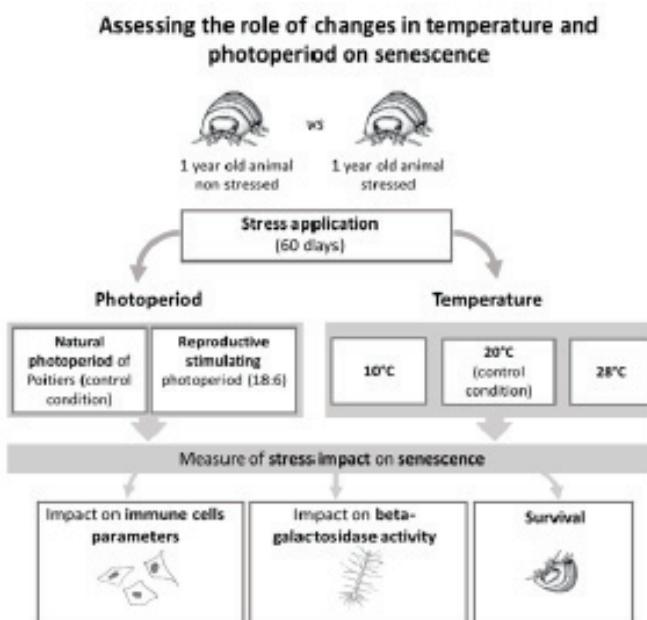
### 2.1 Biological model

Individual *A. vulgare* used in the following experiments were derived from wild populations and have been monitored in lab conditions over ten years. Individuals have been maintained on moistened soil with the natural photoperiod of Poitiers (France 46.58°N, 0.34°E, 20°C) at 20°C with food (i.e. dried linden leaves and carrots) *ad libitum*. Crosses were monitored to control genetic diversity. For each clutch obtained, individuals were sexed, and brothers and sisters were separated to ensure virginity.

In common woodlouse, individuals moult throughout their lives according to a molting cycle (Lawlor, 1976). At 20°C, they approximately moult once per month (Steel, 1980) and all the cells of the concerned tissues are renewed. However, the brain, the nerve cord, part of the digestive tract and gonads are not part of tissues renewed during molting and are therefore good candidates for tissue-specific study of senescence in this species. In addition to molting regularly, the female woodlouse exhibits specific molts related to reproduction (Moreau and Rigaud, 2002). These molts and more generally the onset of reproduction are influenced by environmental conditions: both increased temperature and longer days stimulate the onset of reproduction (Mocquard et al., 1989). The reproductive period occurs during spring.

### 2.2 Experimental design

We tested the effect of environmental factors on senescence in *A.vulgare* on the survival and on our senescence biomarkers (Figure 1). The different protocols were applied to males and females separately to assess the effect of sex on senescence patterns.

**Figure 1 Experimental Design**

600 individuals were used to test the impact of changes in temperature and photoperiod on survival and biomarkers of senescence: 120 individuals by experimental (or control) condition composed of 60 females and 60 males. We estimated 60 days after exposure to different temperature and photoperiod conditions the survival of these 120 individuals (by condition). More specifically, 30 (15 males and 15 females) individuals were sampled to measure the impact of changes in temperature and in photoperiod on immune cells and on  $\beta$ -galactosidase activity using the photoperiod experimental or control protocols and the temperature protocols at 10°C and 20°C. For the temperature protocol at 28°C, fewer females (25) and males (20) were sampled because of the lower survival rate under these conditions.

To measure the effect of temperature and photoperiod on senescence, we used 120 individuals by experimental (or control) condition (i.e. natural photoperiod, stimulating photoperiod, 10°C, 20°C and 28°C) composed of 1 year old individuals (60 females and 60 males). At the beginning of the experience, the same quantity of soil and 5g of dry food were weighed, rehydrated, and disposed in boxes (length x width x height: 26.5 x 13.5 x 7.5 cm). To test the impact of photoperiod, we exposed *A. vulgare* to either natural photoperiod (corresponding to the photoperiod observed from January to March at Poitiers) as controlled conditions or a photoperiod stimulating woodlouse reproduction (18:6 D/N) as experimental conditions at a temperature of 20°C. To test the effect of temperature, we exposed *A. vulgare* to three different temperatures: 20°C corresponding to controlled conditions, 10°C corresponding to supposed stressful cold conditions, and 28°C corresponding to supposed stressful "hot" conditions. After 60 days of exposure at the five different conditions, individuals were enumerated to estimate survival. Survivors were then maintained in normal laboratory conditions (i.e. at 20°C under natural photoperiod) during two months until the measures of cellular senescence using senescence biomarkers previously developed. The survival at

