



**HAL**  
open science

# Interactions Drosophiles-guêpes endoparasitoïdes : rôle des vésicules extracellulaires du venin de *Leptopilina boulandi* dans le transport de facteurs de virulence et la spécificité d'hôte

Bin Wan

► **To cite this version:**

Bin Wan. Interactions Drosophiles-guêpes endoparasitoïdes : rôle des vésicules extracellulaires du venin de *Leptopilina boulandi* dans le transport de facteurs de virulence et la spécificité d'hôte. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4143 . tel-02426267

**HAL Id: tel-02426267**

**<https://theses.hal.science/tel-02426267v1>**

Submitted on 2 Jan 2020

**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.

École doctorale : Sciences Vie Santé  
Unité de recherche : Institut Sophia Agrobiotech

# Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du  
grade de docteur en Sciences de la Vie  
de l'Université Côte d'Azur  
Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

Par

**Bin WAN**

**Interactions Drosophiles-guêpes endoparasitoides :  
rôle des vésicules extracellulaires du venin de  
*Leptopilina boulardi* dans le transport de facteurs  
de virulence et la spécificité d'hôte.**

Dirigée par *Jean-Luc GATTI*  
Codirigée par *Marylène POIRIE*

Soutenue le 21 Décembre 2017  
Devant le jury composé de :

Mme Christine BRAQUART-VARNIER  
Mr Laurent BOYER  
Mr Guillaume CHARRIERE  
Mme Michèle CROZATIER  
Mme Anne-Nathalie VOLKOFF  
Mr Jean-Luc GATTI  
Mme Marylène POIRIE

PR, Université de Poitiers  
CR, INSERM Nice  
MCU, Université de Montpellier  
DR, CNRS Toulouse  
DR, INRA Montpellier  
DR, ISA-INRA  
PR, UNS

Examinatrice  
Examinateur  
Rapporteur  
Rapporteuse  
Examinatrice  
Directeur de thèse  
Codirectrice de thèse

Bin WAN

Interactions Drosophiles-guêpes endoparasitoides :  
rôle des vésicules extracellulaires du venin de  
*Leptopilina boulardi* dans le transport de facteurs  
de virulence et la spécificité d'hôte.

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes chefs Jean-Luc Gatti et Marylène Poirié, mes tuteurs de thèse, pour leur encadrement, soutien, confiance, précieux conseils et leur patience. Vous m'avez donné la chance de faire cette thèse, cela me permet d'envisager un futur en science.

Je remercie également les rapporteurs Guillaume Charrière et Michèle Crozatier ainsi que les membres du jury Christine Braquart-Varnier, Laurent Boyer et Anne-Nathalie Volkoff d'avoir accepté de lire et d'évaluer cette thèse.

Un très grand merci à Gilbert Engler et Olivier Pierre pour m'avoir formé à la microscopie et avoir répondu à mes nombreuses questions sur l'utilisation de la microscopie confocale.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe Evolution et Spécificité des Interactions Multitrophiques (ESIM) qui m'ont apporté attention, conseil, soutien et ont ainsi accentué le plaisir et l'intérêt que je trouve dans le travail de recherche. Notamment, merci à Dominique Colinet, Séverine Lemauf, Christian Rebuf, Laury Arthaud-Hugonin, Sophie Tares-Amichot et Dominique Cazes.

Je voudrais remercier les chefs de la cantine Guy, Christophe et Isabelle. Grâce à votre bonne cuisine, nous avons l'énergie pour bien travailler ! Et aussi Mmes Mireille Capvert, Michelle Compagnoni et Bernadette Emeric pour l'aide apportée pour tous mes papiers administratifs.

Enfin, je ne vous ai pas oubliés, un très grand merci à Fanny (Après 3 ans, « mon cœur est en rouge ? »), Laurent (A cause de l'inondation, tu as une belle voiture. Par contre, je préfère la poule qui est chez toi !), Chami (« Sous-chef ! Ils sont où les résultats ? »), Aurélie (« Hasta la vista, baby ! »), Wouter et aussi mes amis chinois ZHAO Lianlong, QU Yanyan, ZHAO Hui, Yang Li, Wang Yusha et Li Shiqi (qui m'ont encouragé de temps en temps).

Aussi, merci beaucoup à mes parents !



Cette thèse a reçu le soutien financier du programme « European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration », under grant agreement N° 613678 (DROPSA).



# Résumé

Les guêpes endoparasitoïdes se développent à l'intérieur du corps et aux dépens d'autres arthropodes, conduisant à leur mort. Le dépôt de l'œuf de parasitoïde entraîne une réponse immunitaire de l'hôte, la formation autour de l'œuf d'une capsule multicellulaire (chez la *Drosophile*, formée essentiellement de lamellocytes, hémocytes spécialisés dans la réponse au parasitisme), associée à une réaction de mélanisation produisant des radicaux toxiques. *Leptopilina bouleardi* (Cynipidae, Figitidae) est un endoparasitoïde de larves de *Drosophile*, incluant *D. melanogaster*, dont le succès repose sur l'injection de venin avec l'œuf, qui inhibe notamment la réponse immunitaire de l'hôte. Ce venin est synthétisé au niveau d'une glande unique reliée par un court canal à un large réservoir. Il contient des composants protéiques mais aussi, chez *L. bouleardi*, des vésicules originales (baptisées vénosomes). Les objectifs de ma thèse étaient de i) déterminer si les vénosomes jouent un rôle dans le transport et le ciblage de facteurs de virulence ou FVs identifiés dans l'équipe - LbGAP et LbGAP2, des RhoGAPs sécrétées dans le venin – et apparemment impliqués dans l'inhibition de la fonction des lamellocytes ii) tester leur rôle dans la spécificité d'hôte du parasitoïde iii) développer une méthode pour séparer les lamellocytes en vue d'une étude protéomique.

Avec différentes approches, j'ai montré que LbGAP et LbGAP2 sont synthétisées dans toutes les cellules de la glande à venin et qu'elles sont ensuite intégrées aux vénosomes lors de leur assemblage qui, de façon surprenante, semble se faire de façon extracellulaire dans la lumière du canal reliant la glande au réservoir. Cette intégration implique un mécanisme spécifique car la serpine LbSPN également sécrétée en grande quantité, ne s'associe pas aux vénosomes. La microinjection de venin ou de vénosomes purifiés dans la larve hôte a le même effet sur la morphologie des lamellocytes et protège totalement contre l'encapsulation. La mise au point d'une technique de marquage fluorescent des vénosomes purifiés et leur co-immunolocalisation avec LbGAP et LbGAP2 dans les lamellocytes après microinjection, a fourni la preuve que les vénosomes transportent et ciblent ces facteurs de virulence.

Leur entrée dans les lamellocytes implique certaines des voies de l'endocytose : les vénosomes et LbGAP ne colocalisent pas avec la clathrine (marqueur des vésicules mantelées) et la Rab GTPase Rab5 (vésicules mantelées/endosomes précoces) mais colocalisent avec Rab7 (endosomes tardifs), Rab11 (endosomes recyclés) et Lamp1 (lysosomes) et aussi fortement avec la flotilline et le marqueur de surface des lamellocytes Attila (une protéine à ancre GPI), des protéines généralement enrichies dans les radeaux lipidiques membranaires. Ceci suggère que les vénosomes/FVs entrent dans les cellules par une endocytose raft-domaine dépendant et se distribuent ensuite dans presque tous les compartiments cellulaires.

J'ai aussi observé une forte variation de capacité d'entrée et de quantité de vénosomes dans les lamellocytes selon les espèces de *Drosophile* testées (*D. simulans*, *D. yakuba*, *D. suzukii*) qui est corrélée au niveau de réussite parasitaire de *L. bouleardi* sur ces espèces. Les vénosomes pourraient ainsi participer à la spécificité d'hôte du parasitoïde en représentant un nouveau niveau de spécificité à l'échelle cellulaire. Enfin, ceci suggère l'existence d'un ou des récepteurs spécifiques impliqué(s) dans la reconnaissance et l'entrée des vénosomes sur les lamellocytes de *D. melanogaster*. Avec la souche mutante Hop<sup>Tum-1</sup> qui produit des lamellocytes de façon constitutive, j'ai mis au point une méthode de séparation de ces cellules et entrepris l'analyse protéomique de leur membrane pour rechercher des récepteurs candidats.

Mes résultats démontrent que les vénosomes sont des véhicules de transport inter-espèces impliqués dans la virulence parasitaire et qu'ils représentent un nouveau niveau dans la spécificité d'hôte. Ils ouvrent aussi la voie vers l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction vénosomes-lamellocytes.

# Abstract

Endoparasitoid wasps develop inside the body and at the expense of other arthropods, leading to their death. The deposit of the parasitoid egg inside the host induces an immune response, leading to the formation of a multicellular capsule surrounding the egg (in *Drosophila* it is mainly formed by lamellocytes, specialized haemocytes produced in response to parasitism), associated with a melanization reaction that produces toxic radicals. *Leptopilina boulardi* (Cynipidae, Figitidae) is an endoparasitoid of *Drosophila* larvae, including *D. melanogaster*, whose success relies on the injection of venom with the egg, which notably inhibits the immune response of the host. The venom is synthesized by a single gland connected to a large reservoir by a short duct. Venom contains proteins but also, in *L. boulardi*, original vesicles called venosomes. The objectives of my thesis were i) to determine if venosomes play a role in the transport and targeting of identified virulence factors (VFs) - LbGAP and LbGAP2, two RhoGAPs secreted in the venom identified by the team - seemingly involved in inhibition of the lamellocytes function, ii) to test their role in host specificity of the parasitoid, iii) to develop a method to separate lamellocytes for proteomics study.

With different approaches, I have shown that LbGAP and LbGAP2 are synthesized in all secreting cells of the venom gland and that they are integrated into the venosomes during their assembly which, surprisingly, seems to occur extracellularly in the lumen of the duct connecting the gland to the reservoir. This VFs integration involves a specific mechanism since the serpin LbSPN also secreted in large quantity, does not associate with the venosomes.

Microinjection of venom or purified venosomes from the *L. boulardi* virulent strain ISm into host larvae induced changes in the lamellocytes morphology, and both completely protect parasitoid eggs from the avirulent ISy strain from encapsulation, indicating that venosomes are sufficient to reproduce the effects of venom. The development of a fluorescent labeling technique for purified venosomes and their co-immunolocalization with LbGAP and LbGAP2 in lamellocytes after microinjection provided final evidence that the venosomes carry and target these virulence factors in these cells.

Venosomes entry into lamellocytes involved one specific endocytic pathway: venosomes and LbGAP did not colocalize with clathrin and the RabGTPase Rab5 (both markers of the clathrin mediated endocytosis) or fluorescent dextran, a micropinocytosis marker, but strongly with flotillin and the surface lamellocytes marker Attila/L1, a GPI anchor protein, both proteins generally enriched in lipid raft domains. Once internalized, LbGAP colocalized with Rab7 (late endosomes/endolysosomes), Rab11 (recycled endosomes) and Lamp1 (lysosomes). This suggests that the venosomes / VFs enter the cells by a flotillin raft-dependent domain specialized pathway and then distribute in almost all cell compartments.

I also observed a correlation between the venosomes uptake capacity and their accumulation in lamellocytes and the *L. boulardi* ISm parasitism success according to the *Drosophila* species (*D. melanogaster* > *D. simulans* > *D. yakuba* > *D. suzukii*). Venosomes could thus represent a new level in the host specificity of the parasitoid. Finally, all data suggest the existence of specific receptor (s) involved in venosomes recognition and entry in *D. melanogaster* lamellocytes. Using the *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> mutant strain that constitutively produces lamellocytes, I developed a method for separating these cells and started proteomic analysis of their membrane proteins to search for candidate receptors.

My results demonstrate that venosomes are interspecies transport vehicles involved in the parasite virulence and that they represent a new level in host specificity. They also pave the way towards the identification of the molecular actors involved in the venosome-lamellocyte interaction.

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des figures et des tableaux</b> .....	<b>9</b>
<b>Partie 1 Introduction générale</b> .....	<b>11</b>
Introduction générale.....	12
Les Drosophiles.....	14
Les parasitoïdes de drosophile.....	19
Objectifs de la thèse.....	25
<b>Partie 2 Interaction <i>D. melanogaster</i> - <i>L. boulandi</i></b> .....	<b>26</b>
Variation de la sélection d'hôte et de la réussite parasitaire de <i>Leptopilina boulandi</i> .....	27
La physiologie de l'interaction.....	30
La défense : la réponse immunitaire des drosophiles.....	30
Les cellules hématocytaires, origines et rôle dans l'encapsulement.....	35
Hématopoïèse chez <i>D. melanogaster</i> .....	35
L'encapsulement.....	41
Le rôle des plasmacytes.....	45
Le rôle des Lamellocytes.....	46
Le rôle des cellules à cristaux.....	48
La mélanisation.....	48
L'attaque : les facteurs venimeux.....	50
Les protéines venimeuses.....	51
Les vésicules/particules provenant de l'ovaire des parasitoïdes (PDVs, VLPs).....	54
Les PDVs.....	54
Les VLPs ovariens.....	56
Les vésicules produites dans les glandes à venin (VLPs/venosomes).....	57
Les facteurs de virulence des <i>Leptopilina</i> .....	60
Les VLPs de <i>L. heterotoma</i> et <i>L. victoriana</i> .....	60
L'Aspartylglucosaminidase (AGA) de <i>L. heterotoma</i> .....	63
Les facteurs de virulence de <i>L. boulandi</i> .....	63
Les serpines.....	63
Les RhoGAPs.....	65
<b>Partie 3 : Article 1. Atypical extracellular vesicles as interspecies comunicasomes involved in host specificity: the case of a parasitoid wasp of <i>Drosophila</i></b> .....	<b>68</b>
Introduction.....	69
Présentation des résultats.....	70
Article 1 : Texte principal.....	75
Article 1 : Figures 1-8.....	99
Article 1 : Table 1.....	107
Article 1 : Supplementary Materials (Figure S1-S6).....	108
Discussion de l'article 1.....	114
<b>Partie 4 : Article 2. <i>Drosophila melanogaster</i> lamellocytes uptake parasitoids venosomes by a flotillin/lipid raft-dependent endocytic pathway</b> .....	<b>116</b>
Introduction.....	117
Les mécanismes d'endocytose.....	117
L'endocytose dépendante de la clathrine (CME).....	118
L'endocytose indépendante de la clathrine (EIC).....	120
La macropinocytose.....	120
L'endocytose impliquant les radeaux lipidiques.....	122
Le trafic et le destin intracellulaire des vésicules internalisées.....	126
Présentation des résultats.....	128
Article 2 : Texte principal.....	132

Article 2 : Figures 1-5 .....	150
Article 2 : Supplementary Materials (Figures S1-S3).....	155
Article 2 : Supplementary Materials (Tables S1-S2).....	158
Discussion de l'article 2 .....	160
<b>Partie 5 Séparation et protéomique des lamellocytes de <i>D. melanogaster</i> Hop<sup>Tum-1</sup> .....</b>	<b>165</b>
Introduction .....	166
Résumé .....	168
Matériels et méthodes .....	169
Séparation des lamellocytes Hop <sup>Tum-1</sup> de <i>D. melanogaster</i> sur gradient discontinu de Percoll.....	169
Marquage à la biotine, extraction et purification des protéines membranaires.....	169
Immunohistochimie.....	170
Séparation SDS-PAGE.....	171
Immunoblotting .....	172
Spectrométrie de masse .....	172
Analyse de GO.....	173
Résultats .....	174
Purification des lamellocytes.....	174
Analyse protéomique des protéines majeures des lamellocytes.....	175
Analyse protéomique des protéines de membranes.....	185
Analyse globale des GO.....	189
Discussion .....	191
Informations Supplémentaires : Figure S1-S3 .....	197
Informations Supplémentaires : Table S1-S5 .....	200
<b>Partie 6. Discussion Générale et Perspectives .....</b>	<b>209</b>
Biogénèse des vénosomes .....	210
Endocytose des vénosomes .....	214
Protéomique des lamellocytes.....	216
Derniers mots .....	218
<b>References.....</b>	<b>221</b>

# Liste des figures et des tableaux

<b>Figure 1:</b> Phylogénie partielle des Drosophiles montrant les sous-genres Sophophora et Drosophila.....	14
<b>Figure 2:</b> <i>Drosophila melanogaster</i> mâle et femelle et leur cycle de reproduction.....	15
<b>Figure 3:</b> Les ennemis naturels des Drosophiles. ....	16
<b>Figure 4:</b> Hémocytes de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	17
<b>Figure 5:</b> Lyse des cellules à cristaux après collection chez <i>D. melanogaster</i> . ....	18
<b>Figure 6:</b> Cycle de parasitisme des endoparasoïdes <i>Leptopilina</i> sp. ....	20
<b>Figure 7:</b> Appareil à venin de femelles <i>Leptopilina</i> sp. ....	22
<b>Figure 8:</b> Le succès parasitaire de <i>L. bouleardi</i> (taux d'émergence des parasitoïdes) est corrélé avec le taux d'encapsulation dans sept espèces de Drosophiles hôtes du sous-groupe <i>melanogaster</i> . ....	28
<b>Figure 9:</b> Répartition géographique du taux d'encapsulation des populations de <i>L. bouleardi</i> dans les populations sympatriques de <i>D. melanogaster</i> (% représenté par la partie noire du camembert). ....	28
<b>Figure 10:</b> Interaction génétique et résultat du parasitisme entre les hôtes <i>D. melanogaster</i> et <i>D. yakuba</i> et les souches de types ISm et ISy de <i>L. bouleardi</i> . ....	30
<b>Figure 11:</b> Réponses cellulaire et humorale au cours de la cicatrisation. ....	33
<b>Figure 12:</b> Ontogenèse des lignées de cellules sanguines et régulation de l'hématopoïèse chez la drosophile. ....	36
<b>Figure 13:</b> Régulateurs de l'hématopoïèse et fonctions hémocytaires chez <i>Drosophila melanogaster</i> . ...	39
<b>Figure 14:</b> Cinétique du nombre d'hémocytes après infestation par des souches virulentes (ISm) et avirulentes (ISy) de <i>L. bouleardi</i> . ....	42
<b>Figure 15:</b> Encapsulation de l'œuf de <i>L. bouleardi</i> ISy. ....	43
<b>Figure 16:</b> Modèle de la formation des lamellocytes en réponse à l'infestation à partir du compartiment sessile. ....	45
<b>Figure 17:</b> Schéma de la mélanogénèse.....	50
<b>Figure 18:</b> Comparaison des venins de <i>L. bouleardi</i> ISm (Lbm), ISy (Lby) et de <i>L. heterotoma</i> (Lh). ....	54
<b>Figure 19:</b> Photographies en microscopie électronique des vésicules ovariennes. ....	56
<b>Figure 20:</b> Vésicules de <i>L. heterotoma</i> .....	57
<b>Figure 21:</b> Assemblage des VLPs chez <i>L. heterotoma</i> , <i>L. victoriae</i> , <i>L. bouleardi</i> Lb17. ....	59
<b>Figure 22:</b> Vésicules de <i>L. bouleardi</i> . ....	60
<b>Figure 23:</b> Effet des VLPs de <i>L. heterotoma</i> sur les lamellocytes. ....	61
<b>Figure 24:</b> Immunolocalisation de la protéine P40/P47.5 dans les lamellocytes.....	61
<b>Figure 25:</b> Protéomique des VLPs de <i>L. heterotoma</i> . ....	62
<b>Figure 26:</b> Comparaison électrophorétique des serpinines LbSPNm et LbSPNy. ....	64
<b>Figure 27:</b> Immunolocalisation de LbGAP dans les lamellocytes.....	65
<b>Figure 28:</b> Les protéines de la famille des RhoGAPs identifiées dans les souches de <i>L. bouleardi</i> ISm et ISy. ....	67
<b>Figure 29:</b> Appareil à venin de <i>L. bouleardi</i> et schéma d'une cellule sécrétrice de la glande à venin. ....	70
<b>Figure 30:</b> Marquage des vénosomes et immunolocalisation dans les lamellocytes de <i>D. melanogaster</i> . ....	72
<b>Figure 31:</b> Marquage des vénosomes avec des NHS-Alexa.....	73
<b>Figure 32:</b> Les différents types d'endocytose. ....	118
<b>Figure 33:</b> Variations entre espèces et fonctions physiologiques de l'endocytose clathrine-dépendante. ....	120
<b>Figure 34:</b> Macropinocytose. ....	121
<b>Figure 35:</b> Schéma d'un microdomaine lipidique de la membrane plasmique. ....	123
<b>Figure 36:</b> Trafic des vésicules d'endocytose dans une cellule. ....	127
<b>Figure 37:</b> Images en microscopie confocale des lamellocytes de larve L3 Hop <sup>Tum-I</sup> marqués avec différents anticorps des compartiments endosomaux. ....	129
<b>Figure 38:</b> Comparaison des méthodes de fixations. ....	130
<b>Figure 39:</b> Accumulation du Dextran fluorescent (vert) dans le cytoplasme des lamellocytes au cours du temps.....	161
<b>Figure 40:</b> Entrée des vénosomes par macropinocytose dans les plasmotocytes ?.....	162
<b>Figure 41:</b> Représentation schématique des voies de sécrétion des différents types de vésicules depuis la membrane plasmique, ou issues de compartiments endocytiques. ....	211
<b>Figure 42:</b> Représentation schématique de la composition typique d'un exosome, basé sur les données de quinze études protéomique sur des exosomes isolés de cellules en culture et liquides biologiques. ....	212
<b>Figure 43:</b> Colocalisation dextran/vénosomes chez <i>D. simulans</i> et <i>D. yakuba</i> 18h après injection.....	215
<b>Figure 44:</b> Comparaison électrophorétique des venins de quelques <i>Leptopilina</i> . ....	218

<b>Tableau I:</b> Gènes de <i>D. melanogaster</i> dont la mutation entraîne des défauts dans l'encapsulation du parasitoïde <i>L. boulardi</i> .....	47
<b>Tableau II:</b> Synthèse des protéines de venin identifiées ayant des fonctions biochimiques connues ou putatives.....	52
<b>Tableau III:</b> Liste des caractéristiques principales des différents types de vésicules issues de cellules.....	211

# **Partie 1**

## **Introduction générale**



## Introduction générale

God in His wisdom  
Made the fly  
And then forgot  
To tell us why  
*Ogden Nash*

La plupart des organismes vivants ont évolué de telle manière que pour survivre et se reproduire efficacement ils doivent utiliser une combinaison de leur propre matériel génétique et de celui d'une ou de plusieurs autres espèces. En effet, la majorité des espèces vivent de manière symbiotique avec d'autres espèces en tant que mutualistes, commensaux ou parasites [1]. À leur tour, la plupart des organismes « hôtes » doivent consacrer une grande partie de leurs ressources à se défendre. Plus nous en apprenons sur la diversité du vivant et la structure des génomes, plus il semble qu'une grande partie de l'évolution de la biodiversité concerne la manipulation d'autres espèces, pour gagner des ressources et éviter d'être manipulé.

Il y a plus de 50 ans, Van Valen [2] a proposé l'hypothèse de la Reine rouge, qui a mis l'accent sur la primauté de ce conflit biotique sur les forces abiotiques dans la sélection. Les espèces doivent évoluer continuellement pour perdurer face à leurs « ennemis » également en évolution ne serait-ce que pour conserver une « fitness » inchangée. Parmi les organismes pour lesquels ce principe est prégnant, ceux qui ont adopté un style de vie parasitaire sont confrontés en permanence à un subtil équilibre : se développer, survivre et se reproduire tout en maintenant leur hôte dans un état permettant de le faire. Il existe cependant des cas extrêmes : les parasitoïdes. Ce terme de « parasitoïde » bien qu'il puisse s'appliquer au mode de vie d'un grand nombre d'espèces est de nos jours taxonomiquement restreint au mode de vie de certains insectes qui pondent leur(s) œuf(s) dans ou sur un autre insecte, celui-ci se développant au dépens des tissus de l'hôte en entraînant généralement sa mort (pour revue [3,4]). L'issue de l'interaction étant alors l'émergence d'un nouvel adulte « parasitoïde ». Les stades larvaires du parasitoïde sont donc parasitaires, l'adulte ayant un mode de vie libre. Dans ce cas extrême, il s'agit pour les deux partenaires de s'adapter en permanence à l'autre pour survivre et avoir une chance de se reproduire : le parasitoïde doit protéger son œuf et sa larve des défenses de l'hôte dont il est dépendant et l'hôte adapter ses défenses pour détruire l'œuf ou la larve du parasitoïde. Cependant, l'hôte subit une sélection moins forte en raison d'une pression parasitaire généralement inférieure à 100%.

Ces insectes parasitoïdes partagent de nombreux aspects de leur biologie et de leur physiologie avec les autres insectes. Ils sont surtout uniques dans leur stratégie reproductive : les larves de parasitoïdes de nombreuses espèces consomment leur hôte immédiatement après l'avoir paralysé ou tué (idiobontes) alors que d'autres lui permettent de continuer à se nourrir et se développer ce qui permet d'assurer le développement complet du parasitoïde (koinobiontes) ; Certains se développent de manière solitaire dans un hôte alors que d'autres forment une couvée (solitaires *versus* grégaires) ; certaines espèces de parasitoïdes se développent à l'intérieur de l'hôte (endoparasitoïdes) alors que d'autres se développent à sa surface (ectoparasitoïdes). Les œufs, les larves, les pupes et les adultes (bien que plus rarement) peuvent être des hôtes, et dans le cas des œufs et des larves, le parasitoïde les laisse se développer le plus souvent jusqu'à un certain stade (larve, pupa) avant de les consommer.

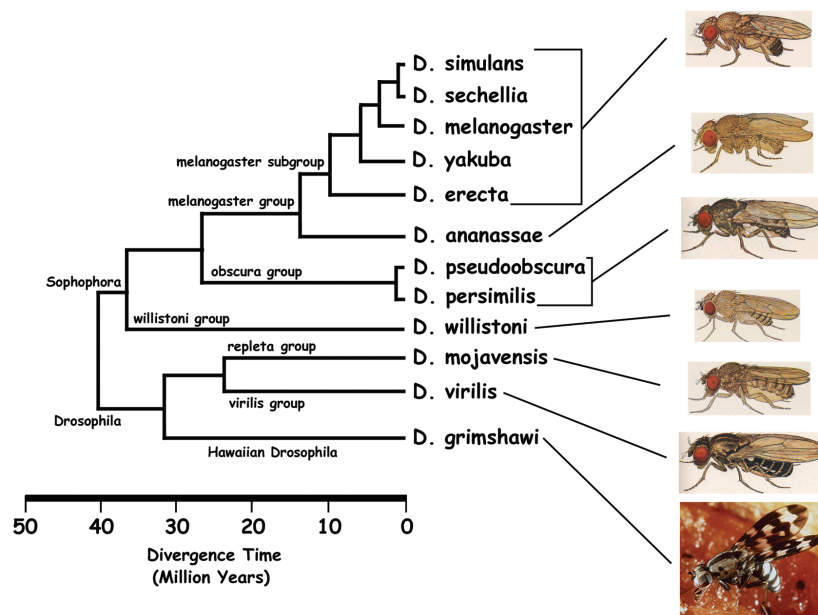
Entre 10 et 20% des espèces d'insectes connues sont des parasitoïdes, un quart sont des diptères et des coléoptères [5] et les trois-quarts des hyménoptères [6]. Pour les hyménoptères, cela représente environ 60% des 150 000 espèces décrites, mais avec les problèmes d'identification taxonomique et notre connaissance limitée du nombre réel d'hyménoptères, certains auteurs suggèrent qu'il pourrait exister plusieurs centaines de milliers d'espèces parasitoïdes [6–9].

Les hyménoptères parasitoïdes ont donné lieu à un très grand nombre d'études dans différents domaines incluant la taxonomie, le comportement, la physiologie, l'écologie, ou l'évolution, et leur impact sur les populations d'insectes ravageurs en a fait des auxiliaires de choix pour la lutte biologique (pour revues [4,6,7,10–12]). Si de nombreux progrès ont été faits dans tous ces domaines, il reste cependant un énorme travail pour comprendre les mécanismes de l'interaction avec l'hôte et de la spécificité hôte-parasitoïde. En particulier, comment survivre comme endoparasites à l'intérieur du corps de son hôte : il s'agit là d'un environnement hostile dans lequel l'œuf et la larve du parasitoïde doivent résister aux défenses immunitaires de l'hôte et adapter les ressources de ce dernier à leur avantage (pour revues [13]). Les contre-mesures déployées par les parasitoïdes sont intéressantes en elles-mêmes, souvent originales, et elles fournissent des outils potentiels pour comprendre les mécanismes de l'immunité innée des invertébrés qui sert aussi de modèle pour comprendre celle de l'homme (pour revues [14–17]).

Le modèle que j'ai utilisé est le couple formé par le parasitoïde *Leptopilina bouvardi* (Cynipidés, Figitidés), qui utilise les larves de drosophiles comme hôte et principalement *Drosophila melanogaster* (Diptère).

## Les Drosophiles

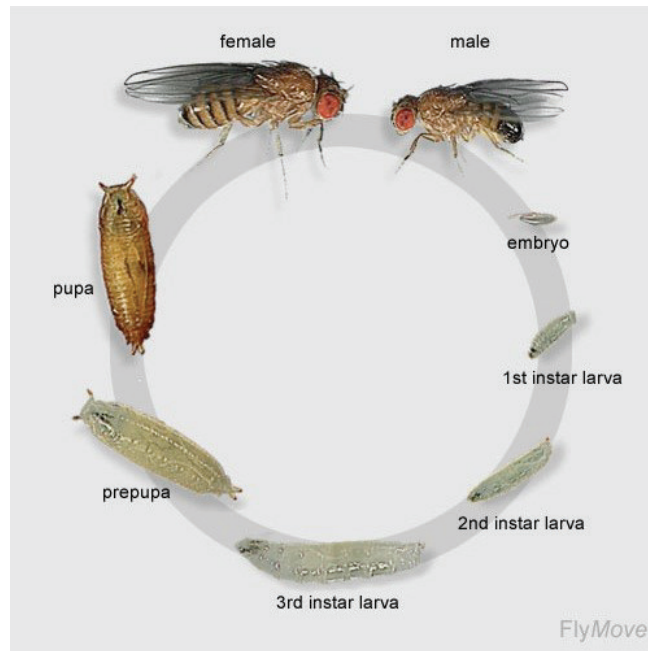
Les Drosophiles font parties de la famille des Drosophilidae (Diptères), un assemblage d'environ 3500 espèces dont la phylogénie n'est pas encore complètement résolue et donc toujours sujette à discussion [18–21]. Les plus représentatives et intensément étudiées font partie du groupe *melanogaster* qui est un des huit groupes d'espèces dans le sous-genre *Sophophora*, l'un des plus grands dans le genre *Drosophila* (plus de 1500 espèces) (Figure 1).



**Figure 1: Phylogénie partielle des Drosophiles montrant les sous-genres *Sophophora* et *Drosophila*.**

(Crédit image : <http://insects.eugenies.org/DroSpeGe/>)

Les drosophiles sont des mouches de petite taille (2 à 4 mm) avec un cycle de génération court. Ce sont des holométaboles, c'est-à-dire des insectes à métamorphose complète, avec des stades larvaires et pupal avant l'âge adulte (Fig. 2). Après la ponte, le développement embryonnaire est suivi de 3 cycles larvaires, qui sont des phases de croissance séparées par des mues. Lorsque la larve du troisième stade atteint un niveau de croissance suffisant, elle forme une puppe, les structures larvaires disparaissant et les structures adultes se formant à partir des disques imaginaux présents dans la larve : c'est la métamorphose. L'adulte peut assurer les fonctions de reproduction environ 16 heures après émergence.



**Figure 2: *Drosophila melanogaster* mâle et femelle et leur cycle de reproduction.**

Après la ponte le développement de l'œuf se déroule en 3 étapes distinctes : embryonnaire, larvaire, pupal d'où va émerger l'adulte. Il y a deux phases immobiles (embryon, pupe) et deux phases mobiles (larves, adulte). La larve du premier stade (L1) qui émerge de l'embryon ressemble à un minuscule ver. Elle se nourrit sur le substrat où les œufs ont été déposés et après environ 24 heures mue en larve du deuxième stade (L2), qui après 24 heures passées à se nourrir se transforme en larve du troisième stade (L3), la plus grande des formes larvaires. La larve L3 passe un temps à se nourrir avant de sortir du milieu pour chercher une zone relativement propre et sèche pour la pupaison. À 25°C, il ne faut que 10 jours à la drosophile pour effectuer un cycle de vie complet.

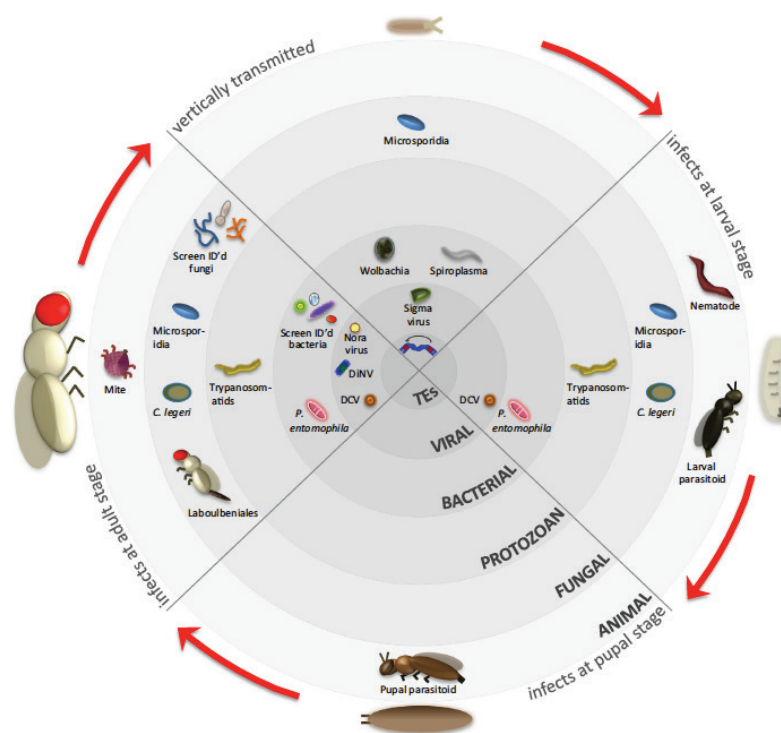
Crédit image : <http://depts.washington.edu/cberglab/wordpress/outreach/an-introduction-to-fruit-flies/>

Les drosophiles sont appelées mouches des fruits car la plupart des espèces déposent leurs œufs et se développent dans les fruits en cours de décomposition. Cependant, de nombreuses espèces de *Drosophila* se reproduisent dans les plantes en décomposition (ex. cactus), les fleurs, les champignons ou la sève des arbres [22–24]. Ces ressources sont associées à une faune microbienne unique et sont propices au développement de levures qui fournissent à la fois la larve et l'adulte en nutriments. Cependant, quelques espèces s'attaquent également aux fruits en cours de maturation. C'est le cas de *D. suzukii* (Spotted Wing *Drosophila*) un ravageur polyphage originaire d'Asie, récemment introduit en Amérique et en Europe, qui est responsable de larges pertes économiques. Cette drosophile possède un ovipositeur modifié en forme de scie qui lui permet de pondre ses œufs sous la peau du fruit intact, particulièrement les baies et les petits fruits à noyau [25,26]. Les larves se développent à l'intérieur du fruit et induisent son pourrissement, les fruits perdant alors toute valeur commerciale.