different temperatures was estimated from 120 individuals. To estimate the cellular senescence on biomarkers of senescence, 30 individuals from each sex were collected from each environmental condition except at 28°C, when high mortality forced us to collect only 20 males and 25 females. The measure of immune cell parameters was realized at the individual scale when the measurement of the  $\beta$ -galactosidase required a pool of 5 nerve cords (i.e. from 5 individuals) to obtain enough biological material. In this way, the hemolymph sampling was achieved in each individual before dissection of the animals and reunification of the nerve cords of 5 animals.

### **2.3 Measure of immune cell parameters**

To study the impact of environmental conditions on the immune parameters, 3  $\mu$ L of haemolymph were collected per individual. A hole was bored in the middle of the 6<sup>th</sup> segment and 3  $\mu$ L of haemolymph were collected with an eyedropper and deposited promptly in 15  $\mu$ L of MAS-EDTA (EDTA 9 mM, Trisodium citrate 27 mM, NaCl 336 mM, Glucose 115 mM, pH 7, (Rodriguez et al., 1995)). Then, 6  $\mu$ L of Trypan blue at 0.4% (Invitrogen) were added to permit the coloration of dead cells. Thereafter, 10  $\mu$ L of this solution were deposited in (Invitrogen Coutness®) counting slide (Thermofisher). The immune cell density, the immune cell viability and the immune cell size were evaluated using an automated Cell Counter (Invitrogen Countess®).

### **2.4 Measure of $\beta$ -galactosidase activity**

To test the impact of environmental conditions on  $\beta$ -galactosidase activity, individuals were dissected separately in Ringer (Sodium Chloride 394 mM, Potassium Chloride 2 mM, Calcium Chloride 2 mM, Sodium Bicarbonate 2 mM) and nerve cord was removed. Nerve cords were chosen because they are not regenerated during molting. To obtain a sufficient quantity of protein, we made pools of five nerve cords (from five different individuals of the same age). The five nerve cords were filed in 500  $\mu$ L of Lyse Buffer 1X (CHAPS 5 mM, Citric acid 40 mM, Sodium Phosphate 40 mM, Benzamidine 0.5 mM, PMSF 0.25 mM, pH = 6) (Gary and Kindell, 2005). Samples were centrifuged at 15000g at 4°C for 30 minutes. The supernatant was taken and kept at -80°C until its utilization. The protein concentration was determined by the BCA assay (Thermofisher) and were homogenized at 0.1 mg/mL.

The  $\beta$ -galactosidase activity was measured as previously described by Gary and Kindell (2005). Briefly, 100  $\mu$ L of protein extract at the concentration of 0.1 mg/mL were added to 100  $\mu$ L of reactive 4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside (MUG) solution in a 96 well-microplate. The MUG reactive, in contact to  $\beta$ -galactosidase, leads

by hydrolysis to the synthesis of 4-methylumbelliflferone (4-MU), which is detectable using fluorescent measurement. Measures were performed by the multimode microplate reader Mithras LB940 HTS III, Berthold; excitation filter: 120 nm, emission filter 460 nm, for 120 minutes. Two technical replicates were measured for each pool.

## 2.5 Statistical analysis

The  $\beta$ -galactosidase activity was analyzed with linear mixed effect models using the R package lme4 (Bates et al., 2014). As two technical replicates were measured for each pool, the model including the pools fitted as a random effect and age, photoperiod or temperature, and sex and their two-way interactions as fixed factors. Linear models with Gaussian distribution were fitted to analyze variation in the cell size and viability. For the cell density, a linear model of the cell number (log-transformed, Ives and Freckleton Robert, 2015) was fitted. Survival in different conditions of temperature and photoperiod was analyzed with generalized models (with a binomial error). All results were obtained by stepwise backward selection model. The effect size of temperature and photoperiod on the  $\beta$ -galactosidase activity and immune parameters was measured by rescaling and standardized slopes were reported as a measure of effect size (Schielzeth, 2010).

## 3. Results

### 3.1 Photoperiod

Stimulating photoperiod did not have any detectable influence on survival in each sex ( $X^2_1=0.20$ ,  $p=0.65$  and  $X^2_1=1.96$ ,  $p=0.16$  for males and females, respectively) but led to a higher  $\beta$ -galactosidase activity, ( $X^2_1=3.86$ ,  $p=0.05$ ) and did not influence the size ( $F_{1,108}=0.264$ ,  $p=0.61$ ) density ( $F_{1,108}=0.54$ ,  $p=0.54$ ) or viability ( $F_{1,108}=0.83$ ,  $p=0.36$ ) of immune cells (Figure 2).

Sex did not impact significantly the  $\beta$ -galactosidase activity ( $X^2_1=1.96$ ,  $p=0.16$ ), the size ( $F_{2,108}=0.32$ ,  $p=0.57$ ), density ( $F_{2,108}=0.41$ ,  $p=0.52$ ) or viability ( $F_{2,108}=1.50$ ,  $p=0.22$ ) of immune cells (Figure 2).

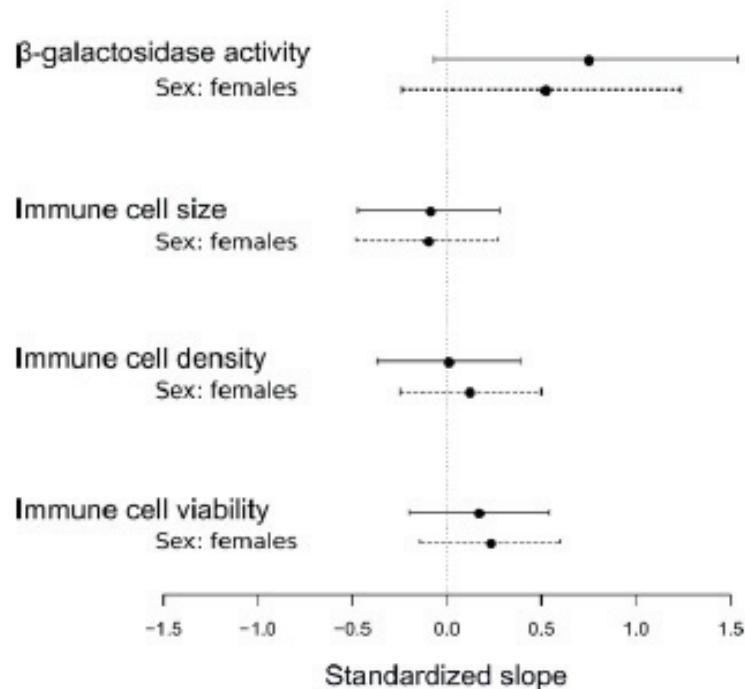


Figure 2 Effect size of photoperiod stress on the  $\beta$ -galactosidase activity, immune cell size, immune cell density and immune cell viability