*Drosophila melanogaster* est présente sur tous les continents et la plupart des îles. Elle est originaire d'Afrique subsaharienne et sa première expansion hors-Afrique (en Europe et en Asie) s'est produite il y a 10 000 à 15 000 ans [27,28]. L'Amérique du Nord et l'Australie ont été

colonisées plus récemment [28]. Sa distribution actuelle est mondiale, certainement liée aux déplacements des populations humaines [21]. En raison de sa facilité d'élevage et de son court cycle de vie, elle a été utilisée comme modèle expérimental en génétique dès le début du XXe siècle ce qui a conduit à la découverte de nombreux processus fondamentaux tels que la liaison sexuelle chromosomique, les inversions, duplications, translocations ainsi que des gènes impliqués dans les mécanismes de l'évolution. *D. melanogaster* est devenue de nos jours un modèle utilisé dans presque tous les champs de recherche, notamment le développement et l'immunité [14,24,29,30].

En effet, comme tout organisme vivant, les drosophiles sont confrontées en permanence à des pathogènes potentiels appartenant à plusieurs catégories (virus, bactéries, parasites, champignons...) (Figure 3).



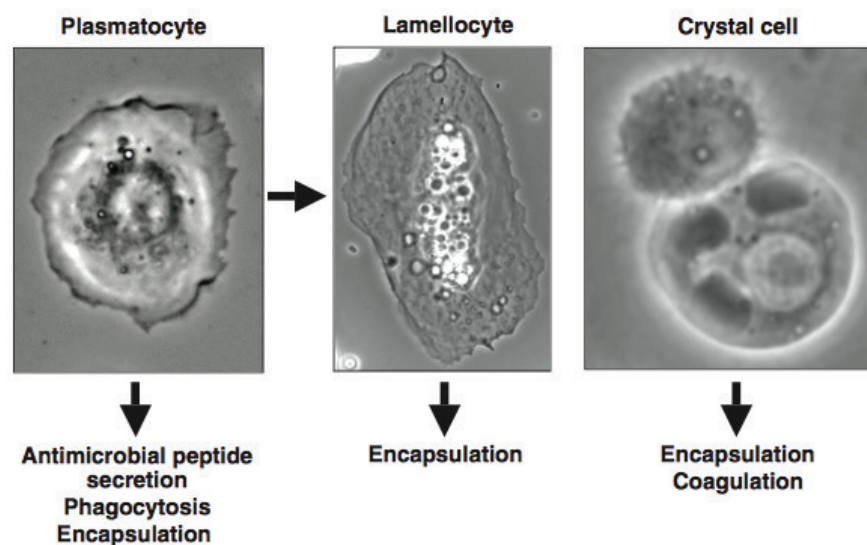
**Figure 3: Les ennemis naturels de la Drosophile.**

Les parasites sont organisés par groupe phylogénétique ainsi que par la phase de vie de la mouche qu'ils infectent. Notez que tous les parasites connus pour infecter les œufs sont transmis verticalement à partir de mouches parentales, tandis que tous les autres parasites sont transférés horizontalement [31].

Ces ennemis peuvent envahir les drosophiles par différentes voies d'entrée : les voies respiratoires, le tractus digestif et l'hémolymphe à l'occasion de blessures ou du percement de la

cuticule par l'ovipositeur dans le cas de l'œuf de parasitoïde. Lorsque les barrières physiques sont franchies, le système immunitaire se met en place pour contenir l'invasion. On divise classiquement le système immunitaire en deux domaines : l'immunité « innée » et l'immunité acquise dite « adaptative » [32,33]. L'immunité adaptative étant absente chez les insectes, seule l'immunité innée (dont les constituants sont restés constants au cours de l'évolution [14,34]) permet la défense contre les infections chez les drosophiles.

La pénétration d'un corps étranger dans l'hémolymphe aboutit à la fois à la production de molécules présentant des motifs (patrons) associés aux dommages (DAMP) et à la présence de molécules présentant des motifs associés aux pathogènes (PAMP). Ces produits se lient à des récepteurs qui reconnaissent ces motifs (PRR, Pattern Recognition Receptors) et déclenchent les mécanismes effecteurs subséquents au niveau cellulaire comme la phagocytose et la production de peptides antimicrobiens (AMP) [13,14,35]. Cette réponse innée chez *D. melanogaster* s'appuie aussi sur trois grandes classes d'hémocytes [36–39] : les plasmatoctes, les lamellocytes et les cellules à cristaux (Figure 4).



**Figure 4: Hémocytes de *Drosophila melanogaster*.**

Les plasmocytes (environ 10 $\mu$ m de diamètre) ressemblent à des macrophages monocytaires de mammifères et sont impliqués dans la phagocytose, l'encapsulation et la production de peptides antimicrobiens. Les lamellocytes, qui sont rarement observés chez les larves saines, ont un diamètre supérieur aux autres hémocytes (environ 40 $\mu$ m) et sont impliqués dans l'encapsulation. Les lamellocytes peuvent dériver directement des plasmocytes (flèche). Les cellules à cristaux (10 $\mu$ m de diamètre) doivent leur nom aux larges inclusions cristallines présentes dans leur cytoplasme (D'après [40]).

Les plasmocytes représentent environ 95% des hémocytes circulants chez les larves saines de drosophile. Ils sont notamment caractérisés par la présence dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes, de phagosomes (vacuoles de phagocytose) et de corps de résorption, qui traduisent une

activité phagocytaire importante afin d'éliminer les corps apoptotiques et les micro-organismes lors d'une infection par des pathogènes. Ces cellules sont impliquées aussi dans la production de peptides antimicrobiens et synthétisent massivement des protéines de la matrice extracellulaire. Ils sont responsables de la phagocytose et forment la couche primaire de cellules lors d'une réponse pour éliminer des bactéries (nodulation [41–43]) ou pour former une « capsule » cellulaire autour d'agents parasites comme les nématodes ou l'œuf d'un parasitoïde trop volumineux pour pouvoir être phagocyté [43–45]. Les plasmatocytes matures présentent l'antigène P1/Nimrod, qui permet leur détection. Il a récemment été montré qu'ils peuvent se transdifférencier en cellules à cristaux et en lamellocytes en cas de parasitisme [46].

Les cellules à cristaux sont des cellules rondes, non adhérentes, qui représentent seulement 5% des hémocytes circulants. Elles sont impliquées dans les processus de mélanisation, de réparation des blessures et de coagulation de l'hémolymphe. Elles contiennent dans leur cytoplasme des prophénoloxydases sous forme de cristaux, enzymes nécessaires au processus de mélanisation, qu'elles relâchent dans le milieu par lyse cellulaire (Figure 5). Le facteur de transcription *Lozenge* s'exprime uniquement durant le développement de ce type cellulaire [47], il peut alors constituer un marqueur spécifique pour les identifier.



**Figure 5: Lyse des cellules à cristaux après collection chez *D. melanogaster*.**

Des hémocytes ont été prélevés sur des larves de troisième stade et observés directement sur une lamelle. Une cellule cristalline (Oe) et deux plasmatocytes de drosophile (DPI) sont dans ce champ de vision. A) montre les cellules au moment de la collecte. Après 5 min d'incubation (B) les inclusions cristallines commencent à se dissoudre et après 8 min (C), la cellule cristalline a libéré presque tout son contenu cytoplasmique dans le milieu. Notez que les deux plasmatocytes de la drosophile ne s'étalent pas intensivement. (D'après [48]).

Les lamellocytes sont de grandes cellules aplaties qui sont quasi absentes de la circulation des larves saines. Ils prolifèrent et se différencient pour former les couches externes et participer à la mélanisation de la capsule cellulaire autour de corps étrangers de grande taille (réaction d'encapsulation cf. plus loin). Il est à noter que certaines espèces de drosophiles (groupe *melanica*) sont capables d'éliminer l'œuf du parasitoïde sans former de capsule, ce qui laisse à penser soit



que d'autres mécanismes de défense ont été développés par ces mouches soit que leur physiologie est totalement incompatible avec le développement du parasitoïde [49].

Les drosophiles ne comptent pas seulement sur leur système immunitaire pour se défendre contre un large éventail d'agresseurs potentiels. En effet, l'investissement simultané dans de multiples défenses immunitaires nécessiterait le détournement de ressources d'autres traits de vie, tels que la croissance, la survie et la fécondité. Par conséquent, elles ont développé aussi différents comportements soit individuel soit au niveau de l'espèce pour échapper en particulier aux parasitoïdes (définis comme mécanismes d'immunité comportementale) [50]. Parmi les comportements individuels la larve est capable de comportements défensifs pour échapper au parasitoïde ou de fuite comme s'enfoncer plus profondément dans le substrat nutritif [51,52], voire de pratiquer l'automédication en choisissant un milieu riche en éthanol qui peut affecter la réussite du parasitisme [53–55]. Ce choix est retrouvé aussi au niveau de l'espèce, les femelles drosophiles pondant plus dans les milieux riches en éthanol et moins lorsque le milieu contient des larves déjà parasitées ou lorsque des parasitoïdes sont présents [54,56–59].

## Les parasitoïdes de drosophile

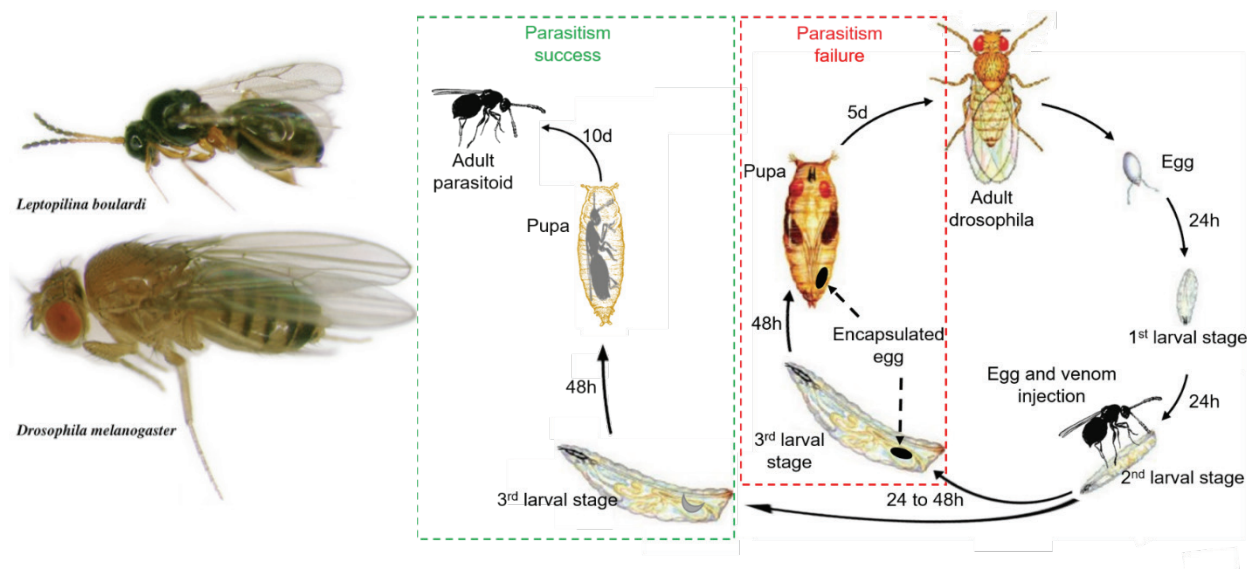
Parmi les parasites naturels de Drosophiles on trouve les guêpes parasitoïdes (Hyménoptères) qui peuvent parasiter jusqu'à 100% des larves d'une population naturelle de drosophile, jouant un rôle important de régulateurs [60,61]. Plus de 50 espèces de parasitoïdes hyménoptères attaquent diverses espèces de drosophiles, la majorité étant des endoparasitoïdes appartenant aux genres *Asobara* (Braconidae), *Leptopilina* et *Ganaspis* (Cynipoidea, Figitidae) qui attaquent principalement les larves de drosophiles comme *D. melanogaster* dans leur substrat nutritif, et seulement quelques-uns étant des parasitoïdes pupaux comme *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) et *Trichopria drosophilae* Perkins (Hymenoptera: Diapriidae) [62–64]. Les femelles parasitoïdes recherchent les larves ou les pupes de mouches dans ou près de leur substrat nutritif, attirées par des informations chimiques venant des fruits en décomposition mais aussi semble-t-il par des phéromones et les odeurs de déjections produites par les mouches ou par des congénères ayant déjà parasités [65–67].

Certains de ces parasitoïdes vivent en sympatrie et sont donc en compétition pour leurs hôtes. Cependant leur spectre d'hôte est variable, certains sont très spécialisés et ne parasitent avec succès qu'une ou peu d'espèces hôtes phylogénétiquement proches (spécialistes), d'autres ont une gamme d'hôtes assez large réussissant sur plusieurs ou de nombreuses espèces (généralistes). Fait intéressant, on a souvent suggéré que les stratégies de virulence peuvent diriger l'évolution de la



spécificité d'hôte du parasitoïde. Par exemple, les parasitoïdes koinobiontes devraient avoir une gamme d'hôtes plus étroite que les idiobiontes car ils doivent évoluer pour contourner les défenses immunitaires de l'hôte et réguler sa physiologie.

Les parasitoïdes pupaux *P. vindemiae* et *T. drosophilae* ont des spectres d'hôtes très large et sont considérés comme généralistes, ils sont capables de parasiter les pupes de nombreuses espèces de drosophile mais aussi de téthritides (diptères) et peuvent se comporter en hyperparasitoïdes [68–70]. Il n'existe que peu d'information sur les mécanismes impliqués dans leur réussite parasitaire [64]. Dans la suite de l'exposé, je m'intéresserais principalement aux endoparasitoïdes larvaires de drosophiles, en particulier au genre *Leptopilina* (Figure 6), auquel un grand nombre de travaux ont été consacré depuis près d'un siècle [71–77].



**Figure 6: Cycle de parasitisme des *Leptopilina* sp.**

La femelle injecte un œuf et du venin grâce à son ovipositeur dans la larve de drosophile principalement au second stade larvaire. Si le parasitisme échoue (résistance de l'hôte), l'œuf est encapsulé après 24 à 48h et la drosophile va continuer son développement normal jusqu'à l'éclosion de la mouche. Si le parasitisme réussit (virulence du parasitoïde), l'œuf du parasitoïde éclot et la larve va se développer essentiellement pendant la pupaison en se nourrissant des tissus de l'hôte, un parasitoïde adulte émergeant de la pupa environ 15 jours après parasitisme dans les conditions de laboratoire. A gauche, photographies à la même échelle de *D. melanogaster* et de *L. boulardi*.

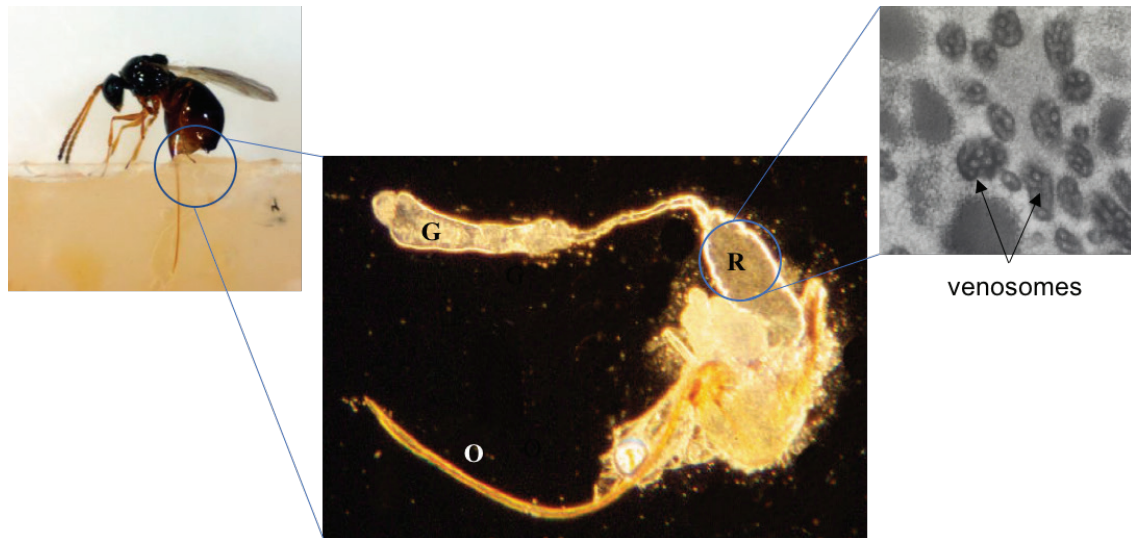
Le genre *Leptopilina* est constitué actuellement de 32 espèces connues, classées en trois grand groupes : le groupe Longipes, le groupe Heterotoma et le groupe Boulardi [63,78,79]. Les membres du groupe Hétérotoma se trouvent principalement en Orient, alors que les espèces du groupe Boulardi se trouvent principalement en Afrique. Des espèces du groupe Longipes se trouvent en Europe, en Amérique du Sud et dans les Caraïbes. Bien que plusieurs phylogénies

morphologiques et génétiques aient été faites, elles restent peu fiables et aucune ne comprend toutes les espèces de *Leptopilina*, mais seulement des sous-ensembles variés des espèces connues.

La virulence de ces endoparasitoïdes (succès parasitaire) et la résistance de l'hôte (capacité à éliminer le parasitoïde) sont liés à la génétique des deux partenaires et dépendent aussi d'une combinaison de mécanismes physiologiques et comportementaux influencés par l'environnement [80–85]. Lors du parasitisme, la défense immunitaire de la drosophile (encapsulation de l'œuf et production de radicaux cytotoxiques (ROS et NOS) au cours de la mélanisation) devrait conduire à la mort de l'intrus [86]. Afin d'y échapper, les endoparasitoïdes ont développé des stratégies passives d'immunoévasion (*Asobara*) ou actives immuno-suppressives (*Leptopilina*, *Ganaspis*), efficaces et complexes, qui peuvent compromettre partiellement ou totalement incapaciter les défenses de l'hôte, une stratégie largement employée par de nombreuses autres espèces de parasitoïdes [87,88].

Les stratégies passives peuvent être le masquage/mimétisme de caractéristiques de surface qui empêchent la reconnaissance de l'œuf ou de la larve par le système immunitaire de l'hôte, la ponte de l'œuf dans des tissus de l'hôte peu accessibles ou l'enveloppement de l'œuf dans des tissus hôte [89,90]. Les stratégies actives passent par la modification et/ou la destruction spécifique de certains des composants immunitaires comme l'inhibition/réduction de la mélanisation et/ou l'altération de la réponse cellulaire, en affectant l'organe producteur d'hémocytes (glande lymphatique hématopoïétique) et/ou directement les hémocytes circulants [45,87,88,91,92]. Ces stratégies actives sont basées sur l'action des composants du venin injecté lors de l'oviposition. Ces composants proviennent à la fois du fluide ovarien et du venin fabriqué au niveau de glandes spécialisées (glandes à venin) faisant partie intégrante du système reproducteur de la guêpe (Figure 7).

Le rôle du venin a fait l'objet de nombreuses études chez les *Leptopilina* à la fois sur le plan de leur effet physiologique chez l'hôte et sur leur composition. Il a été démontré que la microinjection du venin extrait du réservoir de souches virulentes de *L. boulardi* est suffisant pour protéger les œufs d'une souche avirulente en bloquant la réaction d'encapsulation et la mélanisation [93].



**Figure 7: Appareil à venin de femelle *Leptopilina* sp.**

Au centre : le venin fabriqué au niveau d'une glande (G) unique est transféré par l'intermédiaire d'un long canal pour être stocké dans le réservoir (R). Une partie du venin stocké est injectée en même temps que l'œuf par l'ovipositeur (O) au cours du parasitisme (les ovaires ont été retirés pour une meilleure visualisation). La taille de la glande est d'environ 0,7 mm et le réservoir contient environ 15 nl de venin. A gauche : photographie d'une femelle *Leptopilina* (2 à 3 mm) l'ovipositeur en extension pour parasiter une larve de drosophile (Crédit image : Michael Martin, Reed College). A droite : Microscopie électronique d'une coupe de réservoir montrant les vénosomes.

Ces venins sont composés de protéines solubles et également contiennent des vésicules particulières nommées particules pseudo-virales (Virus-like particles ; VLPs) car elles ressemblent morphologiquement plus ou moins à des virus (Figure 7) [94] (voir plus loin). Cette dénomination provient du fait qu'au moment de leur découverte, la présence de particules virales avait été montrée au niveau du fluide ovarien d'un certain nombre de parasitoïdes appartenant aux familles des Braconidés et des Ichneumonidés, parasitoïdes de Lépidoptères (pour revue [95]). Chez ces espèces, les particules sont fabriquées au niveau des cellules d'une partie spécialisée de l'ovaire, le calice, et participent au succès parasitaire. Elles proviennent d'une machinerie virale dont le matériel génétique s'est intégré dans le génome de la guêpe il y a plus de 100 millions d'années (pour revues [96,97]). Les particules de polydnavirus (PDVs) produites ne contiennent pas de séquences virales mais des séquences d'ADN codants pour des protéines de la guêpe qui vont s'exprimer dans les cellules de l'hôte et en modifier le fonctionnement. Il existe cependant une exception dans le groupe de guêpes porteuses d'ichnovirus (PDVs de certaines guêpes Ichneumonidae), l'espèce *Venturia canescens*, chez laquelle les particules d'origine virale produites dans le calice ne contiennent pas d'ADN mais des protéines de la guêpe et sont aussi appelées VLPs [98].

Chez les *Leptopilina*, le mode de fabrication des VLPs au niveau de la glande à venin est très différent de celui des PDVs/VLPs (voir plus loin), leur contenu est différent et protéique, et

elles ne semblent pas contenir d'acide nucléique [94]. Ceci suggère fortement que ces vésicules ne sont pas d'origine virale, aussi, afin d'éviter toute confusion, je les appellerai « **vénosomes** » dans le reste du manuscrit<sup>1</sup>.

Les études transcriptomiques de la glande à venin couplées à l'identification des protéines du venin par protéomique chez les *Leptopilina* ont montré une composition très différente entre les espèces et une forte variation qualitative et quantitative entre souches d'une même espèce [99–101]. Des études plus ciblées ont aussi permis de déterminer le rôle de certaines de ces protéines. Par exemple, une serpine (serine protease inhibitor) contenue dans le venin d'une souche africaine de *L. bouleardi* inhibe l'activation de la cascade phénoloxydase chez son hôte *D. yakuba* [102,103].

Les vénosomes jouent eux aussi un rôle important dans la réussite du parasitisme. L'exemple le mieux décrit est celui de *L. heterotoma* dont les vénosomes purifiés induisent la destruction des lamellocytes *in vitro* et *in vivo* en modifiant le cytosquelette de ces cellules avant d'en induire la lyse [88,104,105]. Cette modification des lamellocytes qui passent d'une forme ronde à bipolaire, un changement qui inhiberait leur capacité d'adhésion et de ce fait la formation de la capsule, est aussi observée après parasitisme par certaines souches de *L. bouleardi* [87,103,106,107].

Certaines des protéines venimeuses sont retrouvées dans les lamellocytes, c'est le cas d'une protéine de 40 kDa sans fonction connue nommée P40 chez *L. heterotoma* qui a aussi été immunolocalisée à la surface des vénosomes dans cette espèce [108]. Chez *L. bouleardi*, une protéine de 30kDa a montré un effet protecteur contre l'encapsulation après purification [109] et a été immunolocalisée sous forme de nombreux spots dans les lamellocytes de morphologie modifiée de *D. melanogaster* après parasitisme ou microinjection de venin [110]. Cette protéine nommée LbGAP fait partie de la famille des RhoGAPs (Ras homologous GTPase Activating Protein). LbGAP a été particulièrement étudiée par notre laboratoire. *In vitro*, elle interagit de façon spécifique avec les Rho GTPases Rac1 et Rac2 [110], connues comme impliquées dans la réorganisation du cytosquelette. De façon intéressante, la mutation de Rac1 ou Rac2 au niveau des hémocytes de drosophile empêche l'encapsulation de l'œuf du parasitoïde [111–113]. Ces protéines du venin qui ont ou sont supposées avoir un rôle dans le succès parasitaire sont appelés de façon générale « facteurs de virulence ».

---

<sup>1</sup> De nos jours « Virus Like Particles » ou « pseudo-particules virales » est aussi un terme largement utilisé pour désigner des particules virales sans génome (= pseudo-virions) obtenues par l'assemblage spontané de protéines de la capsid d'un virus principalement utilisées à but thérapeutique (Zeltins, A. Mol Biotechnol (2013) 53: 92. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9598-4>).

A ce jour, la nature exacte et le rôle des vénosomes dans le mécanisme d'inactivation de la réponse d'encapsulation restent mal définis, même s'il semble qu'ils soient fortement impliqués. Parmi les protéines du venin retrouvées dans les lamellocytes, une seule d'entre elle (P40) a été montrée liée aux vénosomes. Ce système vésiculaire, bien que différent, rappelle le rôle des vésicules extracellulaires (VEs) comme les exosomes ou les microvésicules qui participent à la communication intercellulaire (« comunicasome ») au sein d'un tissu ou d'un organisme [114]. Ces VEs transportent notamment des protéines, des ARN messagers ou des ARNs non-codants et des données récentes suggèrent qu'elles participent aussi aux interactions entre organismes et joueraient un rôle dans le dialogue moléculaire et donc la coévolution entre hôtes et parasites [115,116].

## Objectifs de la thèse

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la compréhension des interactions aux niveaux cellulaire et moléculaire entre le parasitoïde et son hôte. Il porte sur la spécificité du rôle protecteur que jouent le venin et ses composants injectés par la femelle parasitoïde lors de l'oviposition. Le modèle que j'ai utilisé est le couple formé par le parasitoïde *Leptopilina bouvardi* (Cynipidés, Figitidés), avec les larves de drosophiles hôtes et principalement *Drosophila melanogaster*.

La question principale à laquelle ce travail a essayé de répondre est :

**Est-ce que les vénosomes servent de véhicules inter-spécifiques pour transporter les facteurs de virulence dans les lamellocytes de l'hôte du parasitoïde, et si oui quels sont les mécanismes impliqués ?**

Dans ce contexte, les points suivants ont été étudiés :

1. Comment le parasitoïde *L. bouvardi* produit-il ses vénosomes au niveau de la glande à venin et est-ce que les facteurs de virulence comme LbGAP leur sont associés ?
2. Est-ce que les vénosomes sont suffisants pour permettre la protection de l'œuf du parasitoïde et reproduire les effets du venin sur les lamellocytes ?
3. Est-ce que les vénosomes transportent les facteurs de virulence dans les lamellocytes ?
4. Par quel(s) mécanisme(s) les facteurs de virulence/vénosomes entrent-ils dans les lamellocytes, et ce(s) mécanisme(s) participe(ent)-t-il à la spécificité d'espèce hôte ?

## **Partie 2**

### **Interaction**

***D. melanogaster - L. boulardi***

## Variation de la sélection d'hôte et de la réussite parasitaire de *Leptopilina bouvardi*

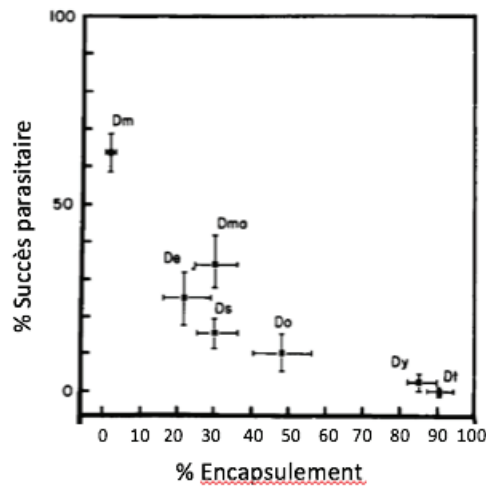
La réussite reproductive des parasitoïdes est étroitement liée à leurs adaptations comportementales et physiologiques vis à vis de l'hôte infesté. Ces adaptations peuvent être observées à différentes étapes du parasitisme : localisation de l'habitat de l'hôte, localisation de l'hôte, acceptation et aptitude à se développer dans l'hôte. Cette aptitude à se développer dépend de la défense immunitaire l'hôte (résistance) et de la capacité du parasite à y échapper (virulence), qui sont génétiquement déterminées et peuvent être influencées par l'environnement. Les interactions entre les Drosophiles et les guêpes parasitoïdes sont parmi les quelques exemples dans lesquels l'existence de variations intraspécifiques du succès parasitaire a été démontrée.

*Leptopilina bouvardi*<sup>2</sup> parasite les larves de drosophile du sous-groupe melanogaster, particulièrement *D. melanogaster* à laquelle elle semble inféodée (pour revue [78]). Les premières études effectuées avec une population capturée en Afrique du nord (Tunisie) sur des fruits d'*Opuntia* montraient un succès parasitaire sur deux espèces sympatriques de drosophiles, *D. melanogaster* et *D. simulans*. Cependant *L. bouvardi* parasite préférentiellement *D. melanogaster* (90% versus 60%), la différence étant encore plus nette quand le parasite a le choix entre les deux hôtes (90% versus 50%). De plus, dans environ 10% des cas, *D. simulans* montre une réaction immunitaire efficace contre l'œuf de *L. bouvardi* [61,62]. Ce résultat été confirmé par d'autres études [117,118] et étendu à d'autres espèces de Drosophiles [119,120]. De ces travaux, trois catégories d'hôtes ont pu être distinguées en fonction du niveau de réaction cellulaire induite et du succès du parasitisme d'une souche de *L. bouvardi* provenant de Guadeloupe (G301-1) : *D. melanogaster* représente la catégorie 1, définie par l'absence de réaction d'encapsulation et un taux élevé de succès parasitaire. La catégorie 2, caractérisée par un taux d'encapsulation modéré et une mortalité élevée, comprend *D. mauritania*, *D. simulans*, *D. erecta* et *D. orena*. La catégorie 3, avec *D. yakuba* et *D. teisseiri*, présente un très faible taux ou une absence de réussite du parasitisme en raison d'une réaction immunitaire très efficace (Figure 8).

---

<sup>2</sup> *Leptopilina bouvardi* Barbotin, Carton and Kelner-Pillault précédemment appelée *Charips mahensis* Kieffer (1911) puis *Cothonaspis bouvardi* Carton and Keller-Pillault (1979).

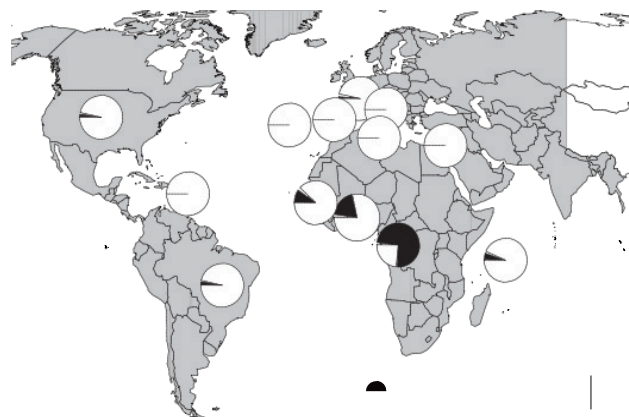




**Figure 8: Le succès parasitaire de *L. bouleari*.**

Le taux d'émergence des parasitoïdes est corrélé avec le taux d'encapsulement dans sept espèces de *Drosophiles* hôtes du sous-groupe *melanogaster*. *Dm*: *D. melanogaster* ; *Dma* : *D. mauritania* ; *Ds* : *D. simulans* ; *De* : *D. erecta* ; *Do* : *D. orena* ; *Dy* : *D. yakuba* ; *Dt* : *D. teisseiri* (d'après [120]).

Par la suite, des études avec différentes populations de *L. bouleari* provenant de l'ensemble de son aire géographique (zones méditerranéennes et Afrique tropicale) ont montré une capacité variable de ces populations à échapper à la réponse immunitaire de sa principale espèce hôte, *D. melanogaster* [83,93,119,121]. La virulence du parasitoïde est plutôt élevée dans la plupart des populations, sauf pour certaines populations provenant d'Afrique tropicale et particulièrement du Congo (Figure 9). Fait intéressant, la diminution de la capacité de virulence contre *D. melanogaster* de cette population « Congo » est parallèle à une augmentation de la virulence contre une autre espèce hôte, *D. yakuba*, dans laquelle le développement des autres populations de *L. bouleari* est par ailleurs infructueux.



**Figure 9: Répartition géographique du taux d'encapsulement des populations de *L. bouleari* dans les populations sympatriques de *D. melanogaster*.**

Le taux d'encapsulement (%) est représenté par la partie noire du camembert. (D'après [122])

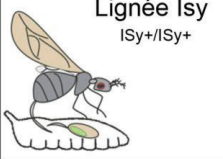



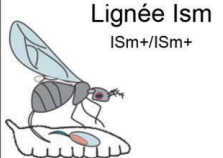



Il a ensuite été établi que la virulence de *L. bouhardi* contre chacune de ces espèces, *D. melanogaster* et *D. yakuba* génétique, due à deux « locus » différents non liés nommés *ISm* (pour la suppression immunitaire de *D. melanogaster*) et *ISy* (pour la suppression immunitaire de *D. yakuba*) [84,123]. Dans le laboratoire, nous disposons de lignées de ces deux types de *L. bouhardi*, différant par les allèles de virulence aux deux loci : une ligne est homozygote pour les allèles *ISm+* (originale de Nasrallah, Tunisie ; Gif stock, no. 431) conférant une virulence contre *D. melanogaster* et une homozygote pour les allèles *ISy+* (originale de Brazzaville, Congo ; Gif stock, no. G486) conférant une virulence sur les souches dites « sensibles » de *D. yakuba* (Figure 10). Lors de tests de choix, les femelles *ISy* préfèrent *D. yakuba* à *D. melanogaster* comme hôte d'oviposition indiquant ainsi une adaptation comportementale de cette lignée [103]. De plus, au Congo deux autres espèces de drosophiles sont infestées par *L. bouhardi* suggérant que cette population locale a une gamme d'hôte plus étendue que les populations de type méditerranéen qui réussissent principalement sur *D. melanogaster*.

Ce premier niveau de variabilité génétique intraspécifique de virulence a parallèlement permis la découverte d'une variabilité intraspécifique au niveau des hôtes [124–126]. Ces auteurs ont utilisé des lignées isofemelles obtenues à partir de populations de *D. melanogaster* et mesuré les taux d'encapsulation d'une population sympatrique de *L. bouhardi*. La capacité de réponse contre la guêpe parasite variait au sein des différentes lignées de 10 à 90% et ceci n'a pas changé au cours des générations successives testées, suggérant fortement l'existence d'un contrôle génétique de la réponse au sein d'une population d'hôte donnée.

Grâce à l'utilisation des souches caractérisées de parasitoïdes (*ISm* et *ISy*), des lignées isofemelles de *D. melanogaster* montrant différents niveaux de réponse immunitaire ont pu être sélectionnées. Les mouches « résistantes » encapsulent les œufs du parasite *ISy* dans les 24-48 heures suivant l'infestation, tandis que les mouches « sensible » à ce parasitoïde ne présentent pas ou peu de réponse d'encapsulation. Les lignées similaires ont été mélangées pour former une population résistante et une sensible. Aucune de ces lignées n'encapsulent la lignée *ISm* [126,127]. Des croisements et analyses génétiques ont ensuite montré que la résistance est due à un seul gène majeur, (*Rlb*), l'allèle résistant étant dominant. Suite à des transferts de chromosome et backcross successifs, deux souches, l'une résistante R, l'autre sensible, S, ont été obtenues, qui diffèrent essentiellement par une large région sur le chromosome 2. *Rlb* a été localisé plus précisément par différentes approches dans la région 55-56 du chromosome 2R de *D. melanogaster* [126,127]. Enfin, une approche spécifique a permis d'identifier deux candidats possibles pour ce gène dont

*edl / mae* impliqué dans le contrôle de la prolifération et différenciation cellulaire, et contrôlant l'expression de nombreux autres gènes [128–131]. Le même modèle d'étude a mis en évidence que la résistance de *D. yakuba* à la lignée ISy dépend aussi d'un gène majeur (*Rlb<sub>ISy</sub>*) mais le gène impliqué n'a pas été localisé ou identifié à ce jour [82].