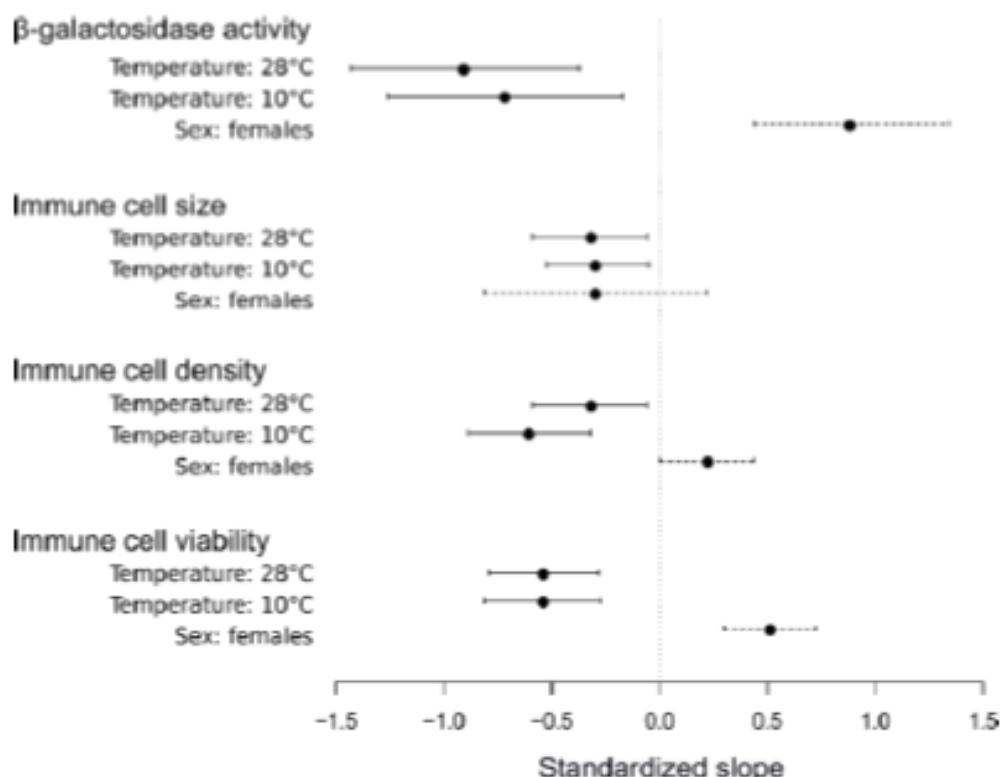
This figure synthesizes the effect size with bootstrapped 95% CI of non-optimal photoperiod (solid lines), with the sex effect (dotted line) for each senescence biomarkers studied. In each case, the effect is relative to the control condition (natural photoperiod for stimulating photoperiod) and for the sex, females were compared to males.

### 3.2 Temperature

At 28°C, the survival of animals decreased ( $X^2_1=47.48$ ,  $p<0.001$ ). However, at 10°C, survival of animals was not impacted ( $X^2_1=0.42$ ,  $p=0.51$ ). Temperature had an influence (Figure 3) on the  $\beta$ -galactosidase activity ( $X^2_2=12.2$ ,  $p=0.002$ ), on the cell size ( $F_{2,291}=7.96$ ,  $p=0.01$ ), but also on cell density ( $F_{3,290}=9.24$ ,  $p=0.001$ ) and viability ( $F_{3,290}=19.37$ ,  $p<0.001$ ). In fact,  $\beta$ -galactosidase activity showed lower values in the two stressful temperature conditions (i.e. 10°C ( $X^2_1=9.67$ ,  $p=0.002$ ) and 28°C ( $X^2_1=3.85$ ,  $p=0.05$ )) than in the control condition (i.e. 20°C). Under stressful temperature of 10°C cells were smaller than in temperature 20°C ( $F_{2,207}=9.24$ ,  $p=0.006$ ). The density of immune cells was lower under the stressful temperature 10°C ( $X^2_1=18.96$ ,  $p<0.001$ ) and 28°C ( $X^2_1=7.06$ ,  $p=0.008$ ) as the cell viability (Respectively:  $X^2_1=15.98$ ,  $p<0.001$ ;  $X^2_1=15.80$ ,  $p<0.001$ ).

A sex effect was also detected with a higher  $\beta$ -galactosidase activity in females than in males ( $X^2_1=16.95$ ,  $p<0.001$ , Figure 3). The cell density was higher in females ( $F_{3,290}=4.01$ ,  $p=0.05$ ) as was the cell viability ( $F_{3,290}=19.61$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 3). No

detectable difference occurred between females and males in cell size ( $F_{3,290}=0.46$ ,  $p=0.49$ , Figure 3).



**Figure 3: Effect size of temperature stresses on the  $\beta$ -galactosidase activity, immune cell size, immune cell density and immune cell viability**  
This figure synthetizes the effect size with bootstrapped 95% CI of temperatures (solid lines), with the sex effect (dotted line) for each senescence biomarkers studied. In each case, the effect is relative to the control condition (temperature 20°C for temperatures 10°C and 20°C) and for the sex, females were compared to males.

#### 4. Discussion

To understand the diversity of senescence patterns described across the tree of life, the role of interplaying environmental factors must be identified. Our experiments provide clear evidence that changes in photoperiod and temperature influence biomarkers of senescence in *A. vulgare* and temperature influences survival too. These results suggest that environmental condition likely shape senescence patterns in *A. vulgare*.

We aimed to test the impact of environmental conditions on woodlouse senescence by using two distinct environmental stressors: the photoperiod and the temperature. While the elongation of the day light caused an increase of the  $\beta$ -

galactosidase activity without any negative impact on survival and immune cells, cold condition led to smaller cell size. At 28°C (hot condition), survival being affected, we cannot totally exclude the hypothesis that the dead individuals did not have exactly the same profile as the survivors on the measured biomarkers. Anyhow, lower and higher temperatures than 20°C seems to induce lower  $\beta$ -galactosidase activity and decreased cell density and viability. Results obtained in biomarkers were highly different and underlined the important role of environmental factors on senescence. In *Drosophila melanogaster*, exposition to high temperature lead the shortening of the lifespan (Garcia et al., 2010) while caloric restriction often leads to extended lifespan in different species, from rats to worms (Koubova, 2003). However, strong modulations in humidity levels do not allow us to conclude on the effect of temperature per se, but on the combined effect of a change in temperature and associated humidity. An experiment allowing the control of humidity in parallel with temperature would allow to really understand the effect of this variable on the senescence patterns. In our study on *A. vulgare*, we observed that different environmental stresses could also lead opposite effects on the same biomarkers. These results suggest that stress effects observed in lifespan need to be study at the cellular scale to understand phenomenon implied.

Moreover, old females had a higher  $\beta$ -galactosidase activity and a better immune cell density and viability than males in stressed conditions. These results could be explained by a more effective immune system in females as often observed in the living world (Nunn et al., 2009). However, previous study in *A. vulgare* suggests the opposite: in Sicard et al. (2011), one-year-old males showed a higher cell density than females of the same age. We supposed that, according to their life history traits, different gender strategies exist in *A. vulgare* as suggested previously in (Paris and Pitelka, 1962) and our study indicates that these strategies are shaped by environmental conditions.

## 5. Conclusion

Our study confirms that *A. vulgare* presents all characteristics required to study senescence. Our findings in this species support the hypothesis that the diversity of senescence patterns observed among species results from complex interactions between sex and environmental conditions. The development of a variety of biomarkers including telomerase activity and telomere size could allow getting a deeper understanding of the impact of environmental conditions on senescence

patterns. Assessing how different environmental stressors influence biomarkers should help to identify the drivers of the great diversity of senescence patterns in the living world.

### Acknowledgements

We would like to thank Sylvine Durand, Isabelle Giraud and Bouziane Moumen for our constructive discussions as well as Maryline Raimond and Alexandra Lafitte for technical assistance. We would also like to thank Richard Cordaux and Xavier Bonnet for their constructive comments.

### Funding

This work was supported by the 2015–2020 State-Region Planning Contract and European Regional Development Fund and intramural funds from the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Poitiers. J.F.L. and J.M.G. are supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE32-0002-01 to J.F.L.). This work has also received funding from the "Appel à projets de recherche collaborative inter-équipes 2016-2017" by the laboratory EBI.

### Bibliography

- Adler, M.I., Cassidy, E.J., Fricke, C., Bonduriansky, R., 2013. The lifespan-reproduction trade-off under dietary restriction is sex-specific and context-dependent. *Exp. Gerontol.* 48, 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.03.007>
- Baker, G.T., Sprott, R.L., 1988. Biomarkers of aging. *Exp. Gerontol.*, Special Issue Biomarkers of Aging 23, 223–239. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(88\)90025-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(88)90025-3)
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S., 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *ArXiv Prepr. ArXiv14065823*.
- Beirne, C., Delahay, R., Young, A., 2015. Sex differences in senescence: the role of intra-sexual competition in early adulthood. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282, 20151086. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1086>
- Berger, V., Lemaître, J.-F., Allainé, D., Gaillard, J.-M., Cohas, A., 2018. Early and adult social environments shape sex-specific actuarial senescence patterns in a cooperative breeder. *Am. Nat.* 192, 525–536. <https://doi.org/10.1086/699513>
- Bérubé, C.H., Festa-Bianchet, M., Jorgenson, J.T., 1999. Individual differences, longevity, and reproductive senescence in bighorn ewes. *Ecology* 80, 2555–2565.
- Brody, M.S., Edgar, M.H., Lawlor, L.R., 1983. A cost of reproduction in a terrestrial isopod. *Evolution* 37, 653–655. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1983.tb05586.x>