La Figure 10 résume ces différentes interactions : les parasitoïdes de type *L. bouleardi* ISm, représentent le type le plus répandu, ils sont très virulents sur *D. melanogaster*, quelle que soit la souche hôte, mais incapables d'échapper à l'encapsulation par *D. yakuba*. Le succès de ce type de lignée est donc spécifique à l'espèce hôte. En revanche, les parasitoïdes ISy, peuvent infecter avec succès à la fois *D. melanogaster* et *D. yakuba*, mais selon le génotype de l'hôte (sensible vs résistant) [82,103].

		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. yakuba</i>	
		Lignée susceptible Rib- / Rib-	Lignée résistante Rib+ / Rib+	Lignée R1 Rlb <sub>ISy</sub> - / Rlb <sub>ISy</sub> -	Lignée R2 Rlb <sub>ISy</sub> + / Rlb <sub>ISy</sub> +
<i>L. bouleardi</i>	Lignée ISy ISy+/ISy+	 Succès parasitaire	 Encapsulation	 Succès parasitaire	 Encapsulation
	Lignée ISm ISm+/ISm+	 Succès parasitaire	 Succès parasitaire	 Encapsulation	 Encapsulation

**Figure 10: Interaction génétique drosophiles-*L. bouleardi*.**

Résultat du parasitisme entre les hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* et les souches de types ISm et ISy de *L. bouleardi*. (D'après [45,103])

## La physiologie de l'interaction

La défense : la réponse immunitaire des drosophiles.

Au cours des chapitres précédents, la réponse immunitaire des drosophiles a été décrite succinctement afin de mieux comprendre les interactions avec les parasitoïdes. On trouvera ici une description plus détaillée des mécanismes en jeu au cours de l'oviposition et de l'encapsulation.

Une fois que la femelle parasitoïde a localisé un hôte dans son habitat, elle l'attaque à l'aide de son ovipositeur. La femelle *L. bouvardi* cherche son hôte dans le substrat nutritif par des successions de sondage du milieu avec son ovipositeur (probing) en se déplaçant à sa surface. Cette insertion de l'ovipositeur pourrait être faite en partie « au hasard » et être liée pour partie à l'identification visuelle et odorante des larves ou en réponse aux vibrations transmises par leur déplacement au substrat dans lequel elles sont enfouies [132]. Lorsque l'ovipositeur rencontre la cuticule de la larve hôte, la première barrière à l'infestation, celle-ci perçoit les stimuli mécaniques générés par cette attaque, notamment grâce à deux modalités mécano-sensorielles : le toucher et la mécano-nociception lorsque la cuticule et l'hypoderme sous-jacent (lame basale) de la larve sont endommagés par la pénétration de l'ovipositeur [52,133]. Cette perception de l'attaque déclenche des comportements défensifs stéréotypés de la part de la larve pour faire échouer l'oviposition. Suivant l'intensité du stimulus et sa localisation somatotopique la réponse ira d'un simple changement de direction (évitement) à une contorsion ou une roulade (la larve roule autour de son axe antéro-postérieur, en « tire-bouchon ») lors de la pique [52,133]. Pour éviter cette réaction physique, certains parasitoïdes comme *L. heterotoma* contiennent dans leur venin un ou des composés induisant une paralysie transitoire, mais il semble que ce ne soit pas le cas chez *L. bouvardi* [134].

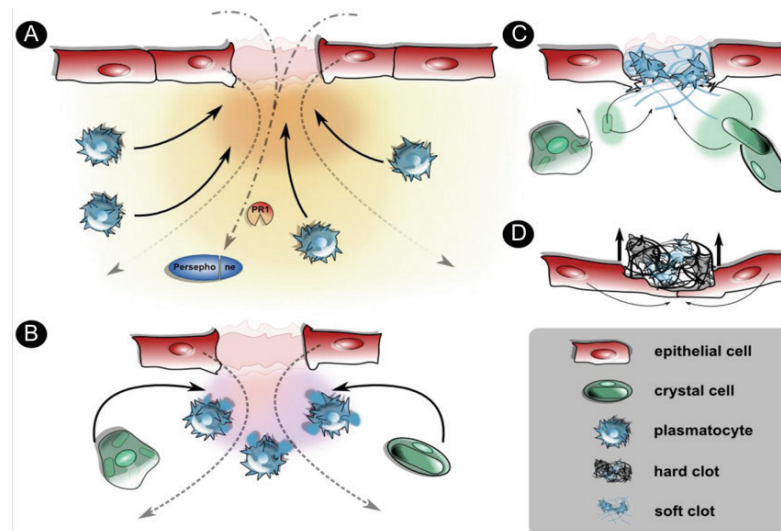
Les messages nerveux générés lors du percement de la cuticule et l'épithélium sous-jacent semblent jouer un rôle dans la réponse immunitaire qui va suivre l'oviposition. Par exemple, l'inactivation des neurones multidendritiques de classe IV, qui détectent les contacts provenant de stimuli externes et induisent les comportements d'évitement, altère la réponse cellulaire contre le parasitisme des guêpes [135,136]. Ces études montrent entre autres que les gènes de nociception codant les récepteurs mécano-sensoriels *painless* et *Piezo*, deux canaux ioniques TRP (transient receptor potential) exprimés dans les neurones de classe IV, sont essentiels pour la réponse immunitaire cellulaire provoquée par le parasite, et en particulier l'augmentation du nombre de lamellocytes circulants. Ceci suggère que ces neurones sécrètent des molécules de signalisation favorisant l'induction et la différenciation des lamellocytes.

La destruction de l'épithélium lors de la pénétration de l'ovipositeur va déclencher chez la larve de *D. melanogaster* un mécanisme de cicatrisation qui implique une migration cellulaire locale et le recrutement d'hémocytes suite à la libération d'attractant, ainsi que des processus de mélanisation locaux (pour revues [137–139]) (Figure 11). La blessure entraîne une rapide vague de calcium qui se propage à travers l'épithélium blessé [140]. Chez la drosophile, ce signal calcique

active la NADPH oxydase Duox dans l'épithélium ce qui génère du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) au niveau de la plaie qui agit comme un signal précoce de lésion [140]. La libération des débris cellulaires et l'apoptose cellulaire provoquées sont aussi des déclencheurs de la migration des cellules hématocytaires phagocytaires, en particulier des plasmotocytes qui vont s'accumuler au niveau de la zone blessée. Cette réaction pourrait être également renforcée par la présence de produits microbiens introduits par l'ovipositeur. De nombreux gènes sont activés dans les cellules adjacentes aux sites de la plaie qui participent à la régénération du tissu lésé [141–143]. Au niveau des cellules environnantes, le récepteur tyrosine kinase (RTK) Pvr (homologue des récepteurs vertébrés du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)) et son ligand, Pvf1, sont requis pour la fermeture des plaies larvaires. D'autres gènes de nombreuses voies de signalisation comme les voies Jun (JNK) et Toll, incluant le ligand extracellulaire Spätzle, le récepteur Toll et le facteur de transcription Dif, participent aussi au système de détection et d'activation des gènes de régénération (pour revue [144]). Aux niveaux de ces cellules, le remodelage du cytosquelette (*via* les RhoGTPases, l'actine, la myosine, les microtubules, la E-cadhérine) et de la membrane plasmique sont impliqués [138,141]. Une réaction de coagulation a lieu pour limiter la perte d'hémolymphe et également piéger les microbes [145,146]. On pense que le processus de coagulation de l'hémolymphe est similaire à la production de pièges fibreux extracellulaires par les neutrophiles de mammifères après activation des cytokines. Ces pièges tuent les bactéries extracellulaires indépendamment de la phagocytose [147]. Différentes analyses protéomiques du caillot montrent que de nombreuses protéines participent à sa constitution, les principales étant l'Hémolectine et Fondue, deux protéines exprimées dans les plasmotocytes ainsi que des enzymes de type transglutaminases et des protéases à serine [146,148–151].

La mélanisation de la plaie fait appel à l'activité phénoloxydase (PO) qui proviendrait en partie de la rupture des cellules à cristaux. Cette réaction de noircissement résulte de la synthèse *de novo* de mélanine issue de l'activation de deux pro-phénoloxydases, PPO1 et PPO2 (voir plus loin): la PPO1 fournirait une source immédiate de PO tandis que PPO2 devient disponible plus tard [152].

La plaie faite par l'ovipositeur étant refermée et mélanisée après quelques heures on peut donc supposer que l'oviposition déclenche au niveau local cet ensemble de réponses [153].



**Figure 11: Réponses cellulaire et humorale au cours de la cicatrisation.**

L'effraction de la cuticule (non montrée) et de l'épithélium sous-jacent (lame basale) déclenche une réponse immédiate de cicatrisation précédant la fermeture du site de la blessure. A) les signaux libérés par la blessure attirent les hémocytes : principalement des plasmatoctes qui pourraient provenir des compartiments sessiles adjacents ou être capturés à partir de l'hémolymphe. L'entrée de pathogène conduit à l'activation des patterns recognitions receptors (PRR) et de protéases à sérine (ex. Perséphone). B) La dégranulation et la formation d'un caillot « mou ». Au niveau de la blessure, la dégranulation des plasmatoctes initie la formation d'un caillot impliquant des composés de l'hémolymphe. Les cellules à cristaux sont attirées à ce stade. C) Mélanisation et durcissement du caillot. La rupture des cellules à cristaux libère l'activité phénoloxydase qui enclenche le processus de mélanisation. Les plasmatoctes et les restes des cellules à cristaux sont incorporés au caillot qui durcit. D) Migration cellulaire et cicatrisation. Les cellules de l'épithélium migrent de façon à former un syncytium qui repousse et prend la place du caillot durci.

L'ovipositeur n'est pas qu'un support physique utilisé pour le percement de la cuticule et l'oviposition. Chez *L. heterotoma*, sept sensilles gustatives sont situées à son extrémité distale. Ces sensilles gustatives sont toutes innervées par six neurones [154]. Les caractéristiques des réponses neurales à des échantillons d'hémolymphe de larve non-parasitée, parasitée de façon unique ou doublement parasitée diffèrent significativement, ce qui implique que la discrimination de l'hôte est codée par les neurones récepteurs du goût de l'ovipositeur. Ce codage suggère que les femelles *L. heterotoma* déterminent le statut de l'hôte pour choisir le "meilleur" disponible et éviter de pondre dans un hôte déjà parasité [155]. Il n'est pas clair si ce mécanisme existe chez *L. boulandi* mais la proximité phylogénétique de ces deux espèces le laisse supposer sachant qu'il est présent aussi chez d'autres espèces de parasitoïdes [156,157]. L'acceptation de la larve par la femelle dépend aussi d'autres facteurs comme le fait qu'elle ait déjà oviposité et son nombre d'œufs restant. De plus, cette séquence de détermination de la qualité de l'hôte va aussi influencer le choix de la femelle de féconder ou pas l'ovocyte. Chez la plupart des guêpes parasitoïdes hyménoptères, les mâles se développent à partir d'œufs haploïdes non fécondés, alors que les femelles se développent à partir d'œufs diploïdes fécondés [158]. Cela donne aux femelles un contrôle total sur le sex-ratio des descendants qu'elles produisent.

Lorsque l'ovipositeur pénètre profondément et reste inséré suffisamment longtemps dans le corps de l'hôte pour permettre l'injection d'un œuf : c'est l'oviposition. Cette oviposition se fait en plusieurs phases : il semble que le venin provenant du réservoir soit injecté en premier, précédant de quelques secondes l'œuf avec le fluide ovarien. Cette séquence a été montrée en particulier chez *Asobara japonica* par des expériences d'interruption de l'oviposition [159]. Les larves piquées seulement quelques secondes n'ont pas reçu d'œuf parasitoïde mais elles sont paralysées et meurent. Cet effet est reproduit par l'injection de venin mais peut être supprimé si de l'extrait ovarien est injecté simultanément. La paralysie et la mortalité sont aussi supprimées par l'injection d'extrait ovarien après l'interruption d'oviposition [159].

La défense immunitaire de *D. melanogaster* est basée sur deux composantes : une composante humorale et une composante cellulaire. La composante humorale comprend la production de molécules effectrices (AMP), d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, NOS) et les cascades enzymatiques qui régulent la coagulation et la mélanisation de l'hémolymphe. Les hémocytes sont les acteurs essentiels de la réponse cellulaire. Ils interviennent dans la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation.

Les mécanismes immunitaires innés en réponse à un corps étranger de grande taille consistent en la formation d'une capsule mélanisée. L'encapsulation est évolutivement conservé chez les insectes et il est la preuve visible que l'hôte répond immunitairement. *D. melanogaster* s'est révélée être un excellent modèle pour étudier cette réponse [45,160,161]. Le succès de la réaction d'encapsulation se traduit par la mort de l'œuf et la survie de la drosophile. A l'inverse, si la larve hôte est immuno-déficiente ou si la réponse d'encapsulation est inhibée, c'est une guêpe parasitoïde qui émergera.

Ce sont les mécanismes cellulaires mis en jeu au cours de cette réponse qui seront principalement décrits par la suite car la réponse humorale (en particulier la synthèse d'AMPs) semble peu impliquée (Cf. informations Supplémentaires1).



## Les cellules hémocytaires, origines et rôle dans l'encapsulement

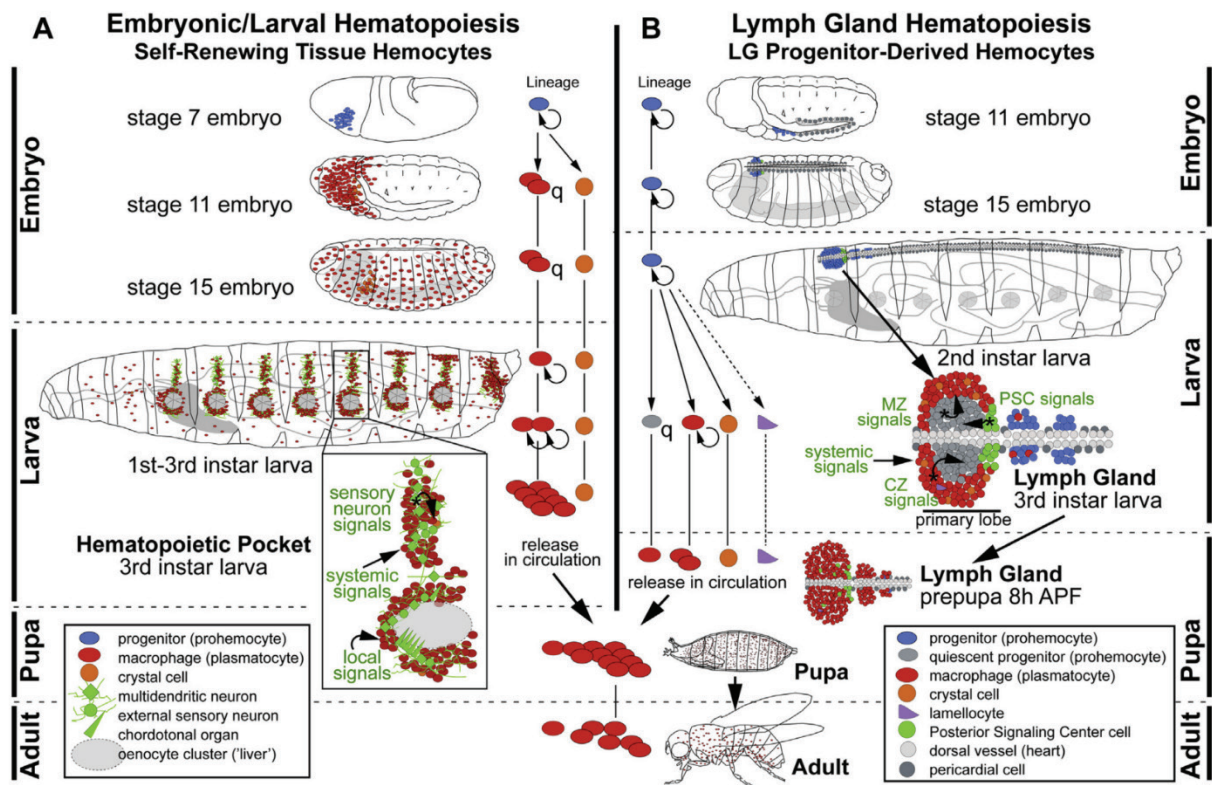
Chez les invertébrés, les cellules sanguines sont communément appelées hémocytes. Il y a moins de types d'hémocytes chez les invertébrés que chez les vertébrés du fait que chez ces derniers une grande partie des cellules sont dédiées à la réponse immunitaire adaptative. Néanmoins, il est possible de distinguer différents types d'hémocytes dans la plupart des espèces d'invertébrés étudiées jusqu'ici [162,163]. Quatre grands types d'hémocytes sont décrits : prohémocytes, granulocytes, plasmocytes et oenocytoides [38,164,165]. Cependant, chez la drosophile la terminologie est différente [48] : les prohémocytes sont des cellules qui peuvent se différencier dans les trois autres types d'hémocytes ; les granulocytes, cellules phagocytaires, sont appelés plasmocytes ; les grandes cellules dédiées à l'encapsulement sont appelées plasmocytes dans la plupart des espèces d'insectes mais lamellocytes chez la *Drosophila*. Enfin, les oenocytoides sont appelés cellules à cristaux (crystal cells) [36,48]. Ces hémocytes peuvent être identifiés grâce à une combinaison de caractères morphologiques, antigéniques et fonctionnels. Les drosophiles ont un système circulatoire ouvert qui diffuse les médiateurs et effecteurs de réponses immunitaires, notamment les cellules sanguines et les peptides antimicrobiens. Le sang, également appelé hémolymph, circule dans l'espace extracellulaire-extravasculaire ou hémocoel grâce aux contractions cardiaques [166].

### *Hématopoïèse chez D. melanogaster*

Il existe de nombreuses revues récentes sur l'hématopoïèse et sur les interactions moléculaires entre les cellules impliquées chez la drosophile [162,167–175]. Le texte suivant ne donnera pas une vision exhaustive de tous les travaux se rapportant à ce domaine mais s'attachera à faire ressortir quelques traits importants pour comprendre les interactions drosophiles-parasitoïdes.

L'hématopoïèse est un processus cellulaire complexe qui fournit aux métazoaires des cellules sanguines tout au long de leur cycle de vie. Chez la drosophile, on pensait que les hémocytes étaient produits en deux vagues successives, une au cours de l'embryogenèse et l'autre durant les stades larvaires, avec des hémocytes adultes différenciés provenant des hémocytes embryonnaires et larvaires [176,177]. Cependant, les études récentes suggèrent une plasticité bien plus élevée, avec des sites hématopoïétiques distribués le long de la larve et aussi chez la mouche adulte [167]. La Figure 12 résume les différentes étapes de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire.





**Figure 12: Ontogenèse des lignées de cellules sanguines et régulation de l'hématopoïèse chez la drosophile.**

(A) Emergence et développement du tissu où vont s'auto-renouveler les hémocytes au cours de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire. Les hémocytes de drosophile proviennent de progéniteurs pro-hémocytaires (bleus) dans le mésoderme de la tête au stade embryonnaire 7. Après quatre cycles de division, les progéniteurs cessent de proliférer et se différencient en 600 à 700 plasmatoctes (en rouge) et en un petit nombre de cellules cristallines (en orange). Les cellules cristallines restent groupées autour du proventricule. Les macrophages différenciés commencent à migrer vers l'extrémité antéro-postérieure de l'embryon (stade 11). Au stade 15, les macrophages ont uniformément colonisés l'embryon. Tous les plasmatoctes restent quiescents (q) jusqu'à la fin de l'embryogenèse. A la transition larvaire, les plasmatoctes et les cellules cristallines embryonnaires persistent. Les plasmatoctes colonisent des niches hématopoïétiques au niveau de chaque segment larvaire (HPs), qui contiennent également des clusters de neurones sensoriels (vert), pour former le compartiment sessile. Ceci redémarre la prolifération des plasmatoctes (auto-renouvellement), qui se poursuit tout au long de la vie larvaire. Les neurones sensoriels régulent la localisation et l'expansion de ces plasmatoctes « tissulaires », ce qui soulève la possibilité que les stimuli sensoriels de l'environnement et l'activité neuronale fournissent une autre couche de régulation. Le destin de ces plasmatoctes est aussi régulés par des signaux systémiques et / ou locaux (verts) qui en cas de défi immunitaire peuvent provoquer une mobilisation prématurée de ces hémocytes sessiles et induire leur différenciation en lamellocytes (non montré). Au cours du développement larvaire normal, les hémocytes sessiles ne contribuent que progressivement au pool de plasmatoctes circulants dans l'hémolymphe et ne sont libérés de leurs microenvironnements qu'au début de la métamorphose. Tout au long du développement larvaire, les cellules cristallines colocalisent avec les macrophages tissulaires, mais ne présentent qu'une augmentation marginale du nombre de cellules.

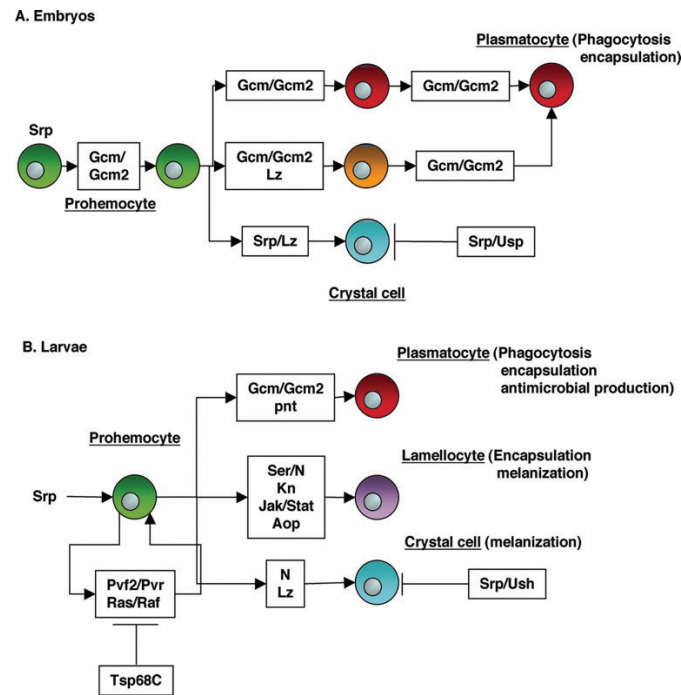
(B) L'hématopoïèse dans la glande lymphatique. Les pro-hémocytes dérivent de précurseurs hémangioblastiques du mésoderme cardiogénique de l'embryon. Ces progéniteurs après quatre divisions dans l'embryon continuent faiblement à proliférer jusqu'au deuxième stade larvaire. Au cours du troisième stade larvaire, les lobes primaires de la zone corticale (CZ) se dilatent par la prolifération et la différenciation des hémocytes en plasmatoctes, en un petit nombre de cellules cristallines et occasionnellement en quelques lamellocytes. Les progéniteurs présents dans la zone médullaire (MZ) sont devenus quiescents (q). La prolifération et la différenciation des hémocytes sont sous le contrôle d'un large éventail de signaux provenant de la glande lymphatique (signaux du centre de signalisation postérieure PSC, de la CZ et de la MZ) et de sources systémiques, tels que des neurotransmetteurs et des facteurs de croissance provenant du cerveau, et des niveaux de composés nutritionnels. Au fur et à mesure du développement, pratiquement tous les hémocytes de la glande lymphatique se différencient, et 8 heures après la formation du puparium (APF), toutes les cellules de la glande lymphatique ont été libérées dans la circulation. Il semble que les mouches adultes aient une activité hématopoïétique, mais elles survivent principalement grâce aux plasmatoctes qui persistent depuis les stades de développement précédents. (D'après [175]).

Chez l'embryon, les plasmacytes et les cellules cristallines se forment et prolifèrent à partir de pro-hémocytes provenant du mésoderme procéphalique [178] (Figure 12). L'identité des hémocytes embryonnaires est spécifiée par l'expression du facteur de transcription GATA Serpent (*srp*) [170,179]. *srp* est requis pour la spécification du primordium hémocytaire dans le mésoderme de la tête au stade embryonnaire précoce et, plus tard, pour l'expression génique au cours de la maturation des hémocytes. De même, les premières cellules de la glande lymphatique, connues sous le nom de précurseurs hémocytaires, commencent à exprimer *srp* bien avant que d'autres marqueurs de différenciation ou de maturation puissent être détectés. L'activité de *srp* est modulée par le recrutement de cofacteurs de type FOG (Friend Of GATA) U-Shaped et RUNX (Lozenge) (Figure 13). *Srp* est nécessaire pour la formation des deux populations de cellules sanguines (plasmacytes et cellules cristallines) [180]. Les facteurs de transcription « cellules gliales manquantes » *Gcm* et *Gcm2* sont exprimés dans tous les pro-hémocytes. L'inhibition de *Gcm* / *gcm2* dans certains pro-hémocytes conduit à l'expression du facteur de transcription *Lz* qui les induit à devenir des cellules cristallines. L'expression continue de *Gcm* / *Gcm2* conduit les autres à se transformer en plasmacytes [181]. La liaison du ligand Serrate sur le récepteur Notch est critique dans la régulation de l'expression de *Lz* et dans la spécification des précurseurs de cellules cristallines dans la glande lymphatique [47].

La seconde vague d'hématopoïèse s'effectue durant les stades larvaires, où deux compartiments hématopoïétiques peuvent être observés (Figure 12). Le premier est la glande lymphatique, le second est le compartiment sessile.

La glande lymphatique. Elle se forme au contact du tube cardiaque au cours de l'embryogenèse, puis va augmenter de taille durant les trois stades larvaires. Au dernier stade larvaire la glande est mature, elle est formée par deux lobes antérieurs proéminents (ou primaires) et d'une suite de plus petits lobes postérieurs (ou secondaires). Les lobes antérieurs sont remplis de progéniteurs hématopoïétiques et d'hémocytes différenciés et les lobes secondaires principalement de progéniteurs. Les lobes antérieurs ont une morphologie particulière, ils comportent trois zones : une zone médullaire (ZM) avec les progéniteurs hématopoïétiques, une zone corticale (ZC) où se différencient les hémocytes et le PSC (Posterior Signaling Center), un centre de signalisation localisé dans la partie postérieure composé d'une trentaine de cellules environ [182]. Le PSC est requis pour maintenir un pool de progéniteurs hématopoïétiques pluripotents dans la glande lymphatique, cette spécification sollicitant la fonction du gène Collier (*col*), apparenté aux EBF (Early-B Cell Factor) humains. Le PSC secrète des signaux diffusibles (Figure 13), capables

d'activer différentes voies de signalisation dans les autres compartiments de la glande lymphatique comme le facteur hedgehog (Hh) et le ligand PVF1 (platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor-like factor) [183]. Hh agit directement sur les progéniteurs de la ZM pour les maintenir de leur état pluripotent. PVF1 agit sur les hémocytes en cours de différenciation, il stimule leur sécrétion d'ADGF-A (adenosine deaminase-related growth factor-A), un enzyme qui en modifiant l'adénosine extracellulaire conduit à l'inactivation de la voie de signalisation adénosine/AdoR (adenosine receptor) dans les cellules de la ZM [184]. Ce double contrôle permet un maintien de l'équilibre entre progéniteurs et cellules différenciées. D'autres voies de régulation sont importantes pour la prolifération des cellules du PSC comme la voie BMP (appelée Dpp (decapentaplegic) chez la drosophile) et la voie Wnt (wingless). Un équilibre entre les niveaux de signalisation Wnt et Dpp détermine le nombre de cellules du PSC [185]. Le système vasculaire adjacent contribue également à l'homéostasie de la glande lymphatique : les cellules vasculaires produisent des glycoprotéines SLIT sécrétées qui activent leurs récepteurs Roundabout (Robo) dans le PSC. L'activation de Robo contrôle la prolifération et le regroupement des cellules du PSC en régulant le facteur de transcription Myc, l'activité des petites GTPases et la synthèse de D-cadhérine impliquée dans les interactions entre cellules. Des signaux du système vasculaire contribuent donc à réguler le taux de différenciation des cellules sanguines via la régulation de la morphologie du PSC. Les voies de signalisation Insuline / IGF (IIS) et Target of Rapamycin (TOR), constituants du système de détection des nutriments, semblent aussi importants pour le déclenchement de la prolifération des progéniteurs [186]. Dans les larves L3, les cellules du PSC agissent pour maintenir l'activité de signalisation JAK/STAT dans les pro-hémocytes, préservant ainsi leur caractère multipotent nécessaire pour que ces cellules puissent adopter un destin lamellocytaire en réponse au parasitisme. Le rôle de la voie de signalisation JAK-STAT dans l'immunité cellulaire a d'abord été suggéré par des études sur les mutants  $Hop^{Tum-1}$ . On a observé très tôt que cette mutation conduit à un nombre accru de plasmacytes et à la différenciation massive des lamellocytes qui se retrouvent dans la circulation, conduisant à la formation de masses noires ou pseudotumeurs mélaniques par une reconnaissance aberrante du « soi » [171,187–189]. Certains mutants des voies Toll/NFKappaB peuvent aussi former des masses mélanotiques. Les voies de signalisation Ras / Raf / MAPK /Toll et Notch sont également impliquées dans la différenciation et la prolifération des hémocytes [190–195]. Un grand nombre de ces facteurs sont retrouvés surexprimés lors des études transcriptomiques effectuées sur larves entières après parasitisme (Cf. Informations Supplémentaires 1)



**Figure 13: Régulateurs de l'hématopoïèse et fonctions hématocytaires chez *D. melanogaster*.**

A) Au niveau embryonnaire. Les progéniteurs hématocytaires au niveau du mésoderme procéphalique peuvent se différencier en deux types d'hématocytes (plasmatoctytes et cellules à cristaux) avec des fonctions distinctes (indiquées sur la droite). B) au niveau de la glande lymphatique. La glande lymphatique contient de nombreux progéniteurs hématocytaires qui peuvent se transformer en trois types d'hématocytes (plasmatoctytes, cellules à cristaux et lamellocytes). De nombreux facteurs et voies de signalisation régulant l'engagement de ces lignées hématopoïétiques dans ces deux compartiments ont été identifiés (voir texte). (D'après [13,181])

Normalement, la glande lymphatique éclate à la métamorphose (fin du troisième stade larvaire/début de pupaison), où les hématocytes libérés sont essentiels pour éliminer les cellules larvaires et les bactéries libérées par l'intestin en reformation. Les cellules immunitaires produites pendant les stades embryonnaire et larvaire se retrouvent chez l'adulte et, récemment, il a été montré que des cellules progénitrices forment des groupes de cellules sous cuticulaires (nœuds hématopoïétiques) qui peuvent se différencier en cellules à cristaux et plasmatoctytes (Figure 12) [168].

Le compartiment sessile. Au début du stade larvaire, les prohématocytes et les plasmatoctytes embryonnaires sont redistribués et colonisent des niches ou cryptes sous-cuticulaires de chaque segment de la larve (Figure 12) [169,196–198]. Les hématocytes de ces compartiments prolifèrent par auto-renouvellement et passent à l'état différencié, ce sont donc des sites hématopoïétiques fonctionnels [169]. Des cellules à cristaux sont formées dans ces niches par trans-différenciation de plasmatoctytes matures, qui perdent l'expression du facteur de différenciation Nimrod C1 ainsi que leur activité phagocytaire, pour acquérir l'expression du marqueur Lz [169]. La protéine Eater, récepteur transmembranaire de la famille Nimrod présent chez les plasmatoctytes est nécessaire

pour permettre leur recrutement ainsi que celui des cellules à cristaux au niveau des compartiments sessiles [196]. Le Système Nerveux Périphérique (SNP) est impliqué dans la formation des compartiments sessiles : en effet en absence de certains neurones du SNP comme dans le mutant atonal (*ato*), on observe un déficit en hémocytes sessiles, tandis qu'un nombre plus élevé de neurones, généré par l'expression ectopique du gène proneural *scute*, attire les hémocytes en circulation vers ces neurones [172]. En plus des cellules à cristaux, les compartiments sessiles sont aussi responsables de la production de lamellocytes après parasitisme (cf. plus loin) [197].

Les hémocytes résidents dans le compartiment sessile ne sont pas immobiles mais peuvent se déplacer latéralement entre le tégument et la couche musculaire et éventuellement rejoindre la circulation. De simple stimuli comme des légers coups de pinceau sont suffisants pour induire ce mécanisme [199]. En revanche, lorsque des voies de signalisation importantes telles que JAK / STAT ou Toll sont artificiellement activées (Cf. Informations supplémentaires 1), par exemple en exprimant des formes constitutivement actives de récepteurs dans les hémocytes, il y a peu d'hémocytes sessiles et la majorité des cellules sanguines sont circulantes [200].

Dans la larve non parasitée, les hémocytes circulants sont majoritairement des plasmotocytes (90% des hémocytes), le reste étant des cellules à cristaux et un très faible nombre de prohémocytes et de lamellocytes. Le nombre d'hémocytes circulants au stade larvaire passe de quelques centaines au début du premier stade larvaire à environ 6000-7000 cellules à la fin du troisième stade larvaire [198]. Tout au long du développement larvaire, des plasmotocytes sont mis en circulation graduellement à partir du compartiment sessile et augmentent la charge hémocytaire. Les hémocytes sessiles représentent à peu près un même nombre d'hémocytes en réserve que les cellules circulantes [196,198,201].

#### **Informations supplémentaires 1 :**

Dans un mini-crible, Zettervall et al. [202] ont surexprimé différents gènes dans les hémocytes, en utilisant le système GAL4 et le « driver » Hemese-GAL4 spécifique des hémocytes. Plusieurs transgènes ont été testés, représentant plusieurs voies de signalisation importantes. Une augmentation drastique du nombre d'hémocytes circulants est causée par des récepteurs tyrosine kinases, tels que *Egfr*, *Pvr* et *Alk*, ainsi que par les composants de signalisation en aval *Ras85D* et *Pointed*, soutenant que la voie de la Ras–mitogen-activated protein kinase régule le nombre d'hémocytes. Dans le cas de *Pvr* et *Alk*, ce phénotype s'accompagne également de la formation de lamellocytes. En revanche, l'activation constitutive de *Hopscotch* et de *Hemipterous* augmente massivement la formation des lamellocytes avec peu ou pas d'augmentation du nombre total d'hémocytes. Les voies Jak/Stat et Jun kinase régulent donc la formation des lamellocytes. D'autres signaux, médiés par les expressions *aop<sup>ACT</sup>*, *Toll<sup>10b</sup>* et *Rac1*, provoquent une augmentation simultanée du nombre de lamellocytes et du nombre total de cellules, et le même effet est observé lorsque la signalisation WNT est supprimée.

Plusieurs études transcriptomiques des larves totales après infestation par des parasitoïdes de *D. melanogaster* ont été faites [203,204]. Cependant elles n'utilisent pas toutes les mêmes espèces de parasitoïdes (*A. tabida*, *L. heterotoma*, *L. bouvardi*) ni des souches caractérisées de drosophile vis à vis du parasitisme. L'étude de Schlenke et al., [204] a comparé la réponse des larves à différents temps entre des témoins et après infestation (2–5 h, 9–12 h, 21–24 h). *L. heterotoma* (souche Lh14), qui n'induit pas de capsule chez *D. melanogaster* Ore-R utilisée mais produit une lyse



cellulaire au niveau de la glande lymphatique et la souche *L. boulandi* LB17 (type ISm) dont les œufs ne sont pas non plus encapsulés. Ils ont montré que l'expression de nombreux gènes est augmentée ou inhibée chez les larves attaquées par Lb17 : des gènes impliqués dans les voies Toll, JAK / STAT, des ligands Pvr (récepteur du VEGF) *Pvf1* et *Pvf2*, impliqués dans la migration de l'hématopoïèse et des hémocytes. *Hemmese (He)*, un régulateur négatif de la réponse d'encapsulation cellulaire, augmente 21-24 h après l'infestation, peut-être pour limiter la réponse immunitaire. Ni l'attaque par Lb17 ni par Lh14 n'ont induit de changements évidents dans les voies génétiques Imd, JNK ou Wnt ou dans d'autres gènes candidats de la réponse d'encapsulation. En fait, les membres de la voie Imd *Dredd* et *Relish* sont tous deux significativement sous-régulés après 12h. Plusieurs gènes intervenant aussi dans la voie de régulation de l'activité phenoloxydase sont surexprimés ou sous-exprimés après parasitisme.