- Campisi, J., di Fagagna, F. d'Adda, 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729.
- Cheynel, L., Lemaître, J.-F., Gaillard, J.-M., Rey, B., Bourgoin, G., Ferté, H., Jégo, M., Débias, F., Pellerin, M., Jacob, L., Gilot-Fromont, E., 2017. Immunosenescence patterns differ between populations but not between sexes in a long-lived mammal. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13686-5>
- Depeux, C., Samba-Louaka, A., Becking, T., Braquart-Varnier, C., Moreau, J., Lemaitre, J.-F., Laverré, T., Paulhac, H., Dechaume-Moncharmont, F.-X., Gaillard, J.-M., Beltran-Bech, S., 2019. Development of senescence biomarkers in the common woudlouse. In Prep.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9363–9367.
- Fontana, L., Partridge, L., Longo, V.D., 2010. Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science* 328, 321–326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Garcia, A.M., Calder, R.B., Dollé, M.E.T., Lundell, M., Kapahi, P., Vijg, J., 2010. Age- and temperature-dependent somatic mutation accumulation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 6, e1000950. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000950>
- Gary, R.K., Kindell, S.M., 2005. Quantitative assay of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.* 343, 329–334.
- Hassall, C., Amaro, R., Ondina, P., Outeiro, A., Cordero-Rivera, A., San Miguel, E., 2017. Population-level variation in senescence suggests an important role for temperature in an endangered mollusc. *J. Zool.* 301, 32–40.
- Hassall, M., Moss, A., Dixie, B., Gilroy, J.J., 2018. Interspecific variation in responses to microclimate by terrestrial isopods: implications in relation to climate change. *ZooKeys* 801, 5–24. <https://doi.org/10.3897/zookeys.801.24934>
- Hayflick, L., 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., Sedivy, J.M., 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science* 311, 1257. <https://doi.org/10.1126/science.1122446>
- Hillyer, J.F., Schmidt, S.L., Fuchs, J.F., Boyle, J.P., Christensen, B.M., 2004. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers: Age-associated mortality in *Aedes aegypti*. *Cell. Microbiol.* 7, 39–51. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00430.x>
- Hsieh, Y.-S., Hsu, C.-Y., 2011. Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Exp. Gerontol.* 46, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.007>
- Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G.P., 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated  $\beta$ -galactosidase assay. *Biol. Aging Methods Protoc.* 21–31.
- Ives, A.R., Freckleton Robert, 2015. For testing the significance of regression coefficients, go ahead and log-transform count data. *Methods Ecol. Evol.* 6, 828–835. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12386>
- Jones, O.R., Scheuerlein, A., Salguero-Gómez, R., Camarda, C.G., Schaible, R., Casper, B.B., Dahlgren, J.P., Ehrlén, J., Garcia, M.B., Menges, E.S., Quintana-Ascencio, P.F., Caswell, H., Baudisch, A., Vaupel, J.W., 2014. Diversity of