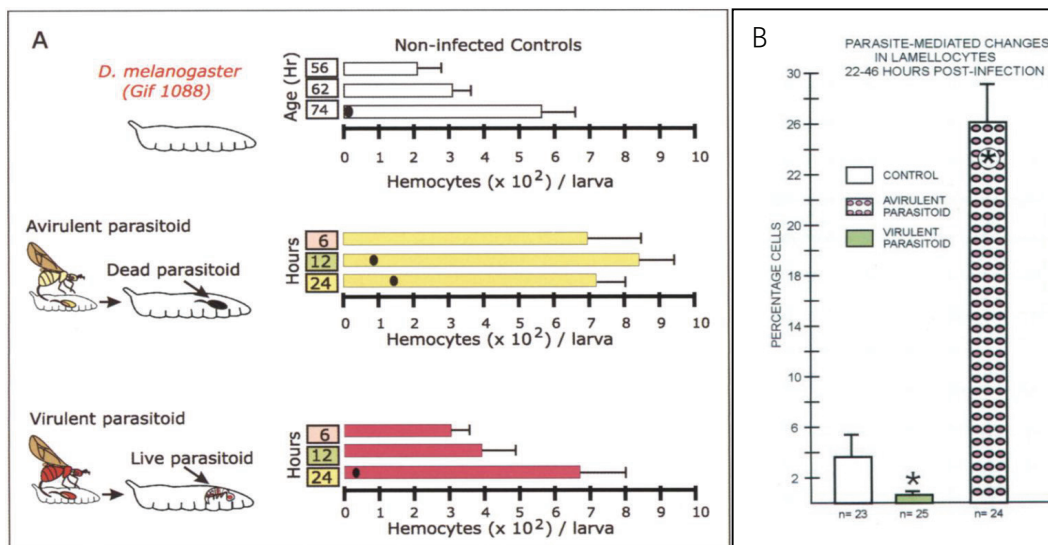
Il semblerait que la voie Toll au niveau du corps gras soit peu ou pas impliquée après parasitisme par *L. boulandi* de type ISy chez *D. melanogaster* [192]. Cependant, Cousteau *et al.*, [205] dans une étude limitée à l'analyse de l'expression des gènes de deux peptides antimicrobiens (AMPs) de *D. melanogaster*, la diptéricine et de la cécropine et du facteur DIF impliqué dans la voie Toll, ont montré que ces deux AMPs sont surexprimés après parasitisme par *L. boulandi* ISy chez les *D. melanogaster* S mais pas chez les R. De même l'expression de *Dif* augmente chez les S mais pas chez les R suggérant que la réponse antimicrobienne pourrait être activée au cours du parasitisme suivant les génotypes du parasitoïde et de la drosophile. Des études complémentaires seraient à effectuer pour trancher cette question.

### *L'encapsulation*

Nous avons vu précédemment que le résultat de l'interaction entre *L. boulandi* et *D. melanogaster* dépend de la génétique du parasitoïde et de l'hôte (Figure 8). En cas d'infestation de la larve de *D. melanogaster* de type résistant seuls les œufs du parasitoïde type ISy sont encapsulés, ceux provenant de femelles ISm échappant à l'encapsulation. Cette différence dans le résultat de l'interaction se traduit aussi par une différence dans la cinétique d'augmentation du nombre de cellules circulantes après infestation par les souches de type ISm ou ISy (Figure 14). Lors de l'infestation par une souche avirulente de type ISy, le nombre d'hémocytes circulants (principalement des plasmatoctes) augmente très rapidement (en moins de six heures). Ce nombre reste quasi constant ensuite. Des lamellocytes apparaissent après 12h et leur nombre continue d'augmenter pendant 48h. Dans le cas d'une souche virulente ISm, le nombre d'hémocytes circulants reste semblable à celui des témoins non parasités. Dans la suite du texte, nous nous intéresserons aux mécanismes mis en jeu dans la réponse de *D. melanogaster* de type résistante (R) à l'infestation par une souche de type ISy.

L'infestation se produit principalement au second stade larvaire. L'œuf est déposé dans l'hémocoèle, en général au niveau abdominal où il flotte librement. Très rapidement, il va être reconnu comme « non-soi » par le système immunitaire de la larve ce qui va déclencher les différents mécanismes conduisant à l'encapsulation. Celui-ci implique trois étapes clés avec des actions coordonnées à la fois des plasmatoctes et des lamellocytes. Premièrement, les plasmatoctes circulants détectent et reconnaissent l'œuf de parasitoïde dans l'hémocoèle et s'attachent à son chorion. Des lamellocytes sont produits et relâchés depuis les compartiments sessiles. En parallèle, une prolifération et une différenciation massives des pro-hémocytes en lamellocytes se produisent spécifiquement au niveau de la glande lymphatique et induisent son

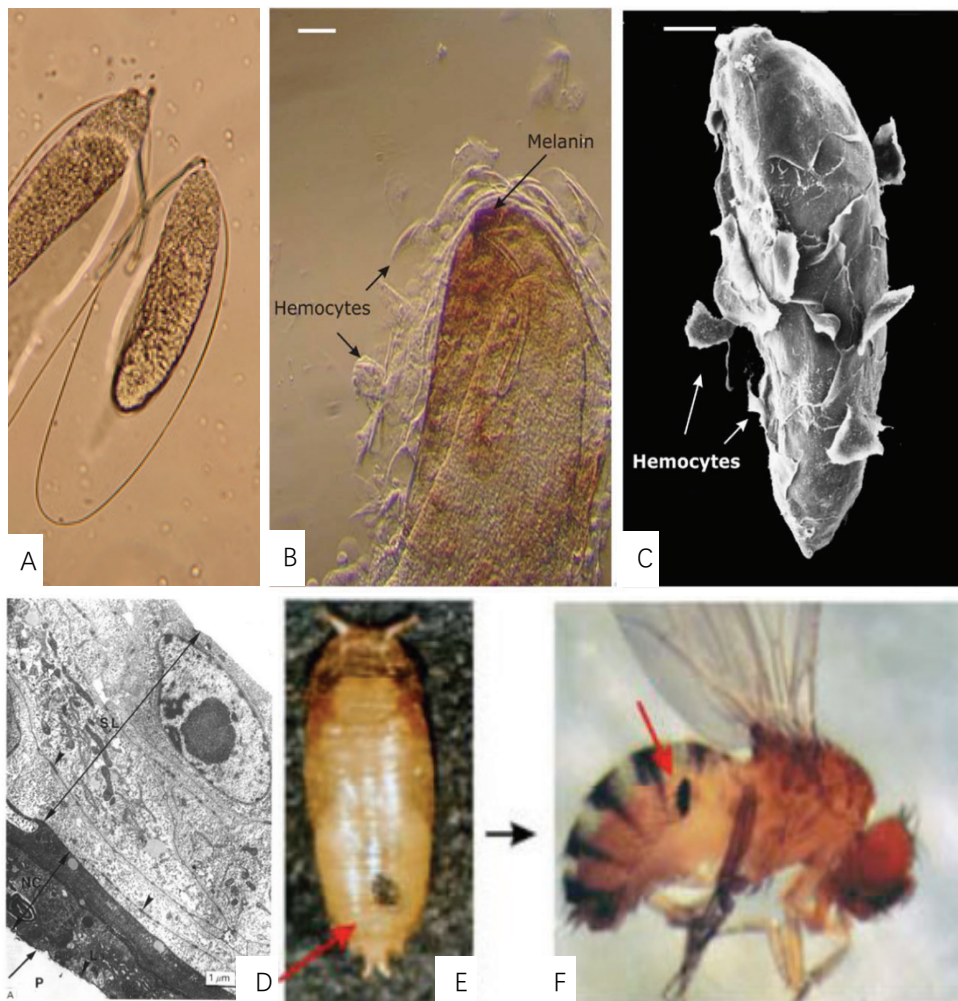
éclatement anticipé [198]. En quelques heures, l'augmentation massive du nombre d'hémocytes circulants permet la formation d'une capsule formée de plusieurs couches cellulaires autour de l'œuf (Figure 15). Finalement, les lamellocytes, comme les cellules cristallines, libèrent leur contenu cellulaire, dont les acteurs du système phénoloxydase, qui activent un processus de mélanisation localisé entraînant probablement la mort de l'œuf du parasite via les produits cytotoxiques issus de la réaction [86,206,207]. La capsule est formée et entièrement mélanisée entre 24h et 48h après l'oviposition (Figure 15).



**Figure 14: Cinétique du nombre d'hémocytes après infestation par des souches virulentes (ISm) et avirulentes (ISy) de *L. bouardi*.**

A) Nombre total d'hémocytes et le nombre moyen de lamellocytes (cercles noirs) en fonction du temps (6, 12 et 24 heures) chez des larves témoins prises au même âge ou parasitées par une souche avirulente (type ISy) ou virulente (type ISm). Les larves proviennent d'une souche de *D. melanogaster* de type résistant (R) [208]. B) Pourcentage de lamellocytes présents dans l'hémolymphe de larves entre 22-46h après infestation par une souche avirulente (type ISy) ou virulente (type ISm) et de larves contrôles du même âge. (D'après [208]).

Les premiers signaux déclenchant la réponse d'encapsulation pourraient provenir de l'effraction de la lame basale par l'ovipositeur. En effet, bien que cela soit controversé suivant les auteurs, une blessure stérile comparable à celle de l'ovipositeur induit une prolifération et une augmentation du nombre de lamellocytes circulants (voir aussi résultats, article 1). L'endommagement mécanique de la cuticule et la rupture de la lame basale constitueraient donc un signal minimal suffisant pour le développement normal des lamellocytes au cours de la réponse immunitaire cellulaire de la larve après parasitisme [153].



**Figure 15: Encapsulation de l'œuf de *L. bouhardi* ISy.**

A) Œuf entouré de son chorion. B) capsule en formation au stade précoce (12 h après l'infestation) et (C) tardif (48h après l'infection ; microscopie à balayage). L'œuf est entouré par les couches successives d'hémocytes puis la capsule mélanise (dépôt de brun). D) Coupe en microscopie électronique de la capsule 24 h après la ponte. Les trois parties différentes de la capsule sont visibles du bas vers le haut : la couche dense L3 sur le chorion des œufs (flèche fine), une zone de cellules nécrotiques (NC) correspondant aux premiers hémocytes qui s'accumulent autour de l'œuf et une large zone d'hémocytes (SL) avec un réticulum endoplasmique rugueux très peu développé. La plupart de ces hémocytes sont des lamellocytes joints côte à côte qui développent de nombreuses jonctions serrées (pointes de flèches). La capsule mélanisée ne se résorbe pas, elle peut être observée au niveau de la puppe (E) et de l'adulte (F). (D'après [86,206,209]).

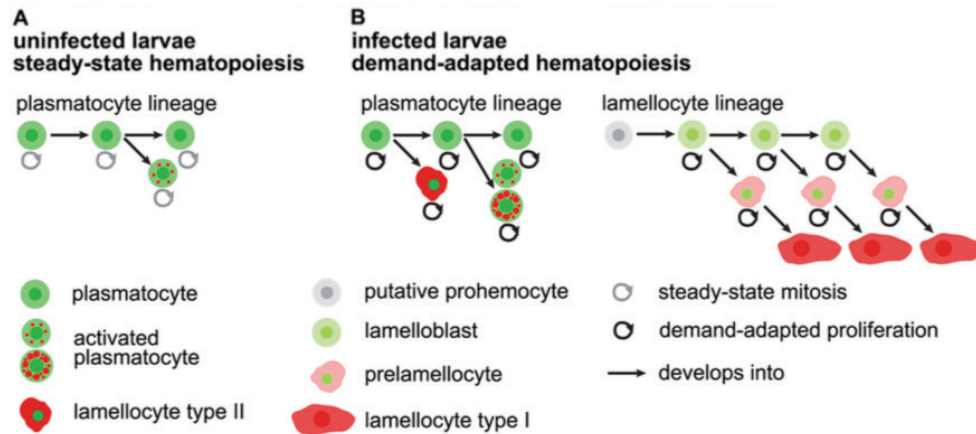
Nous avons vu qu'au cours d'une blessure de nombreux signaux sont émis et activent une réponse immunitaire locale et systémique, mais la façon dont est transmise cette information aux sites de multiplication et de différenciation des hémocytes reste peu connue à ce jour. On peut supposer que des facteurs diffusibles en sont responsables. Il a été proposé qu'un signal délivré au PSC initie la différenciation des lamellocytes en induisant une expression restreinte du facteur de transcription Collier [210]. Parmi les facteurs diffusibles, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites au site de pénétration à la fois par la destruction des cellules de la lame basale et la dégranulation des plasmotocytes et des cellules à cristaux pourraient jouer ce rôle. Il a été montré



que les précurseurs des hémocytes produisent plus de ROS que les autres cellules et pourraient donc être sensible au niveau de ROS environnant [186,211,212]. Ces ROS agiraient au niveau des progéniteurs dans le PSC par la voie Toll / NF- $\kappa$ B et la signalisation EGFR / Erk en réponse au parasitisme [211,213]. Ceci renforce l'importance déjà connue des voies de signalisation Toll en sus de JAK / STAT dans la différenciation et la prolifération des lamellocytes dans la glande lymphatique après l'infestation (bien qu'elle semblent agir indépendamment lors de la réponse au parasitisme [214]). En effet une désactivation complète de la signalisation JAK / STAT se produit dans les cellules de la zone médullaire (MZ) de la glande 4 à 6 heures après l'infestation [171], ce qui précède de plusieurs heures les premiers signes de différenciation lamellocytaire [188,215,216]. Ces facteurs, comme les ROS et l'ATP libérés au niveau de la blessure (directement par les cellules lésées ou les cellules adjacentes), pourraient aussi agir sur la division et la différenciation des hémocytes sessiles en plus du déclenchement d'un mécanisme local d'attraction vers la blessure [169,200,217].

Au cours de la réponse, l'augmentation de la sécrétion de la cytokine Edin au niveau du corps gras semble aussi impliquée dans la multiplication et la mobilisation des plasmacytes depuis les compartiments sessiles [218]. L'utilisation de drosophiles mutantes pour la Rac1 GTPase a aussi montré le rôle de cette protéine et l'implication de la Jun N-terminal kinase Basket (*Bsk*), ainsi que de la stabilisation des filaments d'actine dans le recrutement de la population d'hémocytes sessiles [112]. Cette stabilisation de l'actine est nécessaire pour l'activation des hémocytes induite par Rac1 en abaissant l'expression de la Cofiline (codée par le gène *twinstar* (*tsr*)). L'élimination de *Bsk* par expression de son ARNi supprime la libération d'hémocytes sessiles induite par Rac1 et également l'induction de Rac1 dans les lamellocytes. Rac1 agirait sur l'activité de *Bsk* et la formation d'actine stable pour l'activation immunitaire cellulaire, conduisant à la libération d'hémocytes sessiles et à une augmentation du nombre d'hémocytes circulants.

Récemment, il a été montré qu'au moins deux sous-types de lamellocytes existent dans les larves après parasitisme, répondant à une hématopoïèse « adaptée à la demande » [46] : le type I, provenant de précurseurs cellulaires des lamellocytes au niveau du compartiment sessiles, les lamelloblastes, qui peuvent être détectés dans la circulation 8h après parasitisme. Ces lamelloblastes se diviseraient activement pour donner des pro-lamellocytes puis les lamellocytes de type I. Les lamellocytes de type II proviendrait de la transdifférenciation des plasmacytes (Figure 16).



**Figure 16: Modèle de la formation des lamellocytes en réponse à l'infestation à partir du compartiment sessile.**

(A) Hématopoïèse à l'état d'homéostasie : les plasmatoctes sont majoritaires. Les plasmatoctes s'auto-renouvellent, prolifèrent et donnent naissance à un faible pourcentage de plasmatoctes activés. (B) Hématopoïèse « adaptée » à la demande. Après infestation, les hémocytes de la lignée plasmatoctaire prolifèrent fortement et se transdifférencient en lamellocytes de type II sur l'œuf de guêpe. L'infestation induit la lignée des lamellocytes. Les pro-hémocytes putatifs qui résident dans les bandes hémocytaires sessiles, donnent des pro-lamellocytes qui se divisent fortement. Ces cellules se développent en lamellocytes de type I via un pré-lamellocyte intermédiaire. Tous les types de cellules sont capables de se diviser à l'exception des lamellocytes de type I [46].

### *Le rôle des plasmatoctes*

L'œuf de parasitoïde est entouré par un chorion plissé qui se « déploie » en partie lors du contact avec l'hémolymphe laissant un espace entre lui et la membrane de l'œuf. Les plasmatoctes sont les premiers hémocytes recrutés sur la surface du chorion qui entoure l'œuf (Figure 15) [209]. Les mécanismes de reconnaissance du chorion (non « soi ») par les plasmatoctes ne sont pas connus (Cf. Information supplémentaires 2), cependant deux pattern recognition receptors PRRs pourraient être impliqués dans cette étape : TepI et la Lectine 24A. Ces deux protéines sont surexprimées lors d'une infection quelle que soit l'espèce de parasitoïde [204].

Les premiers hémocytes qui reconnaissent le chorion et s'y attachent se lysent à son contact libérant des facteurs attractants pour d'autres plasmatoctes [209]. Le premier événement visible dans la formation de la capsule est le dépôt d'une couche dense de matériel de nature inconnue sur le chorion de l'œuf six heures après l'infection. Cette couche pourrait être constituée de matrice extracellulaire déposée par les premiers plasmatoctes. En effet, chez les larves de drosophile mutantes sans Laminin A, un composant essentiel de la matrice extracellulaire, les plasmatoctes ne sont pas capables d'adhérer aux œufs et il n'y a pas d'encapsulation [219]. Les plasmatoctes suivants s'étalent à la surface de cette couche en émettant des filipodia qui entrent en contact, les cellules formant des jonctions serrées entre elles pour entourer complètement l'œuf (Figure 15) [220]. La migration, l'étalement et la formation des jonctions serrées entre les plasmatoctes font

intervenir la RhoGTPase Rac2 [111] et certainement aussi une protéine facteur d'échange de nucléotides de Rho (RhoGEF) Zizimin-related (Zir) qui interagit avec Rac2 et CDC42 et dont le KO produit un phénotype très semblable au mutant Rac2 [221]. Chez les mutants Rac2, les plasmatoctes et les lamellocytes reconnaissent et se fixent à l'œuf mais ne parviennent pas à s'étaler à sa surface pour former une capsule complète due à l'incapacité de créer les jonctions serrées. La capsule ne mélanise pas. Le gène *rasberry* qui code pour l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), qui catalyse l'étape limitante de la synthèse *de novo* des nucléotides de la guanine et régule ainsi le pool GTP est aussi important pour le rôle des plasmatoctes en particulier la formation de filopodia. Son inactivation conduit à des défauts d'encapsulation certainement en agissant sur les voie des petites GTPases [222].

#### Informations supplémentaires 2

Chez la drosophile, les plasmatoctes semblent être les seules cellules responsables de la phagocytose (pour revues [144,223,224]). La phagocytose est un mécanisme endocyttaire à base d'actine qui internalise des particules mesurant généralement >0,5 µm, dans des vésicules non enrobées (phagosomes) par des mécanismes qui nécessitent une polymérisation de l'actine. La phagocytose implique une réorganisation membranaire, un remodelage du cytosquelette et le trafic de vésicules intracellulaires. Après l'internalisation, le phagosome fusionne avec les endosomes précoces et les endosomes tardifs entraînant son acidification. Les phagosomes fusionnent finalement avec le lysosome pour former un phagolysosome où se déroule la dégradation de la cargaison par un processus enzymatique digestif. L'initiation de la phagocytose peut être soit directe, via des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire, soit indirecte, via des opsonines qui marquent la surface de la particule afin qu'elle puisse être détectée par les récepteurs phagocytaires.

Au cours du développement, les plasmatoctes éliminent en nombre les cellules mourantes, qui sont reconnues par les récepteurs Croquemort, un homologue du récepteur vertébré CD36, Draper l'homologue de CED-1, et NimC4 / Simu. Croquemort et l'intégrine hétéro-dimérique βv/αPS3 reconnaissent les épitopes « eat me » tels que la phosphatidylsérine (PS) et pretaporter exposée sur les cibles apoptotiques. Chez l'embryon, les hémocytes sont capables de phagocyter les bactéries vivantes mais le ou les récepteurs impliqués sont encore inconnus. Aux stades larvaire et adulte, la reconnaissance et l'internalisation rapide des microbes dépendent des récepteurs de surface cellulaire de la famille Nimrod, Eater et NimC1, qui reconnaissent à la fois les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. Des études *in vitro* avec des cellules S2 dérivées de lignées hémocytaires ont permis d'identifier d'autres récepteurs impliqués comme ceux de la famille Peste (*Pes* ; CD36 family), dSR-C1 (Scavenger receptor class C, type I) et la protéine de reconnaissance des peptidoglycanes LC (PGRP-LC), qui est le seul récepteur de phagocytose identifié à ce jour à activer la voie imd et induire la production d'AMPs. Dscam, un récepteur de la superfamille des immunoglobulines qui peut présenter plus de 18000 isoformes différents par épissage alternatif, intervient comme récepteur soluble (opsonisation) pour l'élimination de bactéries par phagocytose. L'activation des macrophages induit la production de la cytokine Unpaired 3 (Upd3), qui active la signalisation JAK / STAT dans le corps gras.

#### Le rôle des Lamellocytes

Les lamellocytes sont de larges cellules aplaties qui viennent s'étaler pour former une surcouche sur les plasmatoctes et continuent de s'empiler pour former plusieurs couches successives. Les facteurs qui attirent les lamellocytes vers l'œuf ne sont pas déterminés mais pourraient provenir des plasmatoctes. Les liaisons entre les lamellocytes et la couche de plasmatoctes et entre lamellocytes font appel à la création de jonction serrées (Figure 15). Jusqu'à présent, les gènes ou les protéines rapportés pour jouer un rôle dans le processus d'encapsulation par les lamellocytes sont principalement impliqués dans l'interaction cellule-cellule, comme les intégrines αPS4 et βPS

(ou Myosphéroïde (Mys)), et dans le remodelage du cytosquelette cellulaire lié à la motilité et la migration, comme des RhoGTPases et leur facteurs de contrôles (Tableau I) [40,219]. Chez les mutants myosphéroïde, les lamellocytes se forment toujours mais ne parviennent pas à se fixer sur l'œuf. Chez les mutants Rac1, Mys n'est pas adressé correctement à la surface des lamellocytes après parasitisme, mais cette mauvaise localisation peut être secourue par l'hyperthermie et elle implique la protéine chaperonne Hsp83. Rac1 et Hsp83 semblent donc nécessaires pour la localisation correcte de Mys après parasitisme [113].

**Tableau I: Gènes de *D. melanogaster* dont la mutation entraîne des défauts dans l'encapsulation du parasitoïde *L. boulardi*.**

TE : Taux d'encapsulation (%) ; PI : Plasmatoctes ; L : Lamellocytes. Modifié d'après [219,225].

Gène	Ontologie	Homologue humain	TE	Hémocytes dans la capsule		Nombre d'hémocytes
				PI	L	
<i>LanA</i>	Matrice extracellulaire	LAMAS	0	non	non	Normal
<i>betalnt-nu</i>	$\beta$ -Intégrine	TGB5	0	non	non	Normal
<i>Ephrin</i>	Ligand, récepteur	EFNB1	0	oui	partiel	Normal
<i>Eph</i>	Récepteur tyrosine kinase	EPHB1	0	oui	partiel	Réduit
<i>Rac1</i>	Rho GTPase	RAC3	10	oui	partiel	Normal
<i>Rac2</i>	Rho GTPase	RAC1	1	oui	partiel	Normal
<i>Cdc42</i>	Rho GTPase	CDC42	0	oui	oui	Normal
<i>Rho-Like</i>	Rho GTPase	-	11	oui	partiel	Normal
<i>RhoBTB</i>	Rho GTPase	HOBTB2	39	non	non	-
<i>CG11376</i>	RhoGEF	DOCK7	10	oui	partiel	Normal
<i>Exn</i>	RhoGEF	NGEF	0	oui	partiel	Réduit
<i>RhoGEF3</i>	RhoGEF	ARHGEF4	13	oui	partiel	Normal
<i>vav</i>	RhoGEF	FLJ41603	0	oui	partiel	Normal
<i>CG7158</i>	Alsin RabGEF	ALS2	68	oui	partiel	Normal
<i>dia</i>	Formin	DIAPH2	0	non	non	Normal
<i>Eb1</i>	Assemblage des microtubules	MAPRE3	6	non	non	Normal
<i>Shc</i>	Protéine d'échafaudage	SHC3	11	oui	partiel	Normal
<i>Flotillin2</i>	Protéine d'échafaudage	FLOT2	0	non	non	Normal
<i>Pten</i>	Phosphatase	PTEN	15	oui	partiel	Normal
<i>aPKC</i>	S/T kinase	PRKCI	23	oui	partiel	Normal
<i>Cdk5</i>	S/T kinase	CDK5	0	oui	partiel	Normal
<i>Cdk5a</i>	Activateur de CDK5	CDKSR1	0	oui	partiel	Normal
<i>CG42247</i>	Assemblage des microtubules	EML1	35	oui	partiel	Normal
<i>Dhc64C</i>	Chaîne lourde de la Dynéine	DYNC1H1	0	oui	partiel	Normal
<i>Glued</i>	Assemblage de la Dynéine	DCTN1	10	oui	partiel	Normal
<i>poly<sup>9</sup></i>	-	-	0	non	non	Augmenté (L)

Les lamellocytes portent à leur surface une protéine à ancre GPI de la famille Ly6, L1/Atilla, dont le rôle n'est pas établi dans l'encapsulation [226]. Cette protéine sert de marqueur des lamellocytes. Les membres de la famille Ly6 de drosophile ressemblent à CD59, un membre de la famille de protéine LY6/uPAR/alpha-neurotoxine chez les vertébrés. CD59 protège les cellules en empêchant le complexe d'attaque de membrane du complément de se former, il participe aussi à l'endocytose cellulaire [227,228]. Bien que la physiologie de la plupart des protéines Ly6 ne soit pas bien comprise chez les vertébrés, un rôle dans les fonctions des neutrophiles, telles que la migration, est de plus en plus reconnu [227]. Chez la drosophile, les protéines Ly6 participent à la formation de jonction serrées au niveau des barrières épithéliales [229–232]. Les lamellocytes

participent activement à la mélanisation de la capsule en raison de la production d'une prophénoloxydase (PPO3 ; DOXA3) [233,234].

#### *Le rôle des cellules à cristaux.*

Elles sont essentielles dans les processus de mélanisation, de réparation, de coagulation de l'hémolymphe et contre les infections [233]. La mélanisation est diminuée chez le mutant *domino* dépourvu d'hémocytes [235] et chez les mutants avec des cellules cristallines aberrantes, ainsi que chez le mutant *Lozeng* (*Lz*), dépourvu de cellules cristallines [236,237].

Ces cellules contiennent dans leur cytoplasme deux formes de prophénoloxydases (PPO1 et PPO2), PPO2 semblant la forme principale stockée dans les cristaux (Figures 4 et 5) [233,238]. En absence de cellules à cristaux ou chez le double mutant PPO1/PPO2 la mélanisation de la capsule n'est pas complète permettant un échappement de l'œuf de parasitoïde à la mort [233].

L'utilisation de mutants montrent aussi que la rupture rapide des cellules à cristaux lors de la cicatrisation implique la JNK Bsk, la kinase dJNK Hep, les petites GTPases et l'homologue du TNF Eiger [239]. Il est possible que cela soit le cas aussi lors de l'encapsulation.

#### *La mélanisation*

La mélanisation recouvre l'ensemble des réactions enzymatiques et spontanées complexes qui conduisent à la formation de différents types de composés en fonction des conditions : l'eumélanine (brun-noir) qui est un copolymère fortement hétérogène consistant d'unités de DHI (DiHydroIndole) et de DHICA (DiHydroxyIndole Carboxylic Acid.) sous forme réduite ou oxydée et la pheomélanine (jaune-roux) qui est principalement composée de dérivés benzothiazine contenant du soufre (Figure 17) [45,240].

La phénoloxydase catalyse la première chaîne de réaction en formant à partir de la tyrosine des groupes indoliques qui sont ensuite polymérisés en mélanine. Les réactions enzymatiques et spontanées produisent à leur tour un ensemble de produits intermédiaires tels que quinones, diphénols, superoxyde, peroxyde d'hydrogène et intermédiaires réactifs de l'azote, qui sont essentiels pour l'élimination des agresseurs [241]. L'enzyme dopachrome decarboxylase joue aussi un rôle important dans cette réaction [242].

Le génome de la drosophile code pour trois PPOs : PPO1 et PPO2 sont produites dans les cellules à cristaux, bien que PPO1 puisse circuler dans l'hémolymphe [152], et PPO3 est spécifiquement exprimée dans les lamellocytes et n'apparaît donc qu'en condition de parasitisme [233]. L'activité

des phénoloxydases est normalement très contrôlée, elles sont sous forme de zymogènes (prophénoloxydases inactives) qui nécessitent une cascade complexe d'activation. PPO3 semble capable d'autoactivation alors que PPO1 et PPO2 nécessitent un clivage protéolytique pour être activées [243]. Le clivage de PPO1 est médié par une sérine protéase à domaine clip appelée Hayan [244]. Hayan existe également sous la forme d'un zymogène inactif qui est lui-même stimulé par un processus par étapes impliquant d'autres sérine-protéases, dont les activités sont toutes contrôlées par des inhibiteurs de protéase de type Serpines (serine protease inhibitor). Deux sérine-protéases, MP1 et Sp7 (également appelé MP2/PAE), et plusieurs serpines comme la Serpin27 [245] présentes dans les cellules à cristaux, ont été impliquées dans la cascade de mélanisation en amont de Hayan. L'inactivation de MP1 ou MP2 réduit le niveau d'activité PO, alors qu'une mélanisation excessive est habituellement observée chez les mutants déficients en Serpine. Ces cascades sont donc étroitement régulées pour limiter la réaction au site de la lésion et empêcher une mélanisation systémique [246,247]. Les deux sérine-protéases MP1 et MP2 activeraient la cascade en réponse aux attaques microbiennes et fongiques [248]. Cette activation de la mélanisation par les pathogènes peut être attribuée à PGLP-LC et PGRP-LE exprimées à la fois par les hémocytes et le corps gras [249].

L'activité phénoloxydase est une des activités enzymatiques la plus étudiée chez les insectes car elle est utilisée dans différents domaines de l'immunologie fondamentale et appliquée. Des études d'écologie évolutive indiquent que la PO est un trait dont la production et la maintenance ont des coûts en termes de fitness pour les hôtes. Notre connaissance des facteurs impliqués dans la régulation de la cascade PPO reste encore limitée chez la drosophile, la caractérisation biochimique des complexes sérine-protéases/serpines impliqués dans la mélanisation ayant été essentiellement réalisée chez le lépidoptère *Manduca sexta* [250].



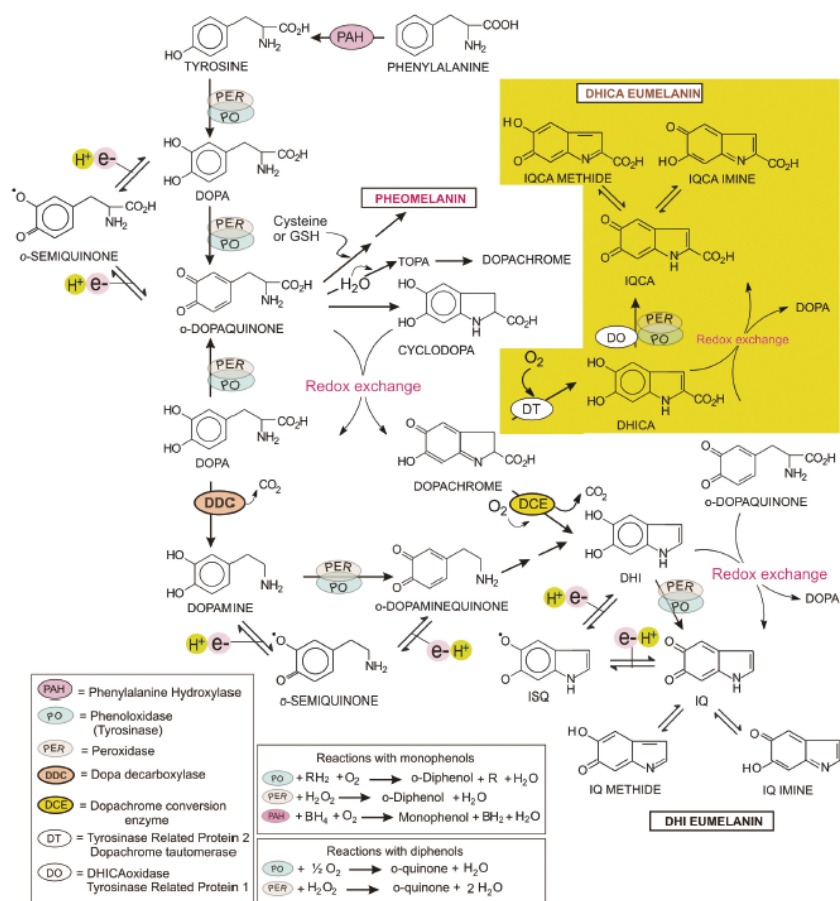


Figure 17: Schéma de la mélanogénèse.

Deux principaux types de pigments sont produits chez les animaux, les eumélanines brunes à noires et les pheomélanines de couleur jaune à brun rougeâtre, qui sont tous deux des polymères dérivés du précurseur commun de l'o-dopaquinone. Les réactions décrites par la zone en jaune, conduisant à la formation d'eumélanine par l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA), n'ont pas été décrites chez les insectes. Sémiquinones (QH), hydroquinones (QH<sub>2</sub>), quinones (Q), 5,6-dihydroxyindole (DHI), DHICA. (D'après [45]).

## L'attaque : les facteurs venimeux

Comme décrit dans l'introduction générale, les endoparasitoïdes ont mis en place différentes stratégies de virulence contre les défenses immunitaires de l'hôte. Deux stratégies sont définies : l'immunoévasion (dont le mimétisme) et l'immunosuppression. L'immunosuppression est la stratégie de virulence employée par de nombreux parasitoïdes dont les Leptopilina, elle implique l'action de substances actives (facteurs de virulence) introduites dans le corps de l'hôte au moment de l'oviposition mais peuvent aussi être produites par la larve ou provenir de cellules issues de la dissociation de la séreuse embryonnaire lors de l'éclosion de l'œuf (tératocytes).

Les facteurs injectés lors de l'oviposition peuvent être: i) des protéines sécrétées produites dans l'ovaire ou dans les glandes à venin, ii) des vésicules/particules dérivées de virus, comme les PDVs

(polydisperse DNA virus) ou certaines VLPs (Virus Like Particles) produites dans le calice ovarien ou iii) des vésicules d'allure plus ou moins virale dépourvues d'ADN produites dans les glandes à venin associées au système reproducteur aussi appelées VLPs [94,99,134]. Parmi les protéines identifiées dans le venin de parasitoïdes, très peu ont été démontrées à ce jour comme étant des facteurs de virulence [99].

L'étude du rôle des vésicules dans le transport des facteurs de virulence étant central dans mon travail de thèse, je donnerais ici une vision plus large des différents types de vésicules fabriquées au niveau de l'appareil reproducteur des femelles parasitoïdes et jouant un rôle dans la réussite parasitaire.

### Les protéines venimeuses

Les venins des parasitoïdes peuvent contenir de nombreux types de molécules (neurotoxines, amines, protéines, etc.) potentiellement impliquées dans la manipulation de la physiologie de l'hôte. Les protéines sécrétées dans le venin sont les facteurs les plus étudiés car majoritaires. Les venins ont été analysés chez une vingtaine d'espèces appartenant à 5 familles différentes, en utilisant différentes approches [99,134,251–254]. Seule une partie de ces études combine des approches transcriptomiques des glandes à venin et de la protéomique du venin pour identifier les protéines que les guêpes injectent dans les hôtes. Parmi les protéines identifiées, plus de 60 partagent une homologie significative avec des protéines qui ont des fonctions connues (Tableau II). Cependant, aucune fonction prédite ni donnée expérimentale n'existent pour la grande majorité de ces protéines, de sorte que leurs rôles spécifiques dans le parasitisme restent largement spéculatifs. Les venins restent des « boîtes noires » fonctionnelles.

Certains de ces facteurs, y compris les sérines protéases, métalloprotéases ou estérases sont retrouvées dans beaucoup d'espèces tandis que d'autres sont présents dans un seul ou un petit nombre d'espèces (Tableau II). La plupart des études se concentrent sur les protéines très abondantes, en particulier lorsque leur fonction est prédite dans les bases de données. Pourtant, certaines enzymes, telles que les oxydoréductases, pourraient agir dans l'hôte à des concentrations très faibles, ce qui a potentiellement conduit à négliger des facteurs importants. De plus, un certain nombre de ces protéines, associées généralement aux mécanismes intracellulaires de synthèse et sécrétion, peuvent avoir d'autres fonctions en plus de contrôler le processus de sécrétion lui-même (repliement, contrôle de qualité) ; elles pourraient ainsi participer à des modifications post-sécrétoires (par protéolyse, modifications des sucres) et à la protection des composants du venin (inhibition des activités protéasiques, antioxydants, etc.). Par exemple, les chaperonnes



moléculaires, telles que l'endoplasmine, les PDI ou HSP70, pourraient stabiliser et protéger les autres protéines venimeuses une fois sécrétées. La superoxyde dismutase extracellulaire, identifiée en faible abondance [255] dans certaines espèces pourrait également protéger le venin stocké de l'oxydation.

Certaines protéines comme l'aspartylglucosaminidase et la gamma glutamyl transférase (GGT) pourrait interférer avec le métabolisme des acides aminés de l'hôte [256–258]. L'injection de l'AeGGT d'*Aphidius ervi* dans le puceron du pois réduit fortement la fertilité par dégénérescence des ovaires, peut-être par réduction du niveau antioxydant local conduisant à l'apoptose des cellules ovariennes [257,258].

**Tableau II: Synthèse des protéines de venin identifiées, ayant des fonctions biochimiques connues ou putatives.**

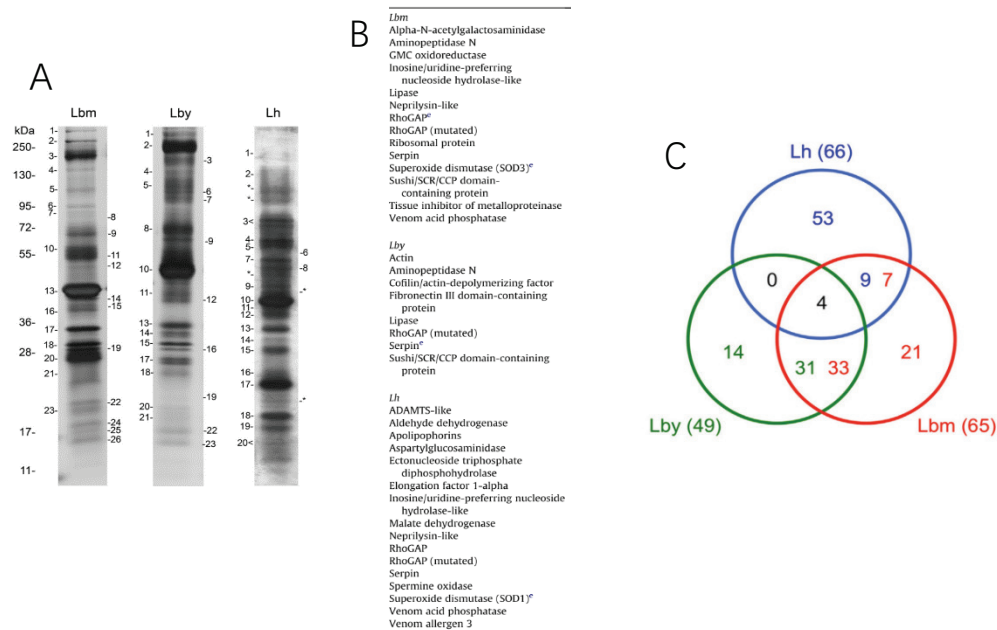
Protéines du venin démontrées ou putatives chez différentes espèces parasitoïdes. Ae, *Aphidius ervi*. At, *Asobara tabida*. Cc, *Chelonus sp. near curvimaculatus*. Ci, *Chelonus inanitus*. Cr, *Cotesia rubecula*. Ep, *Eulophus pennicornis*. G1, *Ganaspis sp. 1*. Hd, *Hyposoter didymator*. Lb, *Leptopilina boulandi*. Lh, *Leptopilina heterotoma*. Ma, *Microctonus aethiopoïdes*. Md, *Microplitis demolitor*. Mh, *Microctonus hyperodae*. Nv, *Nasonia vitripennis*. Ph, *Pimpla hypochondriaca*. Pp, *Pteromalus puparum*. Pt, *Pimpla turionellae*. (Les références de cette table peuvent être retrouvées dans l'article cité) (D'après [99]).

Venom proteins	Demonstrated effect on the host physiology	Species																
		Ae [10]	At	Cc	Ci	Cr	Ep	G1 [17]	Hd [9]	Lb [11] [12]	Lh [11] [12]	Ma	Md [16]	Mh	Nv	Ph	Pp	Pt
<b>Enzymes</b>																		
Alpha-N-acetyl glucosaminidase					+													
Alkaline phosphatase																		+
Aminotransferase-like venom protein																		+
Angiotensin-converting enzyme					+													
Apyrase																		
Arginine kinase									+		+							+
Arylsulfatase																		+
Aspartylglucosaminidase			+															
ATP synthase											+							
C1A protease																		+
Chitinase					+	+			+									
Dipeptidylpeptidase IV									+									+
Endonuclease-like venom protein																		+
Esterase/lipase									+	+			+					+
Gamma glutamyl transpeptidase	Induction of apoptosis in host ovaries (Ae) [27]	+																+
Glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase										+								+
Glycosyl hydrolase									+	+								+
Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase									+	+			+					+
Laccase																		+
Metalloprotease	Toxicity toward the host, manipulation of host development (Ep) [46]	+				+	+		+	+			+	+				+
Multiple inositol polyphosphate phosphatase-like venom protein																		+
Phenoloxidase																		+
Phospholipase B																		+
Polynucleotide kinase/phosphatase													+					
Sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase	Regulation of <i>Drosophila</i> calcium levels and inhibition of cellular immunity (G1) [17]																	+
Serine proteases and serine protease homologs	Inhibition of melanization (Cr) [23]	+				+	+		+				+					+

Venom proteins	Demonstrated effect on the host physiology	Species																
		Ae [10]	At	Cc	Ci	Cr	Ep	G1 [17]	Hd [9]	Lb [11] [12]	Lh [11] [12]	Ma	Md [16]	Mh	Nv	Ph	Pp	Pt
Spermin oxidase																		
Superoxide dismutase	In vitro inhibition of <i>Drosophila</i> phenoloxidase activity (Lb) [22]									+	+							
Trehalase																		
Tyrosine 3-tryptophan 5-monooxygenase							+			+	+						+	
Venom acid phosphatase										+	+							+
<b>Recognition/binding proteins</b>																		
Beta-1,3-glucan recognition protein																		+
Chitin binding protein					+												+	
Fibronectin domain-containing protein									+									
Lectin					+				+									
Low-density lipoprotein receptor																		+
Sushi/SCR/CCP domain-containing protein											+							
<b>Protease inhibitors</b>																		
Cysteine-rich protease inhibitor																	+	+
Kazal-type serine protease inhibitor																	+	
Serpin	Inhibition of melanization (Lb) [24]	+							+	+	+		+					
Tissue inhibitor of metalloproteinase										+								
<b>Immune related proteins</b>																		
Calreticulin	Inhibition of hemocyte spreading behavior, suppression of encapsulation (C) [47]					+			+	+	+	+		+	+	+	+	+
C1q-like venom protein									+								+	
Complement-binding protein											+							+
Immunoglobulin-like venom protein																	+	
<b>Chaperone</b>																		
Endoplasmic reticulum chaperone																		+
Heat shock protein																		+
<b>Cytoskeleton components</b>																		
Actin		+																+
Tropomyosin																		+

Venom proteins	Demonstrated effect on the host physiology	Species																
		Ae [10]	At	Cc	Ci	Cr	Ep	G1 [17]	Hd [9]	Lb [11] [12]	Lh [11] [12]	Ma	Md [16]	Mh	Nv	Ph	Pp	Pt
<b>Neurotoxin-like/Paralytic factors</b>																		
Pimplin	Host paralysis [48]																	+
Vn4.6 (similar to atracotoxins)	Inhibition of melanization (Cr) [49]					+												
<b>Others</b>																		
Chemosensory protein-like protein					+													
Cystein-rich proteins								+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Elongation factors		+								+								
General odorant binding protein					+											+		
Hexamerin																		+
Imaginal disk growth factors-like					+							+						
Insect hemocyte anti-aggregation protein	Inhibition of hemocyte spreading and aggregation, suppression of encapsulation (Ph) [50]																+	
Leucine-rich repeat domain-containing protein		+																
Plancitoxin																		
RhoGAP	Changes in host lamellocyte morphology, suppression of encapsulation (Lb) [51]									+	+		+					
Similar to lethal (1) G0193 isoforms						+												
Yellow-e3-like protein					+													

Notre équipe a effectué la comparaison du transcriptome des glandes à venin et du protéome du venin de *L. bouleardi* ISm et ISy et de *L. heterotoma* (Tableau II et Figure 18) [100]. Les résultats montrent de grandes différences dans les profils protéiques des venins au niveau du réservoir traduisant des différences quantitatives et qualitatives significatives. Entre les souches de *L. bouleardi*, 40 à 50% des protéines ne sont pas communes. Il est aussi frappant de constater que les deux espèces apparentées de Leptopilina ne partagent pas de protéines de venin abondantes. Les principales protéines identifiées chez *L. bouleardi* sont des RhoGAP et des serpinines, tandis qu'une aspartylglucosaminidase (AGA) est la protéine la plus abondante chez *L. heterotoma*.



**Figure 18: Comparaison des venins de *L. boulandi* ISm (Lbm), ISy (Lby) et *L. heterotoma* (Lh).**

A) Comparaison électrophorétique indiquant les bandes analysées en protéomique. B) Liste des protéines majeures avec une fonction connue identifiées dans les venins. C) Diagramme de Venn sur l'ensemble des séquences identifiées par protéomique montrant les grandes différences inter- et intra-spécifiques dans la composition de ces venins. Les nombres correspondant au nombre de transcrits uniques trouvés dans les trois, dans deux, ou dans une seule des banques. (D'après [100])

La forte variation quantitative observée entre ces espèces peut être liée à l'utilisation de différentes stratégies de virulence et / ou à des différences dans leur gamme d'hôtes (spécialistes versus généralistes). Ces données suggèrent aussi que le venin des parasitoïdes peut évoluer rapidement, principalement à travers des changements dans la régulation de l'expression génique.

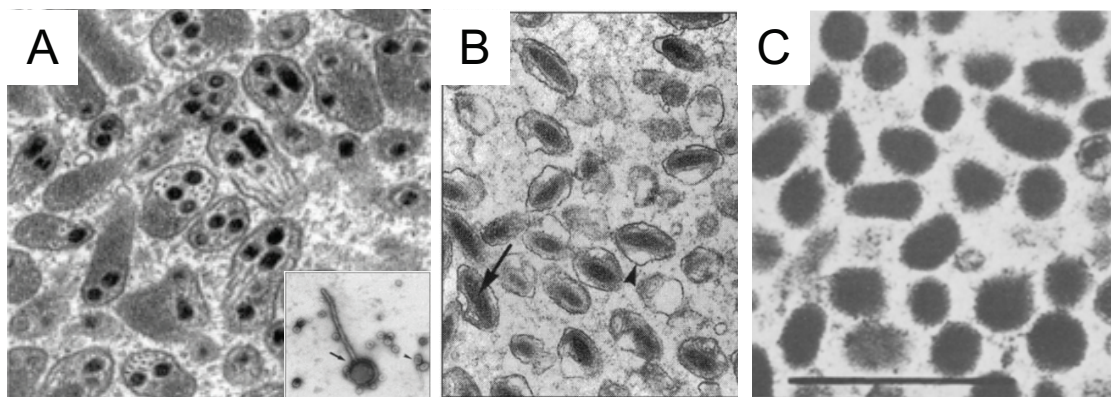
Les vésicules/particules provenant de l'ovaire des parasitoïdes (PDVs, VLPs)

*Les PDVs.*

L'étude des PDVs a commencé dans les années 1960 quand des particules semblables à des virus ont été observées par microscopie électronique (EM) dans les organes reproducteurs de braconidés et d'ichneumonidés parasitoïdes de lépidoptères (pour revue voir [97,259–261]). Ces particules sont morphologiquement différentes, celles des braconidés étant des nucléocapsides cylindriques entourées d'une seule enveloppe ressemblant à des baculovirus libres (non-occlus) et celles des ichneumonidés étant fusiformes avec deux enveloppes (Figure 19). Malgré leur morphologie dissemblable, les premières études ont montré qu'elles partagent plusieurs caractéristiques, y

compris un « cycle de vie » commun. Les deux types de particules sont observées seulement aux stades pupal et adulte des guêpes femelles par une accumulation de matériel dans les noyaux de cellules du calice. Un grand nombre de vésicules membranées se forment et sont libérés par la lyse des cellules du calice dans le cas des braconides ou par bourgeonnement dans le cas des ichneumonides [262]. Les « virions » sont ensuite stockés à haute densité dans la lumière de l'oviducte [263,264]. L'analyse des acides nucléiques des particules purifiées a montré qu'elles contiennent de multiples ADN circulaires double brin et que le nombre et la taille des segments d'ADN variaient entre les espèces. Aucun des gènes portés par ces cercles ne présente d'homologie avec des gènes viraux connus et n'a de fonctions prédites dans la réplication de l'ADN viral, la transcription ou la formation de virions. Au lieu de cela, la plupart des gènes sont soit des gènes orphelins, soit ont des homologies avec des gènes provenant d'insectes ou d'autres eucaryotes. Les approches « omiques » ont ensuite identifié que de nombreux transcrits spécifiquement exprimés dans les cellules du calice présentent un fort pourcentage d'identité avec des gènes de virus à ADN qui infectent les insectes. Ces gènes de type viral qui sont surexprimés dans les cellules du calice au début de la formation des particules comprennent le gène codant l'ARN polymérase suivie par l'expression de gènes structuraux. Des protéines correspondant aux gènes de capsid et d'enveloppe de virus ont aussi été détectées dans les particules libérées. Enfin, il a été montré que les gènes viraux sont intégrés de façon dispersée dans le génome de la guêpe, formant plusieurs clusters dans le génome allant de quelques à quelques dizaines de kilobases [265]. Ces segments d'ADN sont transmis verticalement à la génération suivante comme les gènes de la guêpe mais ne se retrouvent pas dans les cercles d'ADN portés par les particules. Tout ceci a conduit à identifier deux genres de virus intégrés de type polydnavirus (PDVs) dans les génomes de ces guêpes : les ichnovirus (IV) et les bracovirus (BV), associés respectivement aux Ichneumonidae et Braconidae, dérivant de virus ancestraux différents, les nudivirus pour les bracovirus, et un virus inconnu pour les ichnovirus [95,96,266,267]. Les particules IV et BV sont produites à partir de machines distinctes qui ont abouti à des particules virales complètement différentes et provenant d'entités virales distinctes, dans un exemple remarquable d'évolution convergente. Cela signifie que la domestication de virus s'est produite au moins deux fois pendant l'évolution des guêpes parasitoïdes, deux lignées distinctes de guêpes parasitoïdes ayant indépendamment intégré des génomes de virus différents dans leurs génomes [265,268,269]. Le cycle de vie unique et l'absence de certains attributs viraux typiques, tels que les mécanismes de réplication, dans les virions conduisent à penser que les polydnavirus sont des pro- ou pseudo-virus « asservis » par la guêpe permettant de former des vésicules de transport pour délivrer des gènes « pathogènes » dans leurs hôtes [95,259,267,270,271].

Les PDVs injectés avec l'œuf infectent de nombreux tissus de l'hôte incluant des tissus immunitaires, comme les hémocytes et le corps gras. La transcription des gènes portés par les cercles peut être détectée quelques heures après parasitisme avec des variations dans l'expression des gènes transportés [272,273]. Ces transcrits sont traduits en protéines au niveau des cellules de l'hôte qui auront différents effets physiologiques : elles désactivent de nombreuses cascades de signalisation, altérant ainsi la croissance et le métabolisme de l'hôte, induisent de l'apoptose, empêchent les hémocytes d'assurer leur fonction dans l'encapsulation de l'œuf et inhibent l'activation de la phénoloxydase [265,274]. Les mécanismes d'entrée des PDVs dans les cellules n'ont pas encore été explorés mais la présence de protéines virales dans ou sur les particules comme les Pifs (*per os infection*) laissent penser qu'elles utilisent des voies communes aux virus pour infecter les cellules d'insectes [275]. Dans certaines espèces, les protéines présentes dans le venin potentialisent l'effet des PDVs alors que dans d'autres elles ne semblent pas avoir de rôle [251,276,277].



**Figure 19: Photographies en microscopie électronique des vésicules ovariennes.**

A) Particules de Bracovirus de *Cotesia congregata*. Encart : La flèche indique une particule de type « virion » libre (mature), la tête de flèche une nucléocapside nue. B) Particules d'ichnovirus dans la lumière du calice d'*Hyposoter exiguae*. Chaque particule est constituée d'une nucléocapside ovale (flèche) entourée par une enveloppe membranaire (tête de flèche). C) VLP dans le fluide du calice chez *Venturia canescens*. La taille des particules varie de 100 à 200 nm. (D'après [270,278,279]).

#### *Les VLPs ovariens.*

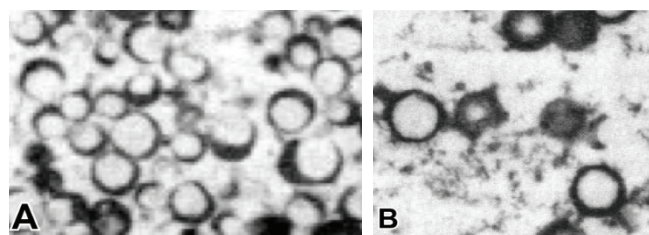
Chez une espèce du groupe des guêpes porteuses d'ichnovirus, *Venturia canescens*, la nature des "particules pseudo-virales" provenant du calice de l'ovaire est restée mystérieuse jusqu'à ces dernières années. Ces particules ne ressemblent pas aux particules de virus connus (Figure 19) et contrairement aux polydnavirus, qui véhiculent des gènes de virulence, elles sont dépourvues d'ADN [279,280] et renferment principalement des protéines de virulence provenant de la guêpe [281]. Ces particules ont été nommées génériquement virus-like particles, VLPs. Les VLPs

présentes dans la lumière de l'ovaire de *Venturia* s'associent à la surface du chorion [282] et protègent l'œuf de parasitoïde de l'encapsulation certainement par un effet local sur les cellules immunitaires bien que le mécanisme exact ne soit pas connu et qu'un effet plus général ne soit pas exclu [283,284]. Il a été montré récemment que ces VLPs sont produites par une machinerie dérivée de la domestication d'un nudivirus [98]. Cette domestication provient d'un événement indépendant de la capture d'un nudivirus à l'origine des bracovirus. Ainsi, des virus similaires ont été acquis dans différentes lignées de guêpes mais ont suivi différentes trajectoires évolutives après capture et intégration dans le génome.

### Les vésicules produites dans les glandes à venin (VLPs/vénosomes)

Alors que de nombreuses espèces produisent des PDVs au niveau de l'ovaire, peu d'espèces ont été identifiées comme présentant des vésicules au niveau de la glande/réservoir à venin. Elles appartiennent principalement à la famille des Figitidae (*Leptopilina* et *Ganaspis*) et au genre *Meteorus* (*Braconidae*). Ces vésicules venimeuses ne semblent pas contenir d'ADN [94] mais transportent de nombreuses protéines cellulaires ou qui ont évoluées à partir de celles-ci.

Les VLPs venimeuses ont été décrites pour la première fois sous le nom de « lamellolysin » chez *L. heterotoma* [88]. Cette dénomination venait de la capacité de ces VLPs purifiées par gradient de densité à partir du réservoir à venin à induire la lyse des lamellocytes de *D. melanogaster* (cf plus loin) [88,91,104,105]. Ces particules d'un diamètre d'environ 200 à 300 nm apparaissent comme des vésicules vides entourées d'une membrane d'épaisseur variable due à un dépôt asymétrique (en forme de croissant) d'un matériau dense aux électrons (Figure 20). La membrane adhère étroitement à ce matériau et certaines des particules présentent de longues extensions (ou spikes) se terminant en forme évasée.



**Figure 20: Vésicules de *L. heterotoma*.**

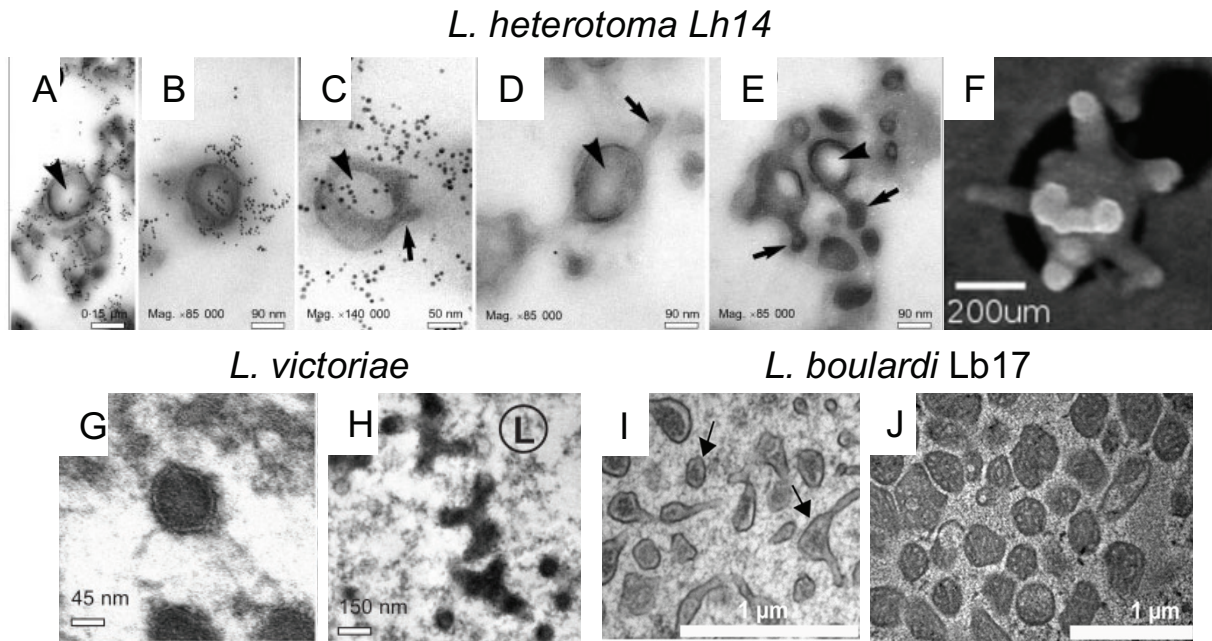
Observation en microscopie électronique des vésicules obtenues après purification sur gradient de densité (A) et présentes dans le réservoir de la glande à venin (B). (D'après [104]).

La biogenèse des VLPs a été décrite dans l'appareil à venin de *L. heterotoma*, de *L. victoriae* et *L. bouvardi* LB17 [285–287]. Bien que des différences existent dans la biogénèse des vésicules entre ces espèces, elle suit un schéma assez similaire.

Chez *L. heterotoma*, différents stades de maturation des vésicules dans les canaux des cellules sécrétrices et le long de la glande à venin ont été décrits suggérant un assemblage des VLPs à partir de précurseurs (VLPps). La première classe de VLPps s'observe dans les canaux intracellulaires spécialisés présents dans les cellules des glandes (cf. plus loin) [287]. Ils sont sphériques, d'un diamètre d'environ 90 nm, et contiennent un matériau dense aux électrons ressemblant aux particules décrites (Figure 20-21). La deuxième classe de VLPps peut provenir de l'assemblage de plusieurs particules du premier type (jusqu'à cinq) reliées entre elles par des connexions de 90 nm de long. Les autres classes ont des structures plus complexes et sont de plus grande taille, peut-être parce qu'elles proviennent de la confluence des VLPps précédentes. Ces particules ont des formes allant de multilobées à des particules polyédrales hérissées de « spikes » sur leurs angles, avec des dimensions de plusieurs centaines de nm. Certaines vésicules vides de même forme et de même taille peuvent également être observées dans la lumière de la glande. Toutes ces vésicules sont entourées d'une membrane et sont noyées dans une couche floue de matériau moins dense. Ces VLPs regroupées ou fusionnées sont également présentes dans le réservoir (Figure 21).

Cet assemblage à partir de précurseurs est retrouvé chez *L. victoriae* bien que les vésicules observées au niveau de la glande semblent mieux structurées avec une membrane visible. La morphologie de la vésicule finale au niveau du réservoir semble très différente entre *L. heterotoma/L. victoriae* et *L. bouvardi* Lb17 (Figure 21). On notera cependant la ressemblance entre les vésicules de *L. bouvardi* Lb17 et G431 (cf. Figure 22).



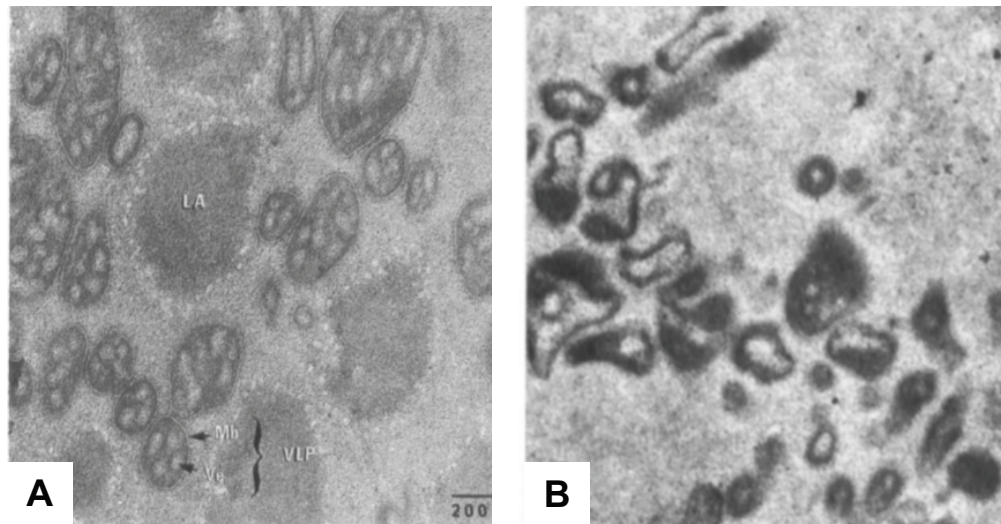


**Figure 21: Assemblage des VLPs chez *L. heterotoma*, *L. victoriae*, *L. boulandi* Lb17.**

A-F) Photographies en microscopie électronique montrant les différentes étapes de maturation des VLPs de *L. heterotoma* le long du canal de la cellule et de la glande à venin. Les premières particules rondes (A, B) commencent à montrer des extensions (D, flèches) et s'assemblent pour former de plus grandes particules (E). Le matériel semble s'accumuler à la périphérie de la particule, le centre restant vide (tête de flèche). F) vue d'une VLP de *L. heterotoma* en microscopie à balayage montrant la forme étoilée de ces particules, plusieurs extensions partant de la vésicule centrale et se terminant en bouton. G-H) *L. victoriae* : particules observées au niveau de la glande (G) et au niveau du réservoir (H). I-J) *L. boulandi* Lb17 : au niveau de la glande on peut voir des vésicules membranées contenant une matrice homogène (I) alors qu'au niveau du réservoir, les vésicules sont remplies d'un matériel plus dense qui renferme des ponctuations plus claires (J).

Chez *L. boulandi*, les vénosomes ont été décrits seulement au niveau du réservoir des souches de type ISm et ISy. Chez *L. boulandi* ISm, les coupes en microscopie électronique au niveau du réservoir montrent qu'il est rempli de vésicules mesurant entre 100-200 nm, possédant une membrane et contenant un matériel dense aux électrons renfermant des zones lacunaires ou nanovésicules (Figure 22) [94,106,288]. Elles sont accompagnées de ce qui semble être des agrégats de plus grande taille (>400nm) formés de matériel peu dense aux électrons. Chez la souche ISy, des vésicules sont aussi présentes mais en nettement moins grand nombre. Elles semblent beaucoup moins homogènes, de forme allongée mais pas très structurées et contiennent un large espace vide et du matériel dense aux électrons en périphérie accolé à la membrane. Les grands agrégats semblent absents ou moins nombreux.





**Figure 22: Vésicules de *L. boulardi*.**

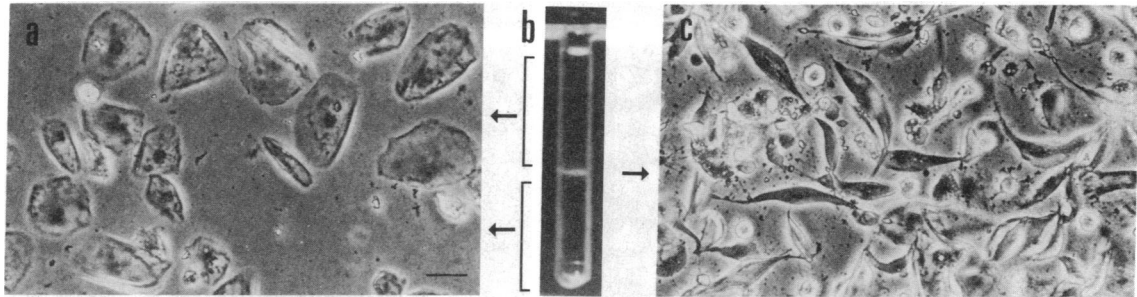
Photographies de coupes en microscopie électronique au niveau du réservoir à venin A) chez *L. boulardi* ISm (souche G431) montrant de grands agrégats (LA) et des vésicules entourées d'une membrane (Mb) et contenant un matériel dense aux électrons ponctuées de lacunes claires (Ve) et B) *L. boulardi* ISy (souche G486) montrant des vésicules allongées peu structurées. (D'après [288])

## Les facteurs de virulence des Leptopilina

*Les VLPs de L. heterotoma et L. victoriae.*

Les VLPs de *L. heterotoma* sont le principal facteur agissant contre les lamellocytes [91,92,104,105,289]. Ces auteurs ont montré que les VLPs isolées par gradient de densité induisent *in vitro* un changement de forme des lamellocytes qui passent en quelques heures d'une forme discoïdale aplatie à fusiforme avec des extrémités très allongées semblable à ce qui est observé après une infestation ou avec le venin total (Figure 23), ce changement de forme pouvant être suivi d'une lyse cellulaire. Les observations en microscopie électronique suggèrent que les VLPs entrent dans les lamellocytes. Les pointes (spikes) des VLPs (Figure 21) semblent d'abord faire contact avec la membrane lamellocytaire, les VLPs pénètrent ensuite dans la cellule par un mécanisme encore inconnu, puis semblent se retrouver libres dans le cytoplasme. Des VLPs peuvent également être trouvées dans les plasmatoctes, probablement parce que ce sont des cellules phagocytaires [104]. Les études suivantes ont montré aussi que l'infestation par *L. heterotoma* induit *in vivo* une destruction (lyse) des lamellocytes [104,105,289] et l'élimination spécifique des précurseurs hématopoïétiques au niveau de la glande lymphatique par apoptose [92]. De plus, il semblerait que les plasmatoctes mis au contact du venin montrent une apoptose.

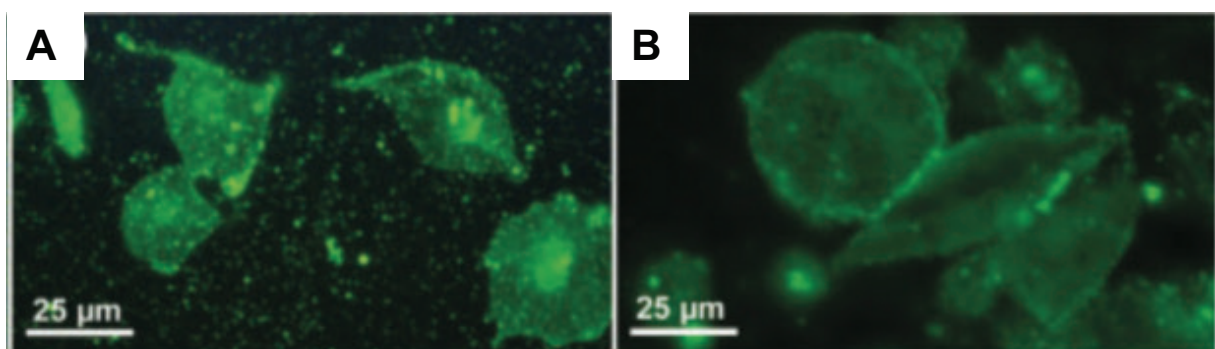
Bien que *L. heterotoma* et *L. victoriae* produisent des VLP similaires (Figure 21), le venin de ces espèces diffère par son effet contre les lamellocytes de l'hôte, le venin de *L. heterotoma* étant plus efficace à la fois *in vivo* et *in vitro* [92,108].



**Figure 23: Effet des VLPs de *L. heterotoma* sur les lamellocytes.**

A) Des lamellocytes de forme normale ne sont pas affectés par les fractions situées au-dessus ou au-dessous de la bande réfringente contenant les VLPs dans le gradient de densité (B). C) après avoir été exposés à la fraction contenant les VLPs, les lamellocytes s'allongent et deviennent bipolaires et un certain nombre d'entre eux se lysent. (D'après [104])

Chez *L. heterotoma*, quatre bandes protéiques majeures ont observées à partir de préparations de VLPs sur SDS-PAGE (à 87,5, 75, 72,5 et 40 kDa) alors qu'au moins huit bandes ont été observées pour *L. victoriae* [108]. La protéine de 40 kDa chez *L. heteroma* et une de 47,5 kDa chez *L. victoriae* sont des protéines apparentées ou portant un même épitope reconnu par un anticorps produit contre les VLPs de *L. heterotoma* et qui reconnaît principalement la protéine P40. Avec cet anticorps, la protéine de 40 kDa a été immunolocalisée sur la surface et sur les extensions des VLPs chez *L. heterotoma*, ainsi que dans les lamellocytes des larves de drosophile parasitées par *L. heterotoma* et *L. victoriae* (Figure 24) [108].