- ageing across the tree of life. *Nature* 505, 169–173. <https://doi.org/10.1038/nature12789>
- Koubova, J., 2003. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 17, 313–321. <https://doi.org/10.1101/gad.1052903>
- Lawless, C., Wang, C., Jurk, D., Merz, A., Zglinicki, T. von, Passos, J.F., 2010. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.* 45, 772–778. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.018>
- Lawlor, L.R., 1976. Parental investment and offspring fitness in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille) (Crustacea: Oniscidea). *Evolution* 30, 775–785. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1976.tb00958.x>
- Martin, G.M., Austad, S.N., Johnson, T.E., 1996. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat. Genet.* 13, 25–34. <https://doi.org/10.1038/ng0596-25>
- Mocquard, J.P., Juchault, P., Souty-Grosset, C., 1989. The role of environmental factors (temperature and photoperiod) in the reproduction of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804). *Monogr. Monit. Zool. Ital.* 4, 455–475.
- Mocquard, J.P., Pavese, A., Juchalult, P., 1980. Déterminisme de la reproduction saisonnière des femelles d'*Armadillidium vulgare* Latr. (Crustacé, Isopode, Oniscoïde). I. Action de la température et de la photopériode. *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 13e Ser.
- Monaghan, P., Charmantier, A., Nussey, D.H., Ricklefs, R.E., 2008. The evolutionary ecology of senescence. *Funct. Ecol.* 22, 371–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01418.x>
- Moreau, J., Rigaud, T., 2002. The shape of calcium carbonate deposits as an external marker for female reproductive status in terrestrial Isopods. *J. Crustac. Biol.* 22, 353–356. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990242>
- Nunn, C.L., Lindenfors, P., Pursall, E.R., Rolff, J., 2009. On sexual dimorphism in immune function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364, 61–69. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0148>
- Nussey, D.H., Coulson, T., Delorme, D., Clutton-Brock, T.H., Pemberton, J.M., Festa-Bianchet, M., Gaillard, J.-M., 2011. Patterns of body mass senescence and selective disappearance differ among three species of free-living ungulates. *Ecology* 92, 1936–1947. <https://doi.org/10.1890/11-0308.1>
- Nussey, D.H., Froy, H., Lemaitre, J.-F., Gaillard, J.-M., Austad, S.N., 2013. Senescence in natural populations of animals: widespread evidence and its implications for bio-gerontology. *Ageing Res. Rev.* 12, 214–225.
- Nussey, D.H., Kruuk, L.E.B., Morris, A., Clutton-Brock, T.H., 2007. Environmental conditions in early life influence ageing rates in a wild population of red deer. *Curr. Biol.* 17, R1000–R1001. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.005>
- Paris, O.H., Pitelka, F.A., 1962. Population characteristics of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* in California grassland. *Ecology* 43, 229–248.
- Park, Y., Kim, Y., Stanley, D., 2011. Cellular immunosenescence in adult male crickets, *Gryllus assimilis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 76, 185–194. <https://doi.org/10.1002/arch.20394>
- Piazza, J.R., Almeida, D.M., Dmitrieva, N.O., Klein, L.C., 2010. Frontiers in the use of biomarkers of health in research on stress and aging. *J. Gerontol. B. Psychol. Sci. Soc. Sci.* 65B, 513–525. <https://doi.org/10.1093/geronb/gbq049>
- Rodier, F., Campisi, J., 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* 192, 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>

- Rodriguez, J., Boulo, V., Mialhe, E., Bachere, E., 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* 108, 1043–1050.
- Schielzeth, H., 2010. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients: Interpretation of regression coefficients. *Methods Ecol. Evol.* 1, 103–113. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x>
- Shefferson, R.P., Jones, O.R., Salguero-Gomez, R. (Eds.), 2017. The Evolution of Senescence in the Tree of Life. Cambridge University Press, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/9781139939867>
- Smigel, J.T., Gibbs, A.G., 2008. Conglobation in the pill bug, *Armadillidium vulgare*, as a water conservation mechanism. *J. Insect Sci.* 8. <https://doi.org/10.1673/031.008.4401>
- Souty-Grosset, C., Chentoufi, A., Mocquard, J.P., Juchault, P., 1988. Seasonal reproduction in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (Latreille): geographical variability and genetic control of the response to photoperiod and temperature. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 14, 131–151.
- Steel, C.G.H., 1980. Mechanisms of coordination between moulting and reproduction in terrestrial isopod crustacea. *Biol. Bull.* 159, 206–218. <https://doi.org/10.2307/1541019>
- Tidière, M., Gaillard, J.-M., Berger, V., Müller, D.W., Lackey, L.B., Gimenez, O., Clauss, M., Lemaître, J.-F., 2016. Comparative analyses of longevity and senescence reveal variable survival benefits of living in zoos across mammals. *Sci. Rep.* 6, 36361.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L., Cellerino, A., 2006. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 5, 275–278. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00212.x>
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., von Zglinicki, T., 2009. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311–323. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00481.x>