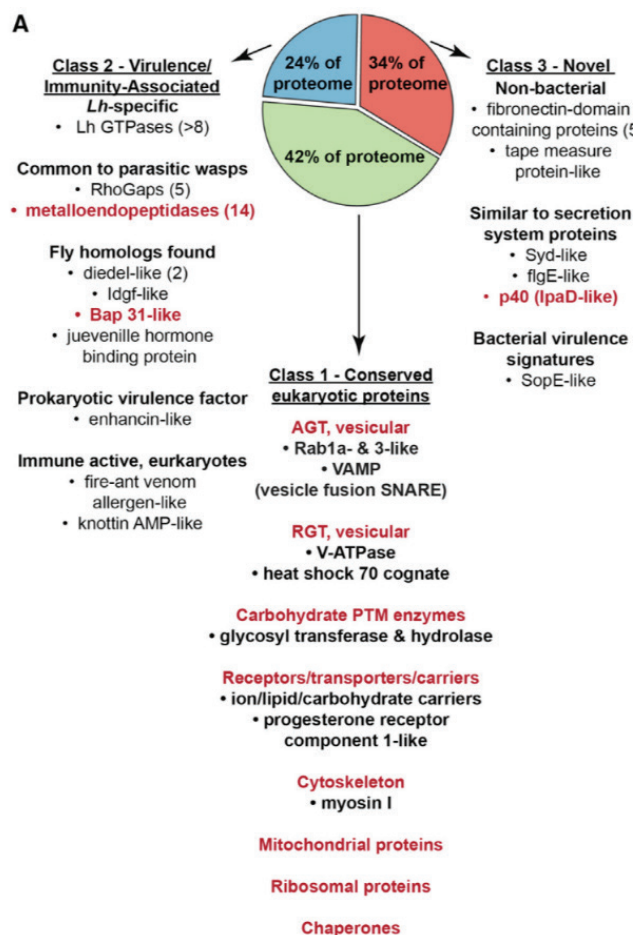


**Figure 24: Immunolocalisation de la protéine P40/P47.5 dans les lamellocytes.**

Détection des protéines p40 et p47.5 par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps anti-p40 dans les lamellocytes de *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> après infestation par A) *L. heterotoma* et B) *L. victoriae*. (D'après [108])

Très récemment, Heavner et al., [290] ont analysé par protéomique les VLPs purifiés de *L. heterotoma* Lh14. Ils n'ont trouvé aucune protéine virale dans ces vésicules mais principalement des protéines cellulaires dont certaines reliées aux voies de sécrétions des vésicules intracellulaires (Figure 25). La protéine P40 présente une faible homologie avec un motif bactérien retrouvé sur des protéines servant à reconnaître les cellules. Elle pourrait donc jouer ce rôle au niveau des « spikes » des VLPs.

Ces résultats sont accord avec ceux de transcriptomique de la glande à venin et de protéomique du venin [100,101] qui montrent l'absence de transcrits et de protéines d'origine virale, ainsi que des travaux préliminaires de protéomique effectués par l'équipe sur les VLPs de *L. heterotoma* qui n'ont identifié que des protéines cellulaires parmi les protéines majeures des VLPs. Ceci conforte aussi l'idée que la dénomination Virus-Like-Particles n'est, dans l'état actuel, pas appropriée pour ce type de vésicules.



**Figure 25: Protéomique des VLPs de *L. heterotoma*.**

Les protéines de VLPs sont présentées par leur classe de fonction (1-3). Des exemples de sous-classes et de protéines individuelles trouvées enrichies sont indiqués en rouge. AGT, transport antérograde ; RGT, transport rétrograde.

*L'Aspartylglucosaminidase (AGA) de L. heterotoma.*

*L. heterotoma* fait partie des parasitoïdes qui produisent une paralysie transitoire de la larve au moment de l'oviposition [291]. Un autre parasitoïde de larve de drosophiles, *Asobara tabida*, produit un effet similaire [292,293]. Ces deux parasitoïdes ont une protéine majeure en commun dans leur venin, l'Aspartylglucosaminidase (AGA) qui représente 16% des protéines du venin de *L. heterotoma* et 27% de celles d'*A. tabida*. L'AGA est normalement une amidohydrolase lysosomale qui catalyse la dernière étape de la dégradation des protéines glycosylées, à savoir le clivage de la liaison glycosidique entre la chaîne glucidique et la chaîne latérale de la L-asparagine [294]. Sa présence dans le venin suggère des modifications évolutives de l'AGA venimeuse entraînant sa sécrétion chez ces espèces parasitoïdes. Ces AGA venimeuses, comme les AGA cellulaires, peuvent également agir comme asparaginases en hydrolysant la L-asparagine en acide L-aspartique et en ammoniac [256,295]. Comme l'hémolymphe de *D. melanogaster* contient 2 mM de L-asparagine [296], l'AGA peut la transformer en L-aspartate qui a un rôle excitateur similaire au glutamate, un neurotransmetteur dans certaines synapses [297]. Le L-aspartate produit pourrait agir comme une molécule de signalisation et jouer un rôle dans la paralysie transitoire des larves induite par l'oviposition d'*A. tabida* et de *L. heterotoma*. Alternativement, priver les larves de L-asparagine peut agir sur la division cellulaire et ralentir la multiplication des cellules [293,298], ce qui peut aider à protéger les larves parasitoïdes et à synchroniser le développement de l'hôte.

Le rôle potentiel de l'AGA dans une ou l'autre (ou les deux) action physiologique reste cependant à être confirmé.

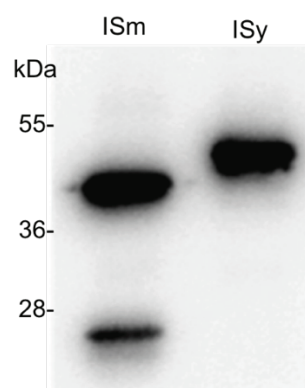
Les facteurs de virulence de *L. boulandi*.

*Les serpinés.*

Nous avons décrit précédemment la lignée ISy de *L. boulandi* comme ayant un succès parasitaire à la fois chez *D. melanogaster* et *D. yakuba* selon leur génotype résistant / sensible [82]. Le succès de ISy chez *D. yakuba* n'est pas associé à des changements dans le nombre d'hémocytes (qui est plus élevé dans cette espèce après parasitisme que chez *D. melanogaster*) ou dans la morphologie des lamellocytes [103]. Cependant, le parasitisme par les femelles ISy ou l'injection de venin de ces femelles retarde la mélanisation des corps étrangers par l'hôte, indiquant que des facteurs immunosuppresseurs sont présents dans le venin d'ISy [103].

L'équipe a montré qu'une protéine majeure du venin de *L. boucardi* ISy (G486) est un inhibiteur de sérine protéase de la superfamille des serpinines, appelé LbSPNy [102]. Le gène codant pour LbSPNy est spécifiquement surexprimé dans la glande à venin par rapport au reste du corps. La protéine recombinante inhibe l'activité PO mesurée dans l'hémolymphe de *D. yakuba* (souche 1880D) de la même façon que le venin extrait du réservoir [102]. L'analyse du site actif de cette serpine suggère qu'elle peut inhiber les sérines protéases de type trypsine, mais ni son mécanisme d'action ni la ou les cibles *in vivo* ne sont connus. Il existe plus de deux cents serpine protéases et sérine protéase homologues dans le génome de *D. melanogaster* (<http://entopl.okstate.edu/profiles/hj/table1.pdf>) et une trentaine de séquences de serpine [299]. Un certain nombre de ces protéines sont impliquées dans la cascade phenoloxydase ou dans l'immunité [300].

Il existe aussi une serpine dans le venin de la lignée ISm présentant une forte similarité de séquence avec LbSPNy [100]. Cette serpine, LbSPNm, montre des différences de propriétés biochimiques avec LbSPNy (Figure 26) ainsi que des différences en acides aminés au niveau du site actif suggérant que les deux serpinines ne cibleraient pas les mêmes serine protéases. Ces serpinines semblent être les allèles d'un même gène, indiquant une variation intraspécifique qualitative, plutôt que quantitative, pour ce gène. L'activité biochimique et le rôle possible de LbSPNm dans le parasitisme restent à déterminer car l'injection du venin ou le parasitisme par ISm n'a pas d'effet sur la mélanisation de corps étrangers chez *D. yakuba* [103] et ne semble inhiber la mélanisation de l'hémolymphe de *D. melanogaster* (résultats non publiés du laboratoire).



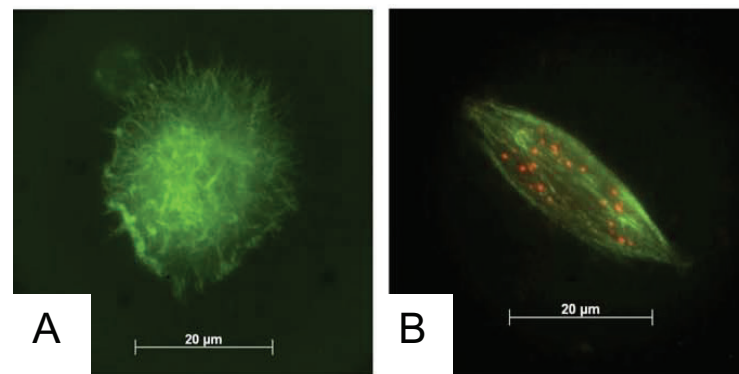
**Figure 26: Comparaison électrophorétique des serpinines LbSPNm et LbSPNy.**

Western blot de la même quantité de venin de *L. boucardi* ISm (G431) et ISy (G486) révélé par un anticorps reconnaissant les deux serpinines qui montre l'existence d'une différence de migration malgré un poids moléculaire prédit identique. Ceci suggère l'existence de modifications post-traductionnelles différentes en accord avec le nombre de sites de glycosylation potentiels plus élevé chez LbSPNy (4) que chez LbSPNm (2). Un fragment provenant de protéolyse est visible chez ISm.



### Les RhoGAPs.

La caractérisation du facteur potentiel de virulence LbGAP a été réalisée initialement à partir du contenu élué d'une bande d'un gel natif du venin de *L. bouleardi* ISm. L'injection de cet extrait diminuait significativement le taux d'encapsulation des œufs de la lignée avirulente ISy avec le même effet inhibiteur que l'injection de venin [106,109]. Cette injection reproduisait aussi les modifications de forme des lamellocytes observés lors du parasitisme [301]. La protéine majeure présente une forte homologie avec les RhoGAPs [109], le gène correspondant étant fortement exprimé (environ 2.200 fois plus) dans l'appareil à venin que dans le reste du corps [107]. LbGAP est particulièrement originale pour une RhoGAP car elle ne possède qu'un seul domaine (RhoGAP), qui représente l'essentiel de la protéine, précédé d'un signal peptide, permettant la sécrétion de la protéine dans le venin. La production d'un anticorps contre la protéine recombinante a permis l'immunolocalisation de LbGAP dans les cellules immunitaires de la drosophile et montré que les changements morphologiques dans les lamellocytes sont corrélés avec la quantité de « spots » LbGAP qu'ils contiennent (Figure 27) [110].



**Figure 27: Immunolocalisation de LbGAP dans les lamellocytes.**

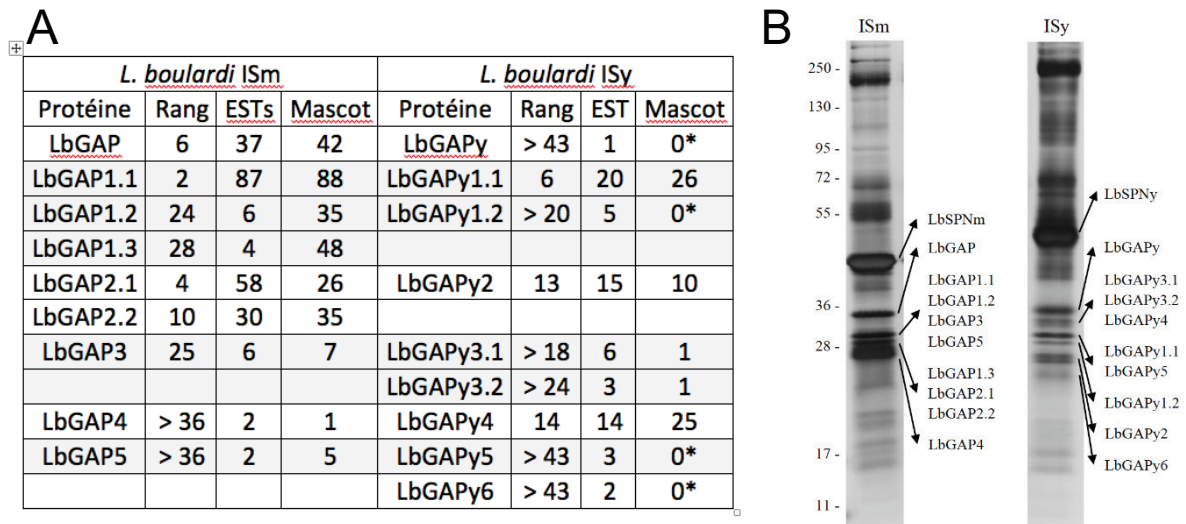
A) Lamellocyte témoin, B) Lamellocyte fusiforme après parasitisme par *L. bouleardi* ISm montrant l'accumulation de LbGAP sous forme de nombreux spots (rouge, LbGAP ; vert actine marquée à la phalloïdine). (D'après [110])

LbGAP présente une activité GAP *in vitro*, elle augmente significativement l'activité GTPase de Rac1 et Cdc42 mais pas celle de RhoA et Ras. Elle semble donc spécifique des Rac-GTPases. Des études d'expression en double-hybride chez la levure et de précipitation par anticorps ont montré qu'elle interagit physiquement avec les deux Rho GTPases Rac1 et Rac2, toutes deux nécessaires à l'encapsulation des œufs de *Leptopilina* par *D. melanogaster*. L'inactivation des RhoGTPases de l'hôte est une stratégie répandue employée par les pathogènes, certaines toxines bactériennes imitant les protéines activatrices de RhoGTPase eucaryotes pour inactiver les GTPases mammaliennes, probablement par convergence évolutive [110].

A l'aide de l'anticorps et par des approches moléculaires, l'existence d'une RhoGAP homologue exprimée dans la glande et sécrétée dans le venin de *L. boucardi* ISy (LbGAPy) a été montrée. LbGAPy a une très forte homologie de séquence (90%) avec LbGAP et présente la même structure et les mêmes propriétés de liaison aux RacGTPases que LbGAP. Cependant, la quantité d'ARNm de LbGAPy est beaucoup plus faible dans la glande à venin de ISy que celui de LbGAP chez ISm (environ 10 à 20 fois), bien qu'on observe toujours une surexpression dans la glande par rapport au reste du corps de la guêpe. De même, la protéine LbGAPy est environ 60 fois moins produite dans le venin d'ISy que LbGAP dans celui d'ISm [107]. LbGAP et LbGAPy sont les allèles d'un même gène dont la transcription est ainsi régulée à la fois de manière tissulaire et différemment entre les deux lignées virulente et avirulente, certainement par une variation de la cis-régulation [107]. LbGAPy peut également être détectée chez l'hôte mais dans un nombre beaucoup plus faible de lamellocytes et dans une quantité moindre par rapport à LbGAP, et aucun changement de forme de ces lamellocytes réactifs n'est observé.

L'étude transcriptomique des glandes à venin a confirmé que le nombre de transcrits de LbGAP était nettement plus élevé chez ISm (37 EST) que celui de LbGAPy chez ISy (seulement 1 EST) (Figure 28A) [100]. Cette étude a mis aussi en évidence que LbGAP/LbGAPy font partie d'une famille multigénique. En effet, 8 autres ARNm codant pour des protéines contenant un domaine RhoGAP ayant de 40 à 60% de similarité avec LbGAP sont présents dans chacune des banques cDNA de glandes à venin (Figure 28A). La plupart de ces RhoGAP supplémentaires sont prédites comme étant sécrétées et elles ont effectivement été identifiées dans le venin par protéomique (Figure 28B). De manière surprenante, toutes ces protéines contiennent des mutations dans le résidu clé arginine (R74) requis pour l'activité catalytique [110]. De plus, certaines présentent une ou plusieurs mutations au niveau des sites impliqués dans la liaison aux Rac GTPases [110]. Trois de ces RhoGAPs potentiellement inactives ont été identifiées comme abondantes à la fois chez ISm et ISy, bien que le nombre d'ESTs soit plus élevé pour ISm que pour ISy.

De manière intéressante, 3 unisequences codant pour des protéines apparentées contenant un domaine RhoGAP (dont l'une contient des mutations) sont présentes en faible abondance dans la banque *L. heterotoma* (1 EST chacune) et ont été détectées en protéomique.



**Figure 28: Les protéines de la famille des RhoGAPs identifiées dans les souches de *L. bouleari* ISm et ISy.**

A) RhoGAPs trouvées en transcriptomique et protéomique classées par ordre d'abondance (rang) parmi l'ensemble des séquences identifiées dans le venin. L'abondance est estimée via le nombre d'ESTs en transcriptomique (ESTs) et le nombre de fois où un peptide provenant de la protéine a été identifié en protéomique (match « Mascot »). (\*) signifie qu'aucun peptide n'a été trouvé pour la protéine correspondante dans l'analyse mais que des peptides ont été identifiés dans une analyse ultérieure effectuée par l'équipe une fois la séquence complétée (résultats non publiés). À l'exception de LbGAP et LbGAPy, les protéines RhoGAP trouvées dans le venin sont nommées en fonction de leur abondance respective (LbGAP1 rang 2 puis LbGAP2 rang 4 chez ISm par exemple). Les séquences dont l'identité est supérieure à 70% ont été regroupées (par exemple, LbGAP1.1, LbGAP1.2 et LbGAP1.3). Les cases vides montrent une absence de la séquence correspondante dans l'autre souche. B) Gel SDS-PAGE du venin de *L. bouleari* ISm et ISy indiquant les bandes dans lesquelles les RhoGAPs et la serpine sont trouvées majoritairement par protéomique. (D'après [100]).



**Partie 3 : Article 1**

**Atypical extracellular vesicles as interspecies comunicasomes involved in host specificity: the case of a parasitoid wasp of *Drosophila***

Soumis pour publication.

## Introduction

Les résultats publiés montrent que le venin de la souche ISm de *L. bouhardi* protégerait l'œuf du parasitoïde en empêchant les lamellocytes de former une capsule. L'effet le plus remarquable est le changement de forme des lamellocytes qui deviennent bipolaires bien qu'ils ne semblent pas se lyser comme c'est le cas sous l'effet du venin de *L. heterotoma*. Le venin de ISm est aussi capable de protéger les œufs de la souche ISy de l'encapsulation lorsqu'il est injecté avant le parasitisme par celle-ci. Parmi les facteurs de virulence potentiels présents dans le venin, on trouve une serpîne (LbSPm), des RhoGAPs et des vésicules transportant des protéines de la guêpe.

Nous avons vu que la serpîne LbSPNm ne semble pas être capable d'inhiber la mélanisation de la capsule comme le fait la serpîne LbSPNy chez *D. yakuba*. De plus, elle ne semble pas non plus capable d'agir sur les cellules immunitaires. LbSPNm qui est en grande quantité dans le venin a certainement un rôle important qui reste à explorer mais elle ne semble pas directement liée à l'inhibition de l'encapsulation de l'œuf d'ISm chez *D. melanogaster*.

La RhoGAP LbGAP pourrait par contre jouer ce rôle : elle est aussi présente en grande quantité dans le venin, retrouvée dans les lamellocytes fusiformes chez l'hôte, et elle interagit *in vitro* avec les RacGTPases Rac1, Rac2 qui jouent un rôle important dans la régulation du cytosquelette. Il a été montré que Rac2 notamment est nécessaire aux lamellocytes pour réussir la formation de la capsule. Enfin, la quantité internalisée de LbGAP est corrélée avec l'intensité du changement de forme des lamellocytes. La question est de comprendre comment cette protéine sécrétée peut se retrouver dans les lamellocytes de l'hôte.

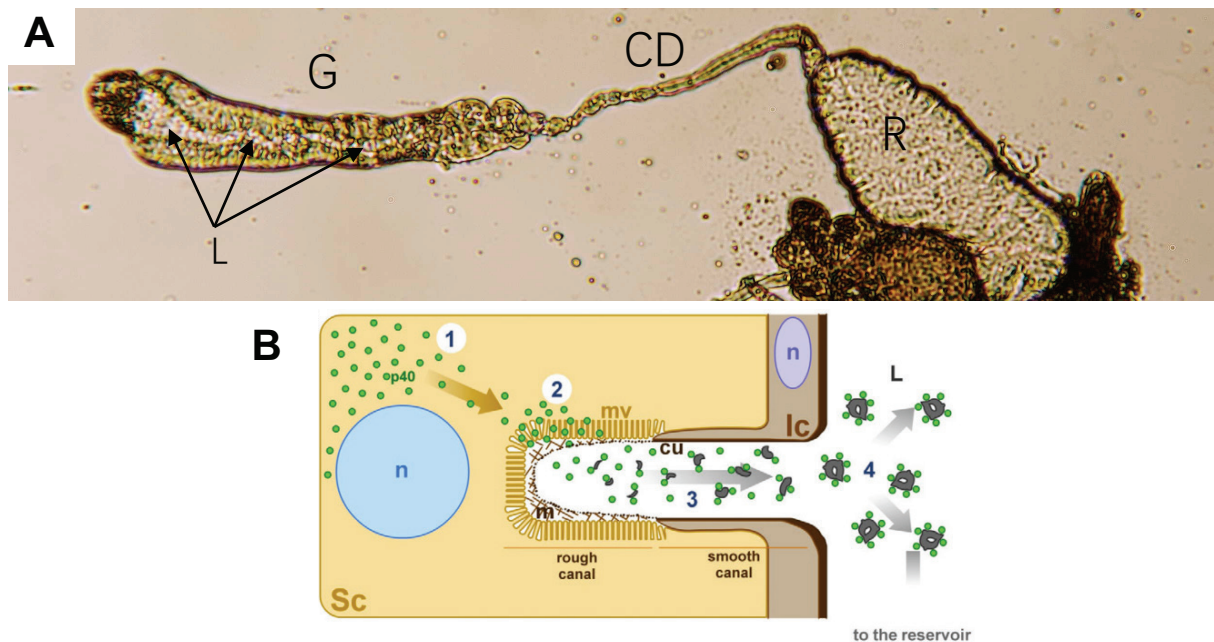
Le venin de la souche ISm contient aussi des vésicules atypiques (vénosomes) en beaucoup plus grande quantité que le venin ISy. En se basant sur les résultats obtenus chez *L. heterotoma* qui montrent que les vénosomes de cette espèce sont suffisants pour reproduire l'effet du venin sur les lamellocytes, nous avons fait l'hypothèse que les vénosomes de *L. bouhardi* ISm joueraient le même rôle et que la faible quantité de vénosomes chez ISy pourrait expliquer son échec chez *D. melanogaster* (pour rappel, sur la souche résistante de cette espèce). Cependant la faible quantité de RhoGAP active (LbGAPy) chez ISy pourrait aussi expliquer son échec à inhiber le fonctionnement des lamellocytes. Cela amène aussi à se poser la question suivante, pourquoi ISm a-t-il un succès parasitaire nul ou très faible sur *D. yakuba* qui possède des lamellocytes semblables impliqués dans l'encapsulation.

L'équipe a donc fait l'hypothèse de travail que les vénosomes de *L. bouhardi* ISm pourraient transporter la protéine LbGAP et qu'ils pourraient avoir une spécificité de ciblage pour les

lamellocytes de *D. melanogaster*. Des travaux préliminaires ont donc été entrepris qui ont montré : 1) par microscopie électronique, que l'anticorps LbGAP marque les vénosomes ISm dans la glande et le réservoir, 2) qu'après centrifugation du venin, la protéine LbGAP se retrouve dans le culot enrichi en vénosomes. Ce premier article se base sur ces résultats préliminaires.

## Présentation des résultats

Cet article commence par décrire la biogenèse des vénosomes le long de l'appareil de venin de *L. boulandi* ISm et ISy par une étude de microscopie électronique. Au niveau de la glande à venin, les cellules sécrétrices relâchent dans leur canal intracellulaire (Figure 29) un matériel amorphe, dense aux électrons mais qui ne semble pas être entouré par une membrane.



**Figure 29: Appareil à venin de *L. boulandi* et schéma d'une cellule sécrétrice de la glande à venin.**

En A) photographie de l'appareil à venin constitué de la glande impaire (G), du canal connecteur (CD) reliant la glande au réservoir (R) où est stocké le venin. La lumière du canal collecteur de la glande est visible (L), entourée par les couches de cellules bordant le canal (Intimal layer) et des cellules sécrétrices. Son diamètre diminue fortement entre la partie postérieure sombre appelée nez (« nose ») et le CD. Elle est toujours visible au niveau du CD sous la forme d'un fin trait noir central. En B) Schéma représentant les étapes de formation des VLPs de *L. heterotoma* depuis la cellule sécrétrice : 1) Le matériel est synthétisé dans la région périnucléaire des cellules sécrétrices glandulaires (Sc). 2) Il atteint la région microvillaire (mv) au niveau du canal intracellulaire où il est libéré dans la lumière. Cette partie riche en microvilli est appelée canal rugueux (rough canal). 3) Le matériel passe ensuite dans la partie lisse (smooth canal) du canal intracellulaire qui est recouverte de cuticule (cu) et qui est formée par les extensions des cellules de la couche interne (ic) du canal collecteur de la glande. 4) les sécrétions passent dans la lumière de la glande à venin (L) et circulent le long de la lumière de la glande pour atteindre le réservoir. (d'après [287]).

Le long du canal collecteur de la glande, le matériel sécrété semble s'agréger pour former des amas plus grands. Les vénosomes finaux membranés ne sont observés que dans le réservoir. Il semble

que l'acquisition des membranes se fait par un mécanisme extracellulaire. En effet, à la jonction entre le réservoir et le canal reliant la glande au réservoir, on peut observer des « piles » de membranes qui semblent s'enrouler en se détachant pour former les vénosomes matures en englobant une partie du matériel présent ainsi que d'autres vésicules vides formées par ces membranes. Un marquage avec l'anticorps LbGAP montre que cette protéine fait partie du matériel dense aux électrons sécrété par les cellules et qu'elle est quasiment entièrement retrouvée au niveau des vénosomes du réservoir chez ISm. La même étude chez ISy montre qu'il y a très peu d'amas sécrétés ou présents au niveau de la glande, peu de vénosomes présents dans le réservoir et que ces vésicules ne contiennent pas particulièrement LbGAPy.

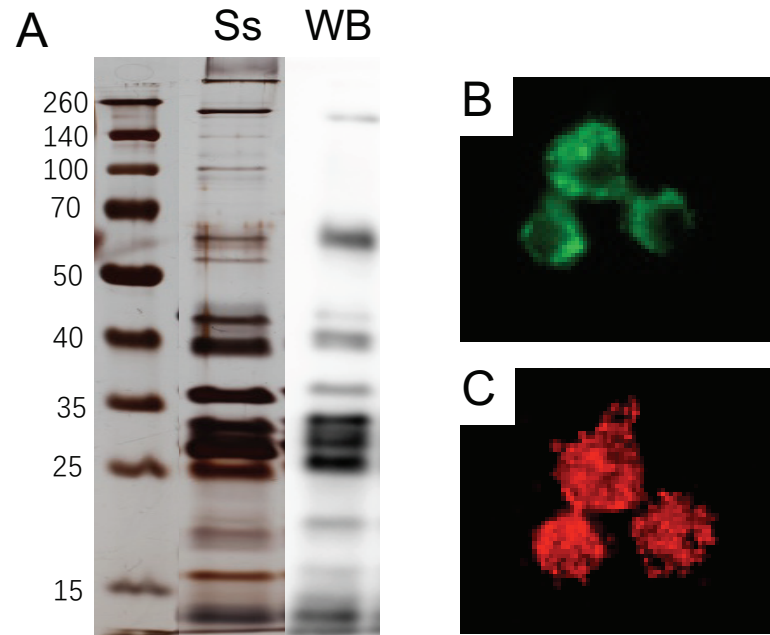
Afin de déterminer si les facteurs potentiels de virulence sont sécrétés d'une façon séquentielle le long de la glande (comme c'est le cas dans certains organes où des zones successives ne sécrètent pas les mêmes facteurs), j'ai effectué une étude histochimique avec les anticorps contre LbGAP, LbGAP2 et la serpine. Ces trois anticorps reconnaissent aussi bien les protéines dans le venin de ISm que de ISy. Les trois facteurs semblent synthétisés et sécrétés d'une façon homogène tout au long de la glande, excepté dans la zone terminale de morphologie particulière ('nose') où il n'y a aucune sécrétion, peut-être en raison de l'absence de cellules sécrétrices. Ce résultat est semblable à ce qui a été observé avec la protéine P40 chez *L. heteroma*.

LbSPNm, au contraire de LbGAP et LbGAP2, n'est pas retrouvée dans les vénosomes purifiés soit par centrifugation sur gradient de densité, soit par centrifugation simple du venin à 15000g, suggérant que toutes les protéines sécrétées ne sont pas « emballées » à partir du matériel présent dans les vénosomes.

Les vénosomes d'ISm purifiés par centrifugation sont suffisants pour protéger l'œuf d'ISy contre l'encapsulation chez *D. melanogaster* et leur injection dans la larve hôte reproduit le phénotype induit par le venin au niveau des lamellocytes démontrant ainsi leur rôle central dans l'inhibition de l'encapsulation. LbGAP et LbGAP2 sont toutes deux retrouvées au niveau des lamellocytes présentant une morphologie altérée.

Afin de vérifier si les vénosomes entrent dans les lamellocytes comme cela a été suggéré pour *L. heterotoma*, j'ai développé une technique de marquage des protéines de surface de ces vésicules. Les premiers essais que j'ai effectués avec un composé couplant, la NHS-biotine, m'ont permis de montrer que les vénosomes pouvaient être marqués et restaient fonctionnels (Figure 30). En effet, on pouvait retrouver le marquage dans les hémocytes de l'hôte après injection des vénosomes marqués. Cependant, peut-être en raison d'une perméabilité de la membrane à ce composé, un grand nombre des protéines des vénosomes semblaient marquées (Figure 30) ce qui compliquait l'analyse car il était difficile de savoir si on visualisait les vénosomes ou les protéines transportées.

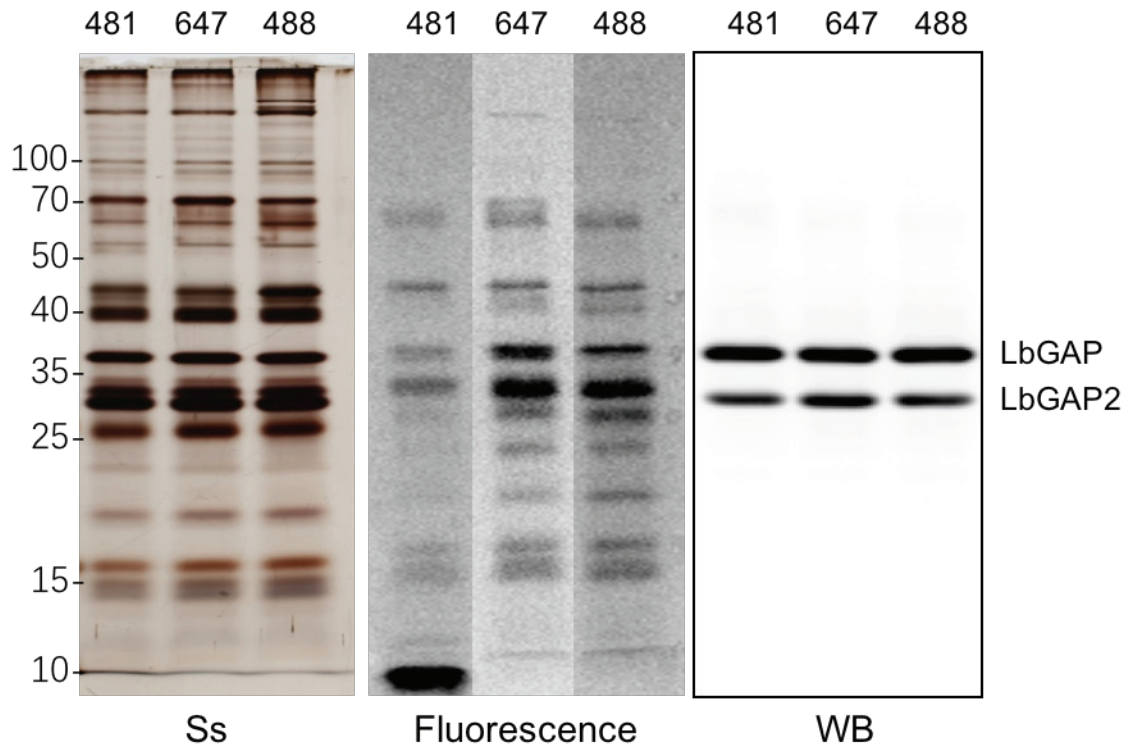
De plus, la révélation fluorescente de la biotine par l'avidine ne semblait pas toujours spécifique et donnait beaucoup de bruit de fond, ce qui pouvait être dû à la présence de protéines capables de fixer ce composé au niveau des cellules.



**Figure 30: Marquage des vénosomes et immunolocalisation dans les lamellocytes de *D. melanogaster*.**

A) Protéines des vénosomes ISm marquées à la biotine et séparées par SDS-PAGE. Ss, coloration à l'argent ; WB, Western blot équivalent révélé avec de l'avidine-HRP. Poids moléculaire en kDa. B et C) hémocytes de *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> 4h après microinjection du culot de vénosomes de *L. bouvardi* ISm marqués. B) les vénosomes sont révélés par de l'avidine couplée au FITC. C) la protéine LbGAP est révélée dans les mêmes cellules sous forme de points rouges.

J'ai donc utilisé une méthode plus directe pour éviter d'utiliser l'avidine en marquant les vénosomes avec un fluorophore lié à un agent couplant, du NHS-Alexa. Trois types de composés ont été testés, deux Alexa émettants dans le rouge (NHS-481 et -647) et un dans le vert (NHS-488) (Fluoprobes, Interchim). J'ai tout d'abord vérifié le marquage des protéines par ces différents composés (Figure 31). Les fluorophores marquent moins de protéines que la NHS-biotine. Les composés NHS-647 et -488 donnent un profil quasiment similaire, deux bandes étant fortement marquées : une à 37 kDa, au niveau de LbGAP et une autour de 30 kDa légèrement supérieure à la position de LbGAP2. Une dizaine d'autres bandes sont aussi marquées plus faiblement, celles situées à 42 et 25 kDa l'étant sensiblement plus que les autres. Le composé NHS-481 semble moins efficace, il marque sensiblement moins de bandes et moins fortement. J'ai choisi d'utiliser NHS-488 qui marque plus légèrement la bande à 37 kDa pour le reste des expériences.



**Figure 31: Marquage des vénosomes avec des NHS-Alexa.**

A gauche, les protéines de vénosomes ISm marquées avec les trois différents composés (NHS-Alexa 481, 674 et 488) sont séparées par SDS-PAGE et colorées à l'argent (Ss) pour vérifier que la quantité déposée est la même. Au milieu, la fluorescence des protéines marquées transférées sur une membrane de nitrocellulose est révélée en utilisant un imageur spécifique (Typhoon FLA-3000, Fuji). A droite, la même membrane est ensuite traitée avec les anticorps contre LbGAP et LbGAP2 (WB).

Les vénosomes ISm et ISy marqués ont été injectés dans les larves hôtes et les hémocytes récupérés à différents temps après injection. Quelques heures après injection (4h), les vénosomes sont vus dans les plasmatoctes qui représentent la totalité des cellules observées. Après 18h une production de lamellocytes est visible. Les vénosomes ISm sont retrouvés en grand nombre dans ces cellules et une partie d'entre eux colocalisent avec LbGAP et LbGAP2. Une grande partie des lamellocytes présentent un changement de forme. Très peu de vénosomes ISy sont retrouvés dans les lamellocytes mais ils colocalisent aussi avec les deux RhoGAPs. 18h et 24h après injection, des vénosomes circulent toujours dans l'hémolymphe permettant de maintenir une entrée continue dans les lamellocytes. De façon intéressante, tous les vénosomes ISm ne colocalisent pas avec les RhoGAPs, ce qui suggère que la vésicule s'est vidée de son contenu (en l'occurrence les RhoGAPs) et que les protéines de membranes fortement marquées persistent dans les cellules. Afin de savoir si les vénosomes ciblent uniquement les cellules circulantes ou s'ils peuvent atteindre les cellules dans les compartiments hématopoïétiques, j'ai développé en collaboration avec le plateau de microscopie de l'unité une méthode permettant de rendre transparentes

(clarification) les larves de drosophile après injection. Grâce à cette méthode, nous avons pu visualiser les vénosomes marqués au niveau de cellules semblables en taille aux plasmatoctes et lamellocytes dans les zones où se trouveraient les compartiments sessiles.

Dans une dernière partie, j'ai cherché à savoir si les vénosomes étaient capables d'entrer dans les lamellocytes des différentes espèces de drosophiles attaquées par *L. bouvardi* dans la nature ou au laboratoire, mais avec un succès parasitaire variable. J'ai utilisé *D. melanogaster* YR (une souche résistante qui encapsule ISy mais pas ISm), le mutant Hop<sup>Tum-1</sup> qui a l'avantage de présenter constitutivement un grand nombre de lamellocytes mais qui n'encapsule pas non plus ISm (observations personnelles ; [85]), une souche de *D. simulans* montrant un fort taux d'encapsulation de ISm (environ 60%), une souche de *D. yakuba* (qui encapsule ISm) et une souche de *D. sukii* qui encapsule non pas l'œuf mais la larve de ISm, l'issue étant le plus souvent fatale au deux partenaires en raison d'une mélanisation générale se déclenchant en fin de L3-début de pupaison (données non publiées du laboratoire ; [302,303]).

Ces différentes espèces de drosophiles présentent toutes des cellules de types plasmatoctes phagocytaires et des lamellocytes après infestation (exceptée pour Hop<sup>Tum-1</sup> où ils sont toujours présents) qui ne sont pas phagocytaires. Après injection ou parasitisme, les vénosomes et LbGAP ont été observés dans les plasmatoctes et dans environ 50% des lamellocytes chez *D. melanogaster* et *D. simulans*, moins de 30% chez *D. yakuba* et seulement 7% chez *D. sukii* qui présentait après 48 h le moins de lamellocytes par rapport aux autres espèces. De plus, les lamellocytes marqués chez *D. simulans* et *D. yakuba* contenaient environ 50% moins de spots LbGAP que ceux de *D. melanogaster* et ceux de *D. sukii* une quantité encore plus faible. De à l'exception de *D. melanogaster*, je n'ai pas observé de modification importante de la forme des lamellocytes. Il y a donc une forte corrélation entre le taux d'entrée et la quantité de vénosomes dans les lamellocytes, le changement de forme et la réussite du parasitisme sur l'espèce hôte parasitée.



## Article 1 : Texte principal

### Atypical extracellular vesicles as interspecies comunicasomes involved in host specificity: the case of a parasitoid wasp of *Drosophila*

Bin **Wan**<sup>1</sup>, Emily **Goguet**<sup>1+</sup>, Marc **Ravallec**<sup>2</sup>, Olivier **Pierre**<sup>1</sup>, Séverine **Lemauf**<sup>1</sup>, Anne-Nathalie **Volkoff**<sup>2</sup>, Dominique **Colinet**<sup>1</sup>, Jean-Luc **Gatti**<sup>1§</sup>, Marylène **Poirié**<sup>1§\*</sup>

<sup>1</sup> *Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, ISA, France*

<sup>2</sup> *INRA, Univ. Montpellier, UMR 1333 « Microorganism & Insect Diversity, Genomes & Interactions » (DGIMI), CC101, Montpellier Cedex 34095, France*

<sup>+</sup>E. Goguet present address: National Cancer Institute, Frederick National Laboratory for Cancer Research, Bethesda, MD, USA.

<sup>§</sup> These authors jointly supervised the work

**\* Corresponding author:** Marylène **Poirié**, Evolution and Specificity of Multitrophic Interactions (ESIM), UMR 1355 "Sophia Agrobiotech Institute" (ISA), Institut National de la Recherche Agronomique, INRA PACA, 400 route des Chappes, Sophia Antipolis, 06903, France.

Tel: +33 00 (4) 92 38 64 09 ; E-mail: [poirie@sophia.inra.fr](mailto:poirie@sophia.inra.fr) / [poirie@unice.fr](mailto:poirie@unice.fr)

## ABSTRACT

*Leptopilina boulardi* wasps oviposit eggs inside *Drosophila* larvae where parasitoid develops by consuming the host tissues and emerges as free adult. Parasitism success relies on injection of venom containing virulence factors that disable the host encapsulation immune response. Venom contains also vesicles (named hereafter venosomes) that have a peculiar biogenesis along the venom apparatus and we showed here this may involve an extracellular membrane acquisition. Purified venosomes are sufficient to protect the egg from encapsulation in *D. melanogaster* and colocalize with known virulence factors in host lamellocytes. Venosomes entry is strongly reduced in lamellocytes of *Drosophila* species where parasitism failed, demonstrating that they play a key role in specific transport and targeting of the virulence factors. This wasp species provides a new model to study the evolution of extracellular vesicles formation mechanisms and their role in specific inter-species communication.

## INTRODUCTION

It is now well demonstrated that cells can communicate at “long distance” using different types of membranous particles, called extracellular vesicles (EVs). The release or secretion of EVs is a universal cellular property, shared by archaea, bacteria and eukarya, which probably existed in the last common ancestor to these three domains of life [1-2]. Because most organisms live in interaction, EVs from one species may also be transferred and thus act on another species. Accordingly, recent data from bacteria, intracellular parasites, and nematodes showed that pathogens-secreted EVs participate in the communication between non-infected and infected host cells [3-4]. EVs might play a key role through the propagation of pathogens or through the transport of virulence factors in order to alter the function of targeted cells during infection [5-6].

Endoparasitoid hymenopteran wasps' life style is between these of parasites and predators: they oviposit eggs inside the body of other insects, larvae develop by consuming the living host tissues and finally emerged as free adult parasitoids [7]. To ensure successful development, parasitoid eggs and larvae must avoid the host immune response and regulate its physiology [7-8]. Parasitoids have evolved astonishing strategies to deliver virulence factors (VFs) into host cells. The production of EVs in parasitoid wasps has long been reported and studies have evidenced their different nature and origin [9-12]. Some species relies on viral shuttles (PDV or VLP) encoded by viral genes stably integrated in the wasp genome (named polydnaviruses; PDVs [9-11]). These EVs are produced and secreted by the wasp ovarian calyx cells and carry mainly DNA. Others use a more peculiar way, these wasps deliver some of their VF produced in the venom gland by packaging them into extracellular membranes and stored them in a reservoir (both part of the reproductive apparatus) [9,12-13]. In both cases EVs are injected along with the egg at oviposition and participated in the parasitoid success. While a large number of parasitoid wasp species produced ovarian EVs from PDVs origin very few species have been reported to produce EVs in the venom apparatus [9]. Among them, wasps from the Figitidae family that includes the *Ganaspis* and *Leptopilina* species that parasitize *Drosophila melanogaster* and closely-related species. Venom EVs observed in these species differ in shape, size and structure [12-18], and as the mature vesicles resemble to viruses they were named Virus Like Particles (VLPs) in former publications. However, this name is not appropriate since there is no evidence for a viral origin nor of the presence of DNA in these EVs [9]. We will thus name them "venosomes" thereafter to avoid confusion.

The main insect immune defense against parasitoid eggs and larvae, named encapsulation, consists in the formation of cell layers of hemocytes around the foreign body together with the production of melanin and cytotoxic radicals through the activation of a phenoloxidase (PO) cascade that likely kill the parasite [19]. In the *Drosophila* host, only one main cell type, the

lamellocytes, are specifically required for the immune encapsulation process and have been identified to date as targeted by *Leptopilina heterotoma* venosomes leading to the lysis of these cells [12,20].

Different strains of *Leptopilina boulardi* are used in different laboratories that showed various level of parasitism success according to the *Drosophila* species or strains. We have characterized two strains, the LbISm (strain G431) that is highly virulent against *D. melanogaster* and the LbISy (strain G486) for which success depends on the resistant/susceptible genotype of the host [21-23]). These two strains largely differ in the relative abundance of their main venom components, with few proteins in common and extensive quantitative differences in most of the common ones [24]. They differ as well in the number of venosomes present in their reservoir [13]. One of the proteins present in LbISm venom, a RhoGTPase activating protein (RhoGAP) named LbGAP, has been shown to be important for parasitism success and was immunolocalized in lamellocytes after parasitism [25-27]. Indeed, the number of LbGAP labeled “spots” correlated with the alteration of lamellocytes shape (shift from flat round to bipolar cell), morphological change that may impair their capacity to encapsulate the parasitoid egg [26]. Yet, the mechanism of LbGAP entry in lamellocytes remains unknown. The LbISy venom does contain RhoGAPs but has no effect on lamellocytes, suggesting they are not responsible for parasitism success in this strain. However, LbISy venom contains a serine protease inhibitor (a serpin named LbSPNy) that inhibited the PO activation in the hemolymph of its *Drosophila yakuba* host larva [28]. Furthermore, it was recently evidenced that i) LbGAP is one of the members of a gene family specifically expressed in the venom gland of LbISm and LbISy, other members bearing mutations that may disrupt their classical function and possibly confer them original features and ii) that a serpin (LbSPNm) is also abundant in the venom of LbISm while it may target different type of proteases than LbISy [24,29].

In this study, we have analyzed the molecular basis of *Leptopilina boulardi* host–parasitoid interactions by characterizing the venosomes formation and their fate once injected in the host mainly focusing on the cellular immune cells. Our data demonstrate that the venosomes have a striking extracellular biogenesis and are a species-specific transport system that target and enter circulating and sessile lamellocytes of *D. melanogaster* to deliver venom factors. Venosomes entry in lamellocytes is also correlated with the parasitism success in the other drosophila species tested and thus may have a pivotal role in the specificity of host–parasite interaction by interfering with the host cellular immune system. *L. boulardi* parasitoid wasp provides an interesting model to study the evolution of extracellular vesicles formation mechanisms and the role they play in inter-species communication.

## RESULTS

### Venom apparatus histological overview

The Figitidae venom apparatus consists in an elongated venom gland (named “long gland”, measuring about 200µm) with a central collecting canal connected to a large reservoir by a thin duct (connecting duct). Morphologically, the venom glands of LbISm and LbISy are almost identical and very similar to those previously described for other *L. boulardi* strains and other *Leptopilina* species. Since the venom gland and the glandular secretory cells of *L. heterotoma* have been detailed previously [17], we will use here the same terminology. The distal end of *L. boulardi* gland is enlarged and terminated by a structure called “nose”, where electron-dense material can be observed (Fig. 1A). From this end, starts the central gland collecting canal that rapidly decreases in width, then remains of constant diameter until the junction with the reservoir connecting duct. Based on cell nucleus morphology (DAPI-labelling), two types of cells are visible in the gland (Fig. 1B-E): a first type with a large nucleus located at the periphery of the gland that represents the glandular secretory cells, and a second type with a small nucleus that forms the “intimal layer” that surrounds the central collecting canal (Fig. 1C). Phalloidin

strongly labelled the actin-rich microvilli lining the upper part of the secretory canal found within each secretory cell (Fig. 1D-1E) as shown in *L. heterotoma* [18]. The lower part of this canal being formed by the extension of the intimal layer cells and recovered by a cuticle-like material certainly like the side of the connecting duct is less reactive [18].

Although the Figitids venom glands have been studied, less is known on the connecting duct and the reservoir. The connecting duct is about 100 to 150 $\mu$ m long and varies in diameter (Fig. 1A and 1F). Nucleus size was uniform but the number of cells seemed higher in zones with diameter restriction (Fig. 1G). The actin distribution also increased in these zones and the actin patterns suggested the presence of a circular muscular layer all along the duct (Fig. 1H), certainly allowing the circulation of the fluid towards the reservoir by peristaltic contractions. At the reservoir junction, the muscular pattern was still visible and continued on the reservoir. One side of the reservoir, that we named “ventral side”, displays a higher density of muscle fibers (based on actin staining) together with a larger number of cells (Fig 1K-L). The reservoir is a very large structure (700-800 $\mu$ m long with a diameter of 150-200 $\mu$ m). This structure is not uniform but shows a series of separated enlargements (Fig. 1A). The density of cell nucleus in the lateral and dorsal sides was very low, each nucleus being well separated from each other (Fig. 1J-1K). Each nucleus is at a center of a large flat cell forming a continuous monolayer on the surface of each enlargement separated from its neighbors by what seemed a chord of muscular cells (Fig 1L-1M). These muscular chords may play several roles such as facilitating and controlling the ejection of venom at oviposition or maintaining a homogenous composition by mixing newly and older formed venom. These chords may also belt the reservoir to restrict its volume within the wasp abdomen cavity.

**Virulence factors are synthesized and secreted all along the gland.**

Proteins LbGAP, LbGAP2 and LbSPN are present in LbISm and LbISy venom although in

different quantities between both strains (LbGAP [27]) or under different molecular forms (LbSPN [28]). Specific rabbit polyclonal antibodies were used to immunolocalize these proteins in the gland of the two wasp strains (Fig. 2). LbGAP, LbGAP2 and LbSPN were strongly labelled throughout the entire LbISm gland (excepted in the “nose” region) but gave weaker signal in LbISy gland, particularly for LbGAP for which the signal was just above the intensity obtained with the preimmune serum demonstrating a much lower synthesis of this protein in agreement with previous venom studies [25,27]. In LbISm gland, the three virulence factors were immunolocalized within the cytoplasm of the secretory cells and inside the lumen of the intracellular secretory cells canal with the actin-rich microvilli (see details for LbGAP2 in Suppl Fig. 1). In LbISm gland a weaker signal was observed for LbGAP2 and LbSPN in the secretory cell cytoplasm but was stronger in the cell canal explaining the dots appearance (Fig. 2C.1 and 2E.1). The absence of signal in the central gland collecting canal and the reservoir may be due to the loss of content during the staining process.

### **LbGAP and LbGAP2 are associated with venosomes**

*Biochemical evidences.* Figitids venosomes have been previously shown to be pre-assembled in the long gland lumen from material secreted by the secretory cells and, once mature, stored in the reservoir [16]. But to date, only one of the putative virulence factor from *L. heterotoma*, the p40 protein, was immunolocalized at the surface of mature venosomes [16]. To determine whether the *L. bouleardi* venom proteins LbGAP, LbGAP2 and LbSPN were also associated with venosomes, we first purified those from LbISm by ultracentrifugation on Nycodenz gradient (Suppl Fig 2) as previously described [12]. Clearly LbGAP and LbGAP2 co-sediment in the awaited venosomes fraction but not LbSPN (Suppl Fig 2). In order to simplify the purification procedure, we directly centrifuged the crude venom from LbISm and LbISy at 15,000g, the analysis of the pelleted material by electron microscopy showed large aggregates and typical 100-300 nm vesicle-containing particles venosomes (Fig. 3) as described in *L. bouleardi* venom



reservoir [13-14]. We also observed that the protein profile of the 15,000g washed pellet represent only a subset of the total proteins and was very similar to that of the Nycodenz purified vénosomes. LbGAP and LbGAP2 are also highly enriched in the pellet but not LbSPN that remained in the supernatant along with numerous other proteins (Fig. 3). Thus, because it was less time and material consuming, we used the 15,000g pellet as venosome preparation for the rest of the experiments.

*Immuno-electron microscopy.* In order to ascertain LbGAP association with venosomes and also to define at which step of the venosomes formation this occurs, we prepared ultrathin sections from LbISm and LbISy venom apparatus for fine structure analysis and immunogold using the LbGAP polyclonal antibody (Fig. 4). Figure 4A and 4B show the canal-like structures found in gland secretory cells. The presence of microvilli-like structures indicated that the section was in the “rough” part of this canal. In both species, this canal was filled with secreted aggregated material with no defined shape that was labelled by immunogold. Labelling was also observed in some cytoplasmic vesicles close to the cell membrane that served certainly to secrete this material. In the gland collecting canal, the appearance of the material was very different between LbISm and LbISy (Fig. 4C and 4D). In LbISm, the cell canal is filled with electron dense large aggregates and long filaments along with less dense aggregated material while, in LbISy, only small dense particle-like material was scattered in fibrous/filamentous material. LbGAP was almost exclusively associated with the LbISm dense aggregates while no specific association was observed for LbISy. In the LbISm reservoir (Fig. 4E), membraned venosomes (arrows) were clearly formed. Although others larger aggregates (from 400nm to 1µm) containing less electron dense material were also present, almost all the LbGAP labelling was associated with the venosomes. In LbISy reservoir, a very low number of membrane vesicles resembling venosomes was observed on the sections and the LbGAP labelling was not specific to them (Fig. 4F). One of the LbISm control section attracted our attention. This section passed through the junction

between the connecting duct and the reservoir (Fig. 5). We were surprised to observe at this place, coming from the cell lining the duct, stack of membranes, some of them seemed rolling and detaching to form multi-membrane vesicles. Because i) none of the material observed in the gland canal resemble to “mature” reservoir venosomes and ii) these empty multi-membrane vesicles were not retrieved in the reservoir but seemed to engulf or acquire some of the duct materials, we hypothesized that they could form the membrane seen around and within the mature venosomes (Suppl. Fig. S3).

### **Venosomes are sufficient to protect susceptible wasp eggs from encapsulation**

Previous results showed that when *D. melanogaster* L2 resistant larvae (YR strain) were injected with venom apparatus extracts or crude venom from virulent LbISm and then submitted to oviposition by the avirulent LbISy strain (normally encapsulated in this host), there was no encapsulation of the egg [14,23]. This crude venom encapsulation protecting effect was also conferred by injection of the LbISm resuspended washed 15,000g pellet containing the venosomes (Table 1). In contrast, injection of the 15,000g supernatant did not protect the LbISy eggs nor the injection of the recombinant LbGAP protein alone (Table 1).

### **Venosomes transport virulence factors in permissive host lamellocytes**

Altogether, our results suggest that venosomes are necessary to impair immune cells response. Our hypothesis is that they are essential for the targeting or the entry of the virulence factors in the host cell. In order to demonstrate this, we assessed the presence of LbGAP and LbGAP2 in hemocytes by immunochemistry after parasitism or after microinjection of *in vitro* fluorescently labelled venosomes in *D. melanogaster* YR larvae to search for coimmunolocalization. The time frame was chosen because it is the moment where lamellocytes number increased strongly in hemolymph after parasitism [30]. Confocal microscopy indicated that 0-4h after parasitism LbGAP and LbGAP2 were mainly immunolocalized in small round cells (about 10 µm)

resembling plasmatocytes (not shown). 14-18h after parasitism by LbISm, both LbGAP and LbGAP2 accumulated in host lamellocytes (Fig. 6), most of them showed a visible deformation correlated with the intracellular quantity of both LbGAP and LbGAP2 (as previously observed for LbGAP [26]). By contrast, almost no spots of LbGAP and only few spots of LbGAP2 were observed for LbISy and no change in cell morphology was observed (not shown). When fluorescent LbISm venosomes were injected in larvae, we clearly observed a co-immunolocalization between the labelled venosomes and LbGAP or LbGAP2 in lamellocytes after 18h (Fig. 6), confirming that venosomes carrying lbgap enter the lamellocytes. Conversely, only few labelled venosomes or LbGAP2 spots could be observed following injection of LbISy venosomes (not shown). Interestingly, not all LbGAP and LbGAP2 spots colocalized with labelled LbISm venosomes in lamellocytes 18h after injection (Fig. 6). Because we expect that mainly membrane proteins were fluorescently labelled by NHS-Alexa, this suggest that a separation between the venosomes membrane and the LbGAPs occurred after they entered in the cells. We tested also if this may result from a continuous entry of venosomes present in hemolymph in lamellocytes followed by LbGAP and LbGAP2 release from the vesicles. Using Western blots, and hemocytes collected later in parasitism (20-24h pp), we showed that LbGAP and LbGAP2 are still circulating in the cell free hemolymph of larvae parasitized by LbISm (Suppl Fig. S5). The hemocytes pellet was immunoreactive for LbGAP and LbGAP2 after 0-4h and an increasing reaction was observed at 14-18h and remained the same at 20-24h. Probing the blot with the lamellocyte marker atilla [31] indicated that this type of cell was not detectable at 0-4h, suggesting that mainly plasmatocytes engulfed the venosomes at this time, but a strong increase in atilla immunoreaction occurs after 14-18 hours following parasitism (Suppl Fig. S5). We obtained almost the same results after purified venosomes injection (Suppl Fig. S5). After parasitism and microinjection with LbISy - certainly due to the lower quantity of LbGAP and LbGAP2 in venom venosomes - we could not observe their sustained presence in the

hemolymph or in cells although the atilla immunoreaction increased at 14-18 hours indicating an elevation in the number of circulating lamellocytes (not shown).

Because it has been demonstrated that a subcuticular population of sessile hemocytes (including lamellocytes) is released into the circulation in response to a parasitoid wasp infection [32], we analyzed whether labelled venosomes could be retrieved in this compartment. Eighteen hours after injection of labelled venosomes, YR drosophila larvae were fixed and treated in order to clarify the tissues then observed by confocal microscopy (Fig. 7). Fluorescent labelling was found in the same subcuticular areas (Fig. 7A and C) where sessile hemocytes have been previously localized [32]. At a higher magnification (Fig. 7B and D) this labelling was found in small (about 5-10  $\mu\text{m}$ ) and large flat cells ( $>30\mu\text{m}$ ) resembling plasmatocytes and lamellocytes, respectively.

### **Entry of venosomes is specific to *D. melanogaster* lamellocytes**

Because *L. bouvardi* is described as a specialist parasitoid that succeeds mainly on *D. melanogaster* and *D. simulans*, we then tested whether the entry of venosomes in lamellocytes is species dependent and if this specificity may explain the success of this wasp in these host species. We first analyzed the hemocytes function in other species in which LbISm female oviposited in laboratory conditions, the *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> mutant which produces constitutively a large number of lamellocytes [33-34], *D. simulans*, *Drosophila yakuba* [35] and *D. sukuzii* [36-37]. 14-18 hours after oviposition, we observed three types of cells in hemolymph of these species: i) small round shape cells of about 10 $\mu\text{m}$  with some phagocytic properties but that did not bind well on glass slide and certainly represent prohemocyte and proplasmatocyte cells (not shown), ii) 10-20  $\mu\text{m}$  round cells that stick and spread well on slide, resembling macrophage-like plasmatocytes or oenocytoids described in these species [36,38] and showing a phagocytic function both against injected latex beads and *E. coli* bacteria (Suppl Fig. S4), iii) large flat cells of 30-40  $\mu\text{m}$ , the lamellocytes (Fig. 8), that spread well on slide but did not

phagocytosed latex beads while a small number (estimated less than 5%) of *D. melanogaster* YR and *D. yakuba* may be infected by bacteria. When parasitized by ISm or after injection of fluorescently labelled venosomes, LbGAP and venosomes spots were detected in a larger number of *D. melanogaster* and *D. simulans* lamellocytes than in the two other species (see data after parasitism Suppl Fig S6), while in all species LbGAP was detected in plasmatocytes (Suppl Fig. S4). Moreover, the number of LbGAP spots in *D. simulans*, *D. yakuba* and *D. suzukii* immunoreactive lamellocytes was less than half this found in *D. melanogaster* (suppl Fig S6). The presence of venosomes in lamellocytes correlates with the parasitism success of LbISm in these drosophila species. The larger entry of venosomes in *D. melanogaster* lamellocytes may be due to the presence of a specific or more efficient binding or uptake mechanism in this species reduced or absent in the others.

## DISCUSSION

Hymenopteran parasitoid wasp venom injected into the host hemolymph during oviposition creates a suitable environment for the development of their progeny by targeting different host physiology components. This is due in part to extracellular vesicles produced either in the ovaries (PDV) [9-11] or within the venom gland in few reported species including the braconidae *Meteorus pulchricornis* (Braconidae: Euphorinae) [39], a polyphagous parasitoid of lepidopterans larvae, and the Figitidae species of the Ganaspis and Leptopilina genus (itself divided in three clades Heterotoma, Boulardi and Longipes [40]) that attack larvae of *Drosophila* spp. The EVs from Ganaspis and Leptopilina species studied to date are 100-400 nm vesicles with different overall shapes.

*L. boulardi* venosomes from LbISm and LbISy strains have already been described by TEM in the wasp reservoir [13-14] but their biogenesis was not reported in detail. For both strains, in the gland cell canal lumen we observed only an anamorphous dense electron material with no apparent membrane, surrounded by the gland cell microvilli. This electron dense material, which

was clearly immunoreactive for LbGAP in LbISm, is retrieved in the gland canal mixed with lighter aggregates and in some case small empty vesicles in LbISy. Fully formed venosomes were observed only in the reservoir. In LbISm reservoir lumen, they appeared as electron dense material surrounded by a membrane surrounding and also contained smaller membrane vesicles. Venosomes were more numerous and more structured in LbISm than that of LbISy which appear to contain less dense material and fewer enclosed vesicles. LbISm venosomes actually correspond to the previously described 'Is' morphotype (always observed in immune suppressive or Is strains) and the LbISy venosomes to 'NIs' morphotype (observed in the Non-Immune suppressive or NIs strain) [13].

In *L. heterotoma* venosomes biogenesis has also been reported to occur by different stages of aggregation of precursor material in the gland lumen while in the reservoir they showed a pentagonal/hexagonal core with multiple spikes and they have a distinct membrane. *L. victoriae* venosomes resemble in biogenesis and shape and to those of *L. heterotoma* while those of the *L. bouhardi* Lb17 strain were slightly different [18]. The Lb17 strain “immature” EVs secreted from the gland cells present a membrane enclosing a small amount of electron dense material while mature reservoir vesicles showed a rounded shape with a membrane enclosing a large quantity of punctuated material certainly acquired during the transit [18]. Overall in Figitidae, although differences existed between species, formation of venosomes seems to always occur in a progressive mode along the gland/connecting duct canal. The fact that only some virulence factors were retrieved in vesicles ([16]; our data for LbGAP and LbGAP2) while some other remaining soluble (such as LbSPN) although they were all secreted all along the gland suggests that this process is not a progressive maturation of preexisting vesicles along the gland duct but involves a specific embedding mechanism. Our fortuitous observation that extracellular stacks of membrane were present at the junction between the connecting duct and the reservoir led us to propose that the enclosure of a specific part of the secreted circulating material and the final

formation of vesicles occurred within the reservoir side of the connecting duct. However, this very peculiar and unreported mode of extracellular vesicles formation will need further investigation to be confirmed.

*In vitro* purified *L. heterotoma* VLPs induced degeneration of drosophila Hop<sup>Tum-1</sup> larvae lamellocytes, the main hemocyte type involved in egg encapsulation and some of these vesicles were observed in the cell cytoplasm [16,41]. Based on the association of putative virulence proteins p40/p47.5 with *L. heterotoma/L. victoriae* venosomes and the reported immunolocalisation of these proteins in lamellocytes incubated with wasp fluid reservoir, it was suggested that venosomes deliver associated virulence proteins or toxins of the venom gland [16,20]. Based on our previous observation showing LbGAP as “large spots” inside *D. melanogaster* lamellocytes [27], we also suspected that LbGAP was associated with venosomes thus facilitating its entry in lamellocytes. The role of venosomes in the active immune protection of the parasitoid egg has been confirmed here by i) the protection toward encapsulation of avirulent *L. bouhardi* eggs by injection of purified venosomes from virulent parasitoids (thus enriched in LbGAPs), ii) after parasitism or microinjection of purified venosomes, LbGAP and LbGAP2 immunolocalized in morphologically modified host lamellocytes and iii) after microinjection of *in vitro* fluorescently labelled venosomes, these putative virulence factors colocalized clearly with venosomes in these modified lamellocytes. Interestingly, the level of venosomes in hemolymph may last enough to continually block newly formed lamellocytes thus depressing the larvae immune system and impairing the encapsulation process until the late L3 or the pupation stage, protecting also the newly hatched parasitoid larvae. Moreover, not only circulating but also sessile hemocytes seemed targeted in *D. melanogaster* by venosomes suggesting that their immune function was also impaired after wasp oviposition. We can thus definitively conclude that venosomes are “transporters of virulence factors” that parasitic wasps use to counteract host immunity. The further observation that LbISm venosomes/LbGAP entry



was much higher in lamellocytes of *D. melanogaster* and *D. simulans* (two species where the parasitoid succeeds to reproduce [35]) compared to *D. yakuba* and *D. sukuzii* (where parasitism failed [35-37]) suggests the possible existence of a specific or at least more efficient lamellocyte targeting/uptake mechanisms that remained to be elucidated. This mechanism provides also a new level of species specificity to explain the parasitoid success.

The role and intracellular targets of the transported virulence factors within these cells remain hypothetical. LbGAP is able *in vitro* and in yeast double-assay to bind with Rac1 and Rac2 [27], two Rho GTPases necessary for the completion of the encapsulation process [42-44], but whether this occurs *in vivo* remains to be demonstrated. LbGAP2 as well as other member of the LbGAP family described in *L. bouleari* venom bear mutations in the active site [24]. Proteomic analysis showed that several members of this family are present in venom [24] and associated with venosomes (unpublished data). How they may act on the lamellocyte physiology and whether they have evolved new functions is still mysterious.

Following *L. heterotoma* and *L. victoriar* envenomation it has been evidenced that hematopoietic precursors within the *Drosophila* host lymph gland are also affected by apoptosis [20]. Whether this is linked with the VLPs injection by these species and whether *L. bouleari* venosomes (particularly from LbISm) target some other host tissues is still not known but improvement of our approach using fluorescently labelled venosomes coupled with larvae clarification may provide a tool to answer this question.

Extracellular vesicles (EVs) secretion is very likely a common property used by many pathogens or parasites to propagate or transport virulence factors. We have shown here that some parasitoid wasps use very unusual cellular derived EVs in their venom to transport and target specific virulence factors necessary for parasitism success, providing thus an interesting model to explore the role of EVs in inter-species communication and particularly in controlling the host immune response, a field that has not been thoroughly investigated yet.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological material

The *L. bouleari* avirulent strain from Brazzaville (Congo) (LbISy; Gif stock number G486) and the virulent strain from Nasrallah (Tunisia) (LbISm; Gif stock number G431) have been previously described [22-23]. All parasitoids were reared at 25 °C on a susceptible *D. melanogaster* Nasrallah strain (Gif stock 1333). After emergence, adults were kept at 18°C on agar medium with honey. Naïve, 5-10 days-old mated females, were used for all experiments.

The *D. melanogaster* strain 1088 from Brazzaville (Congo), named YR, was selected in laboratory for its resistance towards LbISy *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> was obtained from the Bloomington drosophila stock center (stock number 8492). The *D. suzukii* strain originates from a population collected in Sainte-Foy-lès-Lyon (Rhône, France) and provided by Pr R. Allemand (LBBE, University Lyon 1). *D. yakuba* R strain (stock number 307,14) and *D. simulans* (Japanese strain obtained from Dr Kimura, Hokkaido University). *L. bouleari* ISm parasitism succeed in *D. melanogaster* YR and Hop<sup>Tum-1</sup> strain and in *D. simulans* (>90 % of parasitism success), failed in *D. yakuba* (>90% of parasitism failure) and *D. suzukii* (100% of parasitism failure).

All drosophila strains were reared on standard medium (10% cornmeal, 10% yeast, agar and nipagine) at 25°C. All insects were maintained with a 12/12h light/dark and 50% humidity.

### Antibodies

We used in house raised rabbit polyclonal antibodies against full-length recombinant proteins for LbGAP [25] and LbGAP2 [45], or synthetic peptides for LbSPN [45] and Atila, a *D. melanogaster* lamellocyte marker [31]. The anti-LbGAP, anti-LbGAP2 and anti-LbSPN antibodies recognized equally the proteins from LbISm and LbISy. They were used for Western

blot at dilution 1/10,000 (LbGAP), 1/5,000 (LbGAP2), 1/10,000 (LbSPN) and 1/1,000 (Atila). For histoimmunochemistry, LbGAP, LbGAP2 and LbSPN antibodies were used at a 1/500 dilution. Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugate (1/10,000, Sigma) for Western blot and fluorescently labelled goat anti-rabbit IgG (Fluoprobes 594, Interchim; 1/200 and 1/2,000 as indicated) for immunohistochemistry.

### **Venom obtention and venosomes purification**

The venom apparatus of *Leptopilina* females were obtained by traction on the ovipositor. Reservoirs were separated from the glands and dilacerated with tweezers in a 20 to 50 $\mu$ l drop of Insect Ringer Solution (IR) supplemented with protease inhibitors (IR-PI) (Sigma). The venom total extract was then centrifuged for 5 min at 500g to remove residual tissues and obtain the crude venom. Crude venom was centrifuged at 15,000g to pellet the vesicular material that was washed twice with IR-PI and used either for SDS-PAGE, labelling or electron microscopy. The supernatant was kept as the soluble venom proteins fraction. The protein profile of venosomes obtained by direct centrifugation was compared to that obtained by ultracentrifugation (35,000g, 1h; rotor MLA50, Beckman) on a 10–50% Nycodenz gradient as previously described [12].

### **SDS-PAGE and Western blotting**

Samples were run under denaturing and reducing (5%  $\beta$ -mercaptoethanol) conditions on 12.5% polyacrylamide gels. The gels were either silver stained or transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore). The membrane was blocked with TBS-Tween 2% low fat milk, incubated overnight at 4°C with the indicated antibody, washed and incubated with the secondary antibody (2h at RT). After washing, the chemiluminescent signal was detected (Westdura, Pierce) with a digital camera. None of the preimmune sera or the secondary antibody yielded a significant signal.

## **Electron microscopy**

15,000g venosomes pellets from LbISm and LbISy were processed for transmission electron microscopy as described [14]. Briefly, samples were fixed in sodium cacodylate (0.1M, pH 7.2 for venosomes) or PBS (for venom apparatus) with 5% glutaraldehyde for 24h at 4°C. Post-fixation was done with 2% osmium tetroxyde in the same buffers, followed by dehydration in graded series of ethanol before Epon inclusion and ultrafine section. Sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate before observation (Jeol 1010 and Zeiss EM10CR, 80kV). For the immunogold labelling, twenty-four venom apparatus (gland+reservoir) from LbISm and LbISy females were fixed 3h in paraformaldehyde 4%- phosphate 0.1 M at 4°C. Samples were included in agarose blocs (8 apparatus per inclusion; three blocks for each strain). Blocks were washed four times in 0.1 M phosphate buffer at RT and dehydrated in ethanol (50 à 100% at -19°C), before resin inclusion (London Resin White; TAAB Lab Equipment) (-25°C for 48h under UV). Ultrafine sections (70 nm) were made, mounted on colloidal gold treated grids, washed in PBS and blocked in PBS-1% BSA before incubation with the LbGAP antibody (1/1,000; 1h30 at 20°C) (this last step was omitted for controls). After several washes in PBS-1% BSA then in PBS-0.1% BSA, all grids were incubated with a goat anti-rabbit antibody conjugated to 15-nm gold particles (1/30; Biocell Research Lab.). After washing, sections were stained with 1% acetate uranyl and examined under electron microscope (JEOL JEM 1010 at 80 kV). All observations (controls and treated) were done on the successive sections from one bloc for each wasp strain.

## **Microinjection**

Venosomes pellet obtained from 20 reservoirs was resuspended in 20µl IR and labelled with 1mM (3.5µl, 1mg/ml) of Fluoprobes 488-NHS ester ( $\lambda_{exc}\lambda_{em}$  493/518nm); Interchim) (1h at 4°C). The labelled vesicles were centrifuged at 15,000g (10 min at 4°C) and washed once with IR-BSA 3% to quench the free ester and again with IR. The last pellet was resuspended in IR and

used to micro-inject 50 (FemtoJet, Eppendorf) second-instar host larvae. Hemocytes' phagocytic properties were tested *in vivo* by microinjecting 14-18h parasitized drosophila L2 larvae with fluorescent latex beads (2  $\mu\text{m}$ -diameter carboxylate-modified polystyrene latex beads, red fluorescent; Sigma) and fluorescent living *Escherichia coli* ( $5 \times 10^9$  bacteria/ml; *E. coli* DH5 alpha expressing the green fluorescent protein). Observations were done 4h after injection of beads or bacteria. Experiments were repeated 2 or 3 times for each tested sample on different days.

### **Parasitism assay**

For hemocytes immunohistochemistry, batches of 30 second instar larvae (L2) collected on a dish with drosophila food were submitted to parasitism by three females' wasp for 4h. After this time, parasitoids were removed and larvae left at 25°C until use (see further).

For parasitism experiments, 30 second-instar host larvae (L2) were parasitized during 2 hours by one parasitoid female (LbISm or LbISy). The encapsulation ability was estimated 48 hours later by counting the number of encapsulated eggs after dissection of late third-instar larvae. Virulence was expressed as the ratio of non-encapsulated parasitoid eggs to the number of mono-parasitized hosts.

To analyze the immunosuppressive role of the different LbISm venom fractions (crude venom, 15,000g venom pellet, 15,000g venom supernatant) and purified recombinant LbGAP [27], *D. melanogaster* YR larvae were injected with 20 nl of each of these fractions using a Nanoject II injector (Drummond Scientific). Samples were obtained from 20 females reservoir processed in 20 $\mu\text{l}$  of IR, this volume was maintained constant so for each fraction an equivalent of 1/50th of a reservoir was injected. Approximately 150 larvae were injected for each sample, then parasitized by ISy parasitoid females and encapsulation estimated 48 hours later as described above. Controls were injected with IR alone.

### **Hemolymph and hemocytes collection**

*Drosophila* larvae were washed carefully three times in PBS. Their hemolymph was then collected directly in a 35µl drop of PBS (SDS-PAGE) or Grace's medium (Immunocytochemistry) by gently tearing the cuticle on the anterior part of the larvae with fine tweezers. For SDS-PAGE, cells were separated by centrifugation (500g for 10min) and the supernatant collected (cleared hemolymph). The cells pellet was washed twice in PBS and the last pellet and the cleared hemolymph diluted in reducing sample buffer and boiled for SDS-PAGE.

### **Tissue immunohistochemistry and confocal observation**

*Hemocytes immunohistochemistry.* Hemolymph of *Drosophila* larvae were collected at different time (as indicated) after parasitism or micro-injection with labelled venosomes. At each time points, hemolymph from 10 larvae was collected as described above, the hemolymph solution drop transferred to the center of a coverslip sitting in a 12 well culture plate to form a humid chamber. Cells were allowed to adhere for 1h before a 15min fixation with 4% formaldehyde in PBS. The cells were then washed three times with PBS, permeated with PBS-T (PBS + 0.1% Triton 100X) for 15 min and blocked with PBS 0.3% BSA for 30min. Cells were incubated one hour with primary antibody at RT, washed three times with PBS, and incubated for 1h with the secondary antibody. After three PBS washes and one with deionized water, the coverslip was mounted on a slide using an antifading medium containing DAPI (Interchim).

*Long gland immunohistochemistry.* Complete venom apparatus was fixed in 4% formaldehyde solution and 0.1% Triton 100X for 3h. After that, they were washed three times with PBS and blocked with PBS 0.3% BSA for 30min. The primary antibody was added and incubated 1h, washed three times 15min with PBS, and incubated with the secondary antibody 1h at room temperature. After three PBS washes, they were mounted between a slide and a coverslip as above.

For both type of preparation, actin was stained with green phalloidin (7nM; Green phalloidine 490 fluoprobes;  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  (491/515nm); Interchim) during the permeabilization step. Controls were made with preimmune sera and with the secondary antibody alone and the signal obtained was used to set up the background level above which the labelling was considered positive. Samples were observed and imaged either with a Zeiss AxioImager Z1 equipped with an Apotome 2 or a Zeiss LSM 880 laser scanning confocal microscope.

### **Clarification and observation of *Drosophila* larvae**

15h after injection with labelled venosomes, YR larvae were fixed by 4% PFA in PBS overnight at 4°C in the dark. After a PBS wash, samples were transferred into a glass vial for a clearing procedure based on the 3DISCO method [46]. Briefly, samples were dehydrated overnight in 50% Tetrahydrofurane (THF) (Sigma) in the dark with light agitation, then 3h in 70% THF, overnight 80%THF and 30 min 100% THF repeated 3 times followed by a final incubation in dichloromethane (Sigma) for 45 min. To ensure an optimal transparency, samples were finally impregnated overnight with dibenzylether (DBE) (Sigma). To prevent any tissue damage or shrinkage, samples were mounted into a Lab-Tek II (Lab-Tek) chamber filled with the DBE solution. As DBE degrades fluorescence over time, samples were imaged as soon as proper clearing was achieved. To obtain high resolution scans, samples were imaged by confocal microscopy.

## **REFERENCES**

- [1] Cicero Lo A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr Opin Cell Biol* 2015;35:69–77. doi:10.1016/j.ceb.2015.04.013.
- [2] Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol* 2017;27:172–88. doi:10.1016/j.tcb.2016.11.003.
- [3] Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol* 2015;31:477–89. doi:10.1016/j.pt.2015.06.009.
- [4] De Toro J, Herschlik L, Waldner C, Mongini C. Emerging Roles of Exosomes in Normal and Pathological Conditions: New Insights for Diagnosis and Therapeutic Applications. *Front Immunol* 2015;6:1–12. doi:10.3389/fimmu.2015.00203.



- [5] Coakley G, McCaskill JL, Borger JG, Simbari F, Robertson E, Millar M, et al. Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Reports* 2017;19:1545–57. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.001.
- [6] Ofir-Birin Y, Heidenreich M, Regev-Rudzki N. Pathogen-derived extracellular vesicles coordinate social behaviour and host manipulation. *Semin Cell Dev Biol* 2017;67:83–90. doi:10.1016/j.semcdb.2017.03.004.
- [7] Godfray, H. *Parasitoids* (Princeton University Press). 1994.
- [8] Carton, Y., Poirié, M. and Nappi, A.J. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*, 2008, 15(1): 67–87.
- [9] Gatti, J. L., Schmitz, A., Colinet, D. and Poirié, M. Diversity of virus-like particles in parasitoids' venom: viral or cellular origin. *Parasitoid Viruses, Symbionts and Pathogens*, Academic Press, London, 2012, 181-192.
- [10] Stoltz DB, Vinson SB, MacKinnon EA. Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoid wasps. *Can J Microbiol* 1976;22:1013–23.
- [11] Gauthier J, Drezen J-M, Herniou EA. The recurrent domestication of viruses: major evolutionary transitions in parasitic wasps. *Parasitology* 2017;3457:1–13. doi:10.1017/S0031182017000725.
- [12] Rizki RM, Rizki TM. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8388–92. doi:10.1073/pnas.87.21.8388.
- [13] Dupas S, Brehelin M, Frey F, Carton Y. Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology* 1996;113 ( Pt 3):207–12.
- [14] Labrosse C, Carton Y, Dubuffet A, Drezen JM, Poirie M. Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol* 2003;49:513–22.
- [15] Morales J, Chiu H, Oo T, Plaza R, Hoskins S, Govind S. Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victoriae*. vol. 51. 2005. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.11.002.
- [16] Chiu H, Morales J, Govind S. Identification and immuno-electron microscopy localization of p40, a protein component of immunosuppressive virus-like particles from *Leptopilina heterotoma*, a virulent parasitoid wasp of *Drosophila*. *J Gen Virol* 2006;87:461–70. doi:10.1099/vir.0.81474-0.
- [17] Ferrarese R, Morales J, Fimiarez D, Webb BA, Govind S. A supracellular system of actin-lined canals controls biogenesis and release of virulence factors in parasitoid venom glands. *J Exp Biol* 2009;212:2261–8. doi:10.1242/jeb.025718.
- [18] Gueguen G, Rajwani R, Paddibhatla I, Morales J, Govind S. VLPs of *Leptopilina boulardi* share biogenesis and overall stellate morphology with VLPs of the heterotoma clade. *Virus Res* 2011:1–7. doi:10.1016/j.virusres.2011.06.005.
- [19] Nappi AJ. Cellular immunity and pathogen strategies in combative interactions involving *Drosophila* hosts and their endoparasitic wasps. *Invertebrate Survival Journal* 2010;7.
- [20] Chiu H, Govind S. Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. *Cell Death Differ* 2002;9:1379–81. doi:10.1038/sj.cdd.4401134.
- [21] Dupas S, Carton Y, Poirié M. Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. *Heredity* 2003;90:84–9. doi:10.1038/sj.hdy.6800182.
- [22] Dubuffet A, Dupas S, Frey F, Drezen J-M, Poirié M, Carton Y. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. *Heredity* 2007;98:21–7. doi:10.1038/sj.hdy.6800893.
- [23] Dubuffet A, Colinet D, Anselme C, Dupas S, Carton Y, Poirié M. Variation of *Leptopilina boulardi* success in *Drosophila* hosts: what is inside the black box? *Advances in Parasitology* 2009;70:147–88. doi:10.1016/S0065-308X(09)70006-5.
- [24] Colinet D, Deleury E, Anselme C, Cazes D, Poulain J, Azema-Dossat C, et al. Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: The case of *Leptopilina* parasitoids of *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2013;43:601–11. doi:10.1016/j.ibmb.2013.03.010.
- [25] Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, Grangeia A, Huguet E, Drezen JM, et al. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005;35:93–103. doi:10.1016/j.ibmb.2004.10.004.
- [26] Colinet D, Schmitz A, Depoix D, Crochard D, Poirié M. Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. *PLOS Pathogens* 2007;3:e203. doi:10.1371/journal.ppat.0030203.

- [27] Colinet D, Schmitz A, Cazes D, Gatti J-L, Poirié M. The origin of intraspecific variation of virulence in an eukaryotic immune suppressive parasite. *PLoS Pathogens* 2010;6:e1001206. doi:10.1371/journal.ppat.1001206.
- [28] Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen J-M, Poirié M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Dev Comp Immunol* 2009;33:681–9. doi:10.1016/j.dci.2008.11.013.
- [29] Goecks J, Mortimer NT, Mobley JA, Bowersock GJ, Taylor J, Schlenke TA. Integrative Approach Reveals Composition of Endoparasitoid Wasp Venoms. *PLoS ONE* 2013;8:e64125. doi:10.1371/journal.pone.0064125.s007.
- [30] Russo J, Brehélin M, Carton Y. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol* 2001;47:167–72.
- [31] Honti V, Kurucz E, Csordás G, Laurinyecz B, Márkus R, Andó I. In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett* 2009;126:–84. doi:10.1016/j.imlet.2009.08.004.
- [32] Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, et al. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:4805–9. doi:10.1073/pnas.0801766106.
- [33] Rizki MTM. Melanotic tumor formation in drosophila. *J Morphol* 1960;106:147–57. doi:10.1002/jmor.1051060203.
- [34] Luo H, Hanratty WP, Dearolf CR. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *Embo J* 1995;14:1412–20.
- [35] Dupas S, Poirie M, Frey F, Carton Y. Is parasitoid virulence against multiple hosts adaptive or constrained by phylogeny? A study of *Leptopilina* spp. (Hymenoptera: Figitidae)/*Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) interactions. *Annales De La Société Entomologique De France (NS): International Journal of Entomology* 2013;49:222–31. doi:10.1080/00379271.2013.815045.
- [36] Kacsoh BZ, Schlenke TA. High Hemocyte Load Is Associated with Increased Resistance against Parasitoids in *Drosophila suzukii*, a Relative of *D. melanogaster*. *PLoS ONE* 2012;7:e34721. doi:10.1371/journal.pone.0034721.g014.
- [37] Chabert S, Allemand R, Poyet M, Eslin P, Gibert P. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control* 2012;63:40–7. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.05.005.
- [38] Brehélin M. Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions. 1986.
- [39] Suzuki M, Tanaka T. Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. *J Insect Physiol* 2006;52:602–13. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.02.009.
- [40] Allemand R, Lemaitre C, Frey F, Boulétreau M, Vavre F, Nordlander G, et al. Phylogeny of six African *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. *Annales De La Société Entomologique De France* 2002;38:319–32.
- [41] Rizki RM, Rizki TM. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:6154–8.
- [42] Fauvarque MO, Williams MJ. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci* 2011;124:1373–82. doi:10.1242/jcs.064592.
- [43] Williams MJ, Andó I, Hultmark D. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells* 2005;10:813–23. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00883.x.
- [44] Sampson CJ, Valanne S, Fauvarque M-O, Hultmark D, Rämetsä M, Williams MJ. The RhoGEF Zizimin-related acts in the *Drosophila* cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Dev Comp Immunol* 2012;38:160–8. doi:10.1016/j.dci.2012.05.004.
- [45] Colinet D, Kremmer L, Lemauf S, Rebuf C, Gatti J-L, Poirié M. Development of RNAi in a *Drosophila* endoparasitoid wasp and demonstration of its efficiency in impairing venom protein production. *J Insect Physiol* 2014;63:56–61. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.02.011.
- [46] Ertürk A, Becker K, Jährling N, Mauch CP, Hojer CD, Egen JG, et al. Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 2012;7:1983–95. doi:10.1038/nprot.2012.119.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are grateful to C. Rebuf for technical help, Paola Sansigre for participation in preliminary experiments, Mrs C. Labrosse, S. Trassard and Mr P.Y. Sizaret (Université François Rabelais de Tours) for help on immunogold electron microscopy and D. Cazes for the LbGAPs recombinant protein production. Fluorescent *E. coli* were a gift from Mrs Nawrot-Esposito (BES team INRA-ISA). We acknowledge also the “Plate-Forme d'Infectiologie Expérimentale” (PFIE; INRA-Nouzilly) for the rabbit antibodies production and the “plateau de microscopy ISA”.

This work received support from the Department of Plant Health and Environment (SPE) from the French National Institute for Agricultural Research (INRA), the French National Research Agency through the PARATOXOSE project (ANR-09-BLAN-0243-01), the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028) and the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration, under grant agreement No 613678 (DROPSA). Wan B. PhD is funded by the DROPSA program.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT**

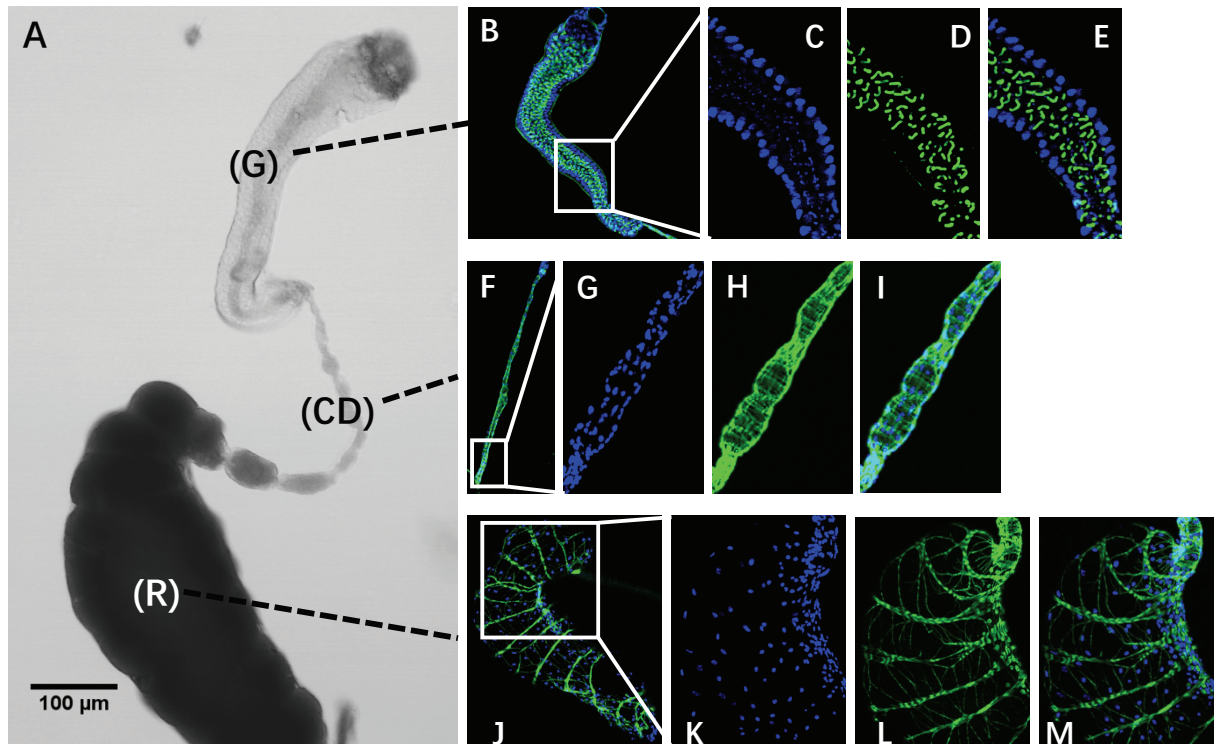
B.W. performed light and fluorescence microscopy, purifications, SDS-PAGE and Western blotting. M.R. and A.N.V performed transmission electron microscopy. O.P. setup the larvae clarification and help in confocal microscopy. E.G., D.C. and S.F. performed the encapsulation assay, the venosomes purification and labelling. B.W., J.-L.G. and M.P. wrote the manuscript. J.-L.G. and M.P. designed and coordinated the study. All authors read and approved the final manuscript.

## **COMPETING FINANCIAL INTERESTS**

**The authors declare no competing financial interests.**

## Article 1 : Figures 1-8

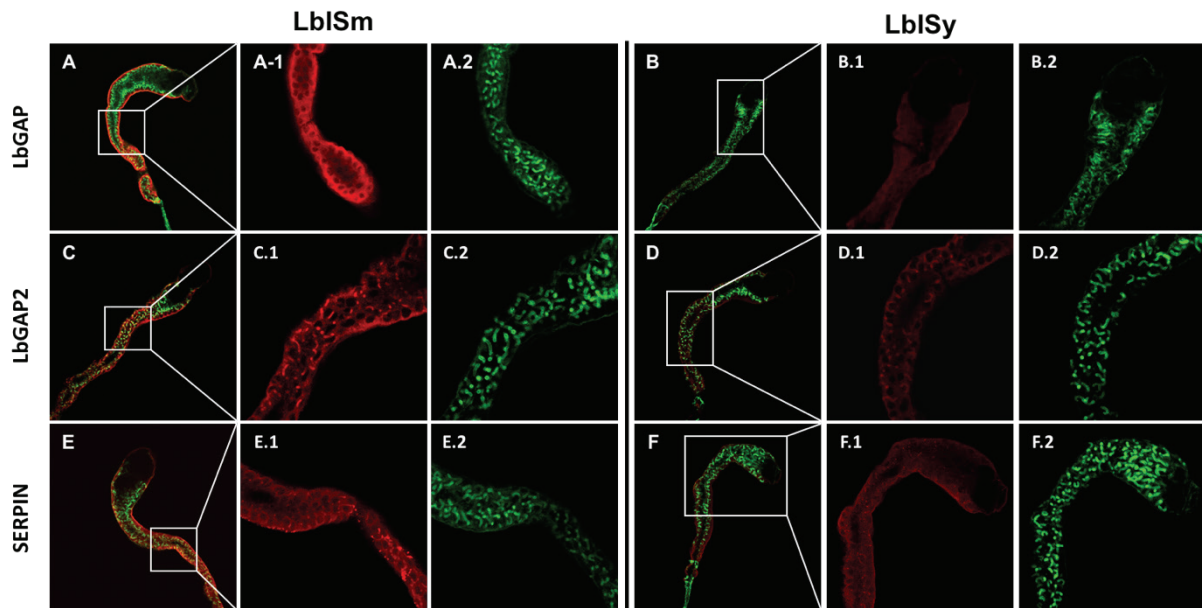
Wan et al., Figure 1



**Figure 1. Morphological observation of the venom apparatus of *Leptopilina bouvardi*.**

A, Light microscopy of *L. bouvardi* ISm female venom apparatus composed of a long unique gland (G) linked to a reservoir (R) by a connecting duct (CD); B-M, Fluorescence confocal microscopy of the gland (B-E), the connecting duct (F-I) and the reservoir (J-M). B, F, J are the merge images of whole organs showing actin (green) and cell nucleus (blue) labelled by phalloidine and DAPI, respectively. E, I, M are merged images from the enlarged regions of the gland, the connecting duct and the reservoir, respectively. C, D, E show the two cell layers and microvilli actin labelling in the secretory cell canal. G, H and I show the muscular bending pattern of the connecting duct. K, L and M show the cells scattered on the reservoir surface and the muscular cord delimiting each enlargement.

## Wan et al., Figure 2

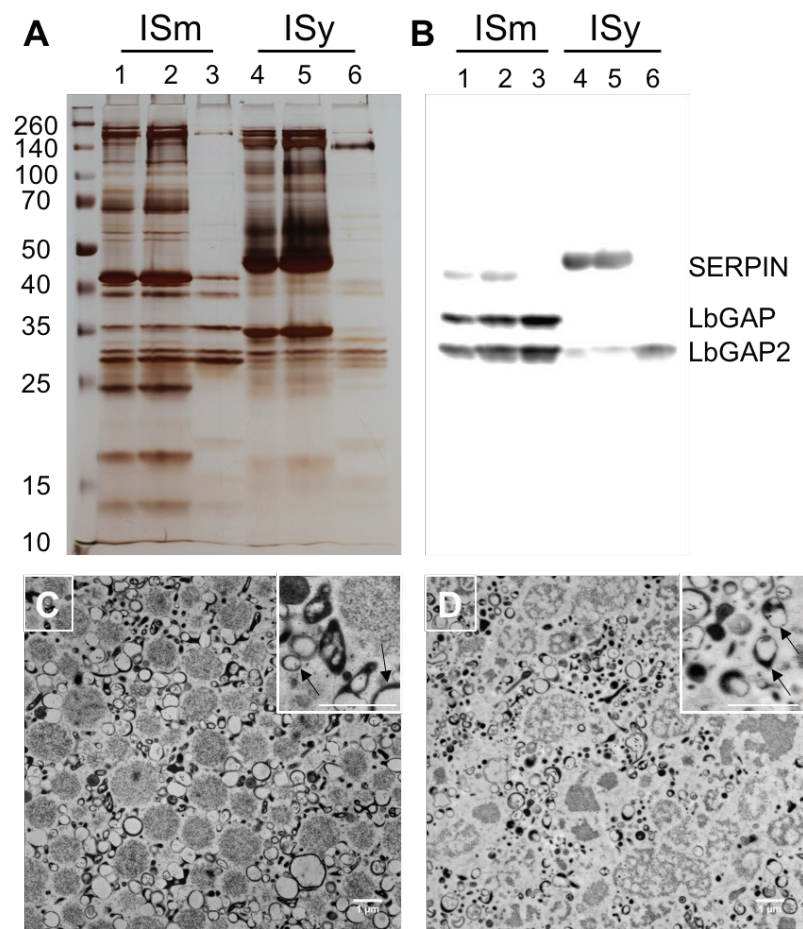


**Figure 2. Immunolocalisation of virulence factors all along the LbISm and LbISy venom gland.**

Immunolocalization by confocal microscopy of LbGAP (A and B), LbGAP2 (C and D) and LbSPN (E and F) in the LbISm (A, C and E) and LbISy (B, D and F) venom gland. Panels A to F show the merged picture obtained from the whole gland labelled in red for the indicated virulence factors and counterstained for actin with green phalloidin. Panels numbered 1 and 2 show an enlarged region of the gland for the virulence factor (red) and the actin (green) respectively. A strong labelling of the three virulence factors is observed in the cytoplasm of peripheral secretory cells of LbISm gland while the signal was fainter in LbISy but above those obtained with the preimmune and the secondary antibodies alone.



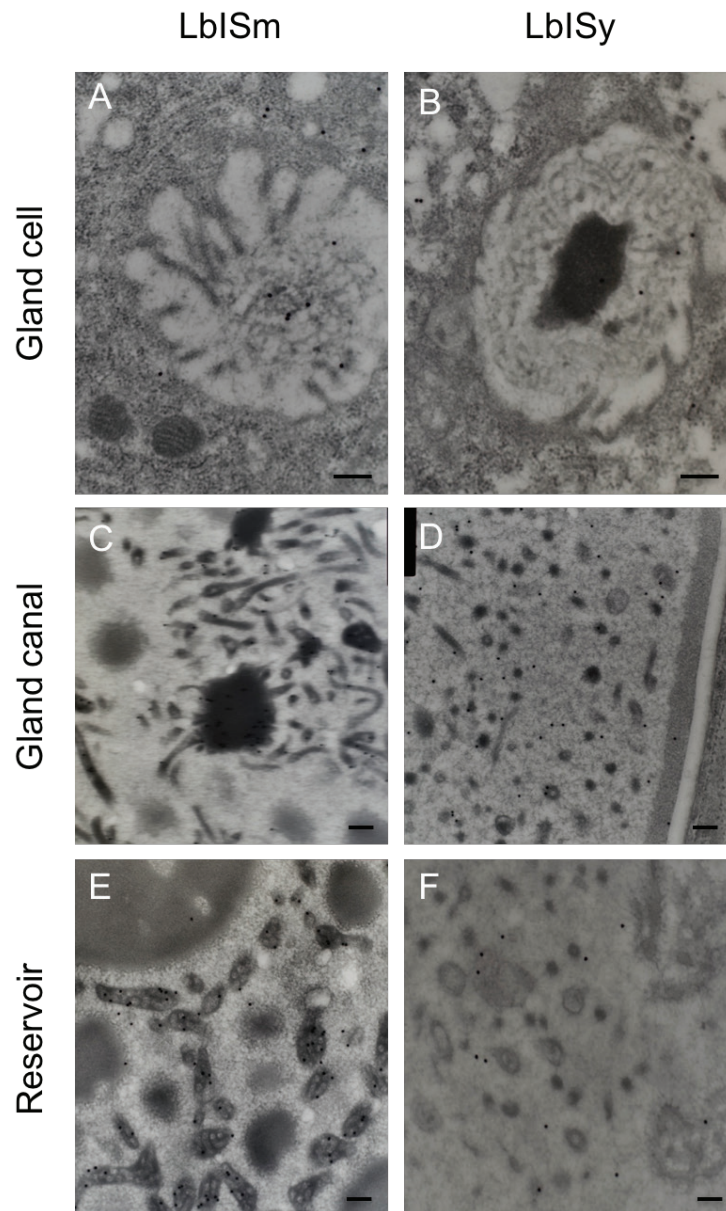
## Wan et al., Figure 3



**Figure 3: LbISm and LbISy 15,000g venosomes pellets are enriched in LbGAP and LbGAP2.**

A and B, Proteins in LbISm and LbISy crude venom (lanes 1 and 4), 15,000g supernatant (lanes 2, 5) and pellet (lanes 3 and 6) were separated by SDS-PAGE and visualized by silver-staining (A) or transferred and probed with the anti-LbGAP, LbGAP2 and LbSPN antibodies (B). In both cases, a strong decrease in the protein diversity is observed in the pellet and the LbGAP and LbGAP2 proteins are enriched while LbSPN remained in the supernatant. C and D, results of TEM on LbISm (C) and LbISy (D) 15,000g pellets showing different types of vesicles and aggregates including the previously described venosomes (see inserts). A large number of venosomes may have changed their shape (arrows in inserts) certainly due to osmotic effects during the fixation process. (bar 1  $\mu\text{m}$ )

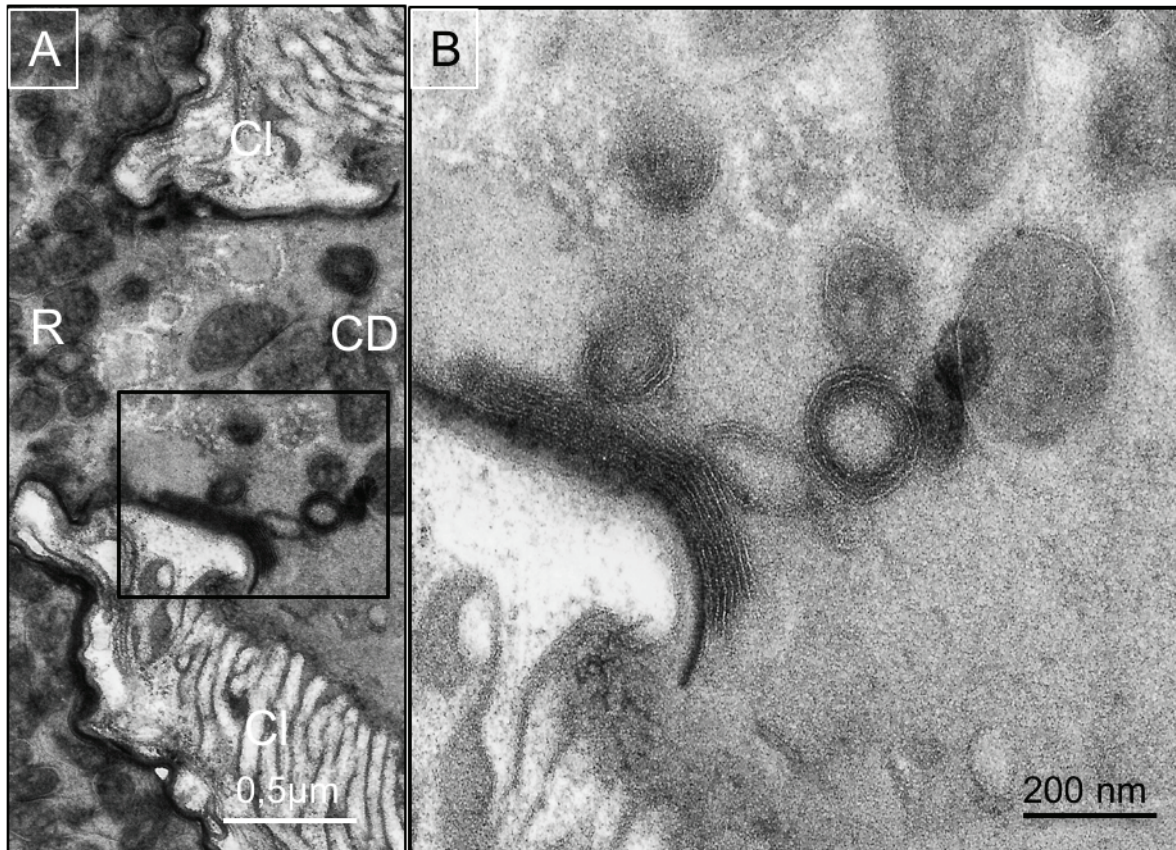
Wan et al., Figure 4



**Figure 4: Immunolocalisation of LbGAP during venosomes biogenesis.**

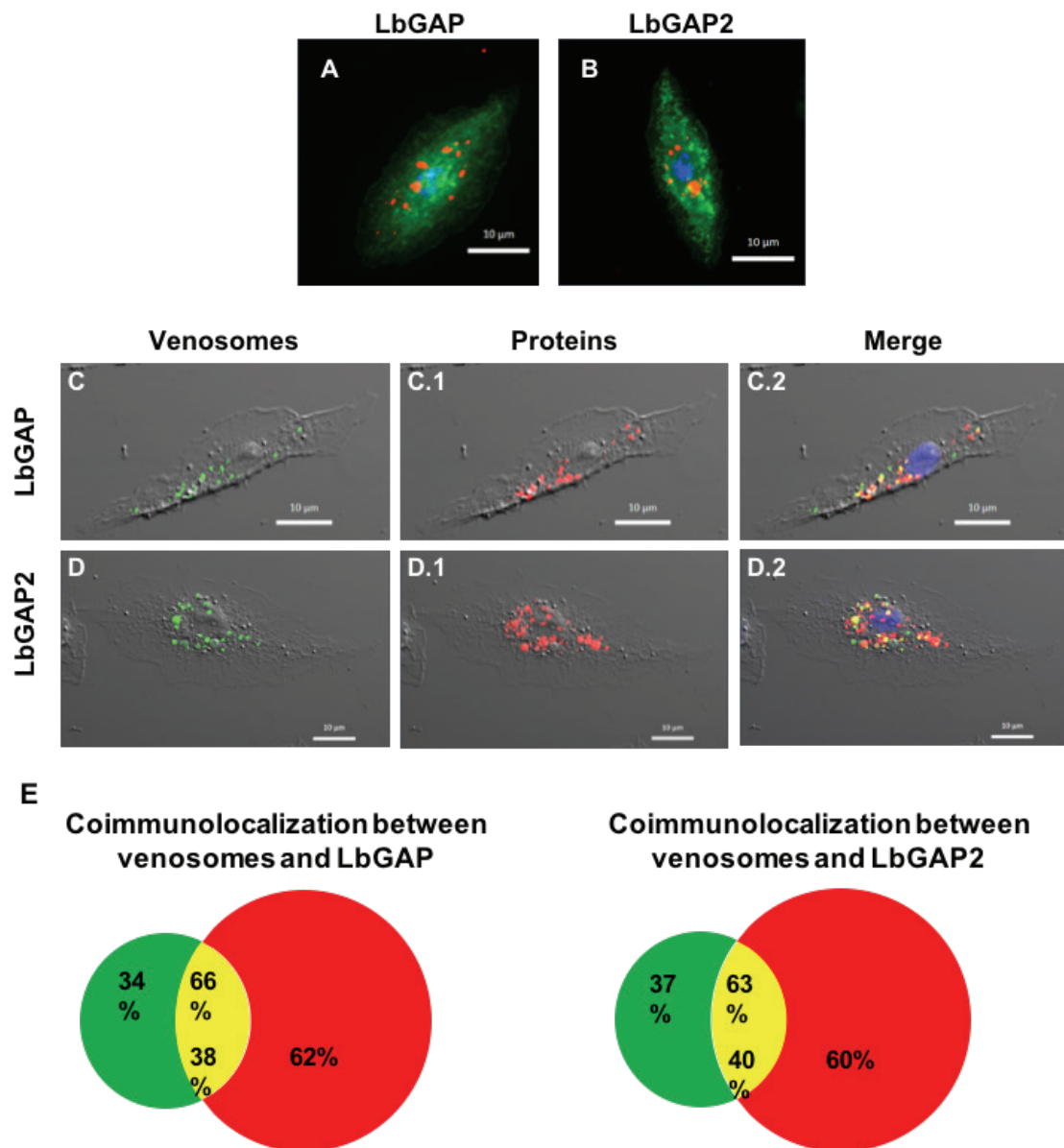
Immunogold-labelled TEM sections through the LbISm (left) and LbISy (right) long gland secreting cell (A, B), gland canal (C, D) and reservoir (E, F). LbGAP labelling (black dots) is visible on the anamorphous material present in the lumen of the canal within the gland secreting cell (A, B) and within the cell cytoplasm and some intracellular vesicles. In the gland collecting canal lumen (C, D), the labelling is mainly associated to the electron dense aggregates in LbISm while, in LbISy, it is scattered on fibrillary material and few is associated with the electron dense material. No fully formed venosomes are visible at this level. In LbISm reservoir (E), the gold labelling is almost all associated at the surface and within the venosomes but not with the large electron light vesicles/aggregates. The LbISy reservoir (F) contains much less venosomes with very few gold particles associated while the majority of the labelling is on the fibrillary material. No labelling was observed with the gold-linked secondary antibody. Bar 0.2  $\mu\text{m}$ .



**Wan et al., Figure 5****Figure 5: Extracellular venosomes membrane biogenesis.**

(A) TEM observation of a section through the junction between the connecting duct (CD) and the reservoir (R) and an enlargement (insert B) show clearly stacks of membrane sticking to the cuticular lumen side of cell layer (Cl) situated at the junction. Some “rolling” empty membranes detach from the stack to form multimembrane vesicular structures engulfing some of the material present in the lumen. Punctuated material can also be observed as well as formed venosomes that are in high amount in the reservoir (R).

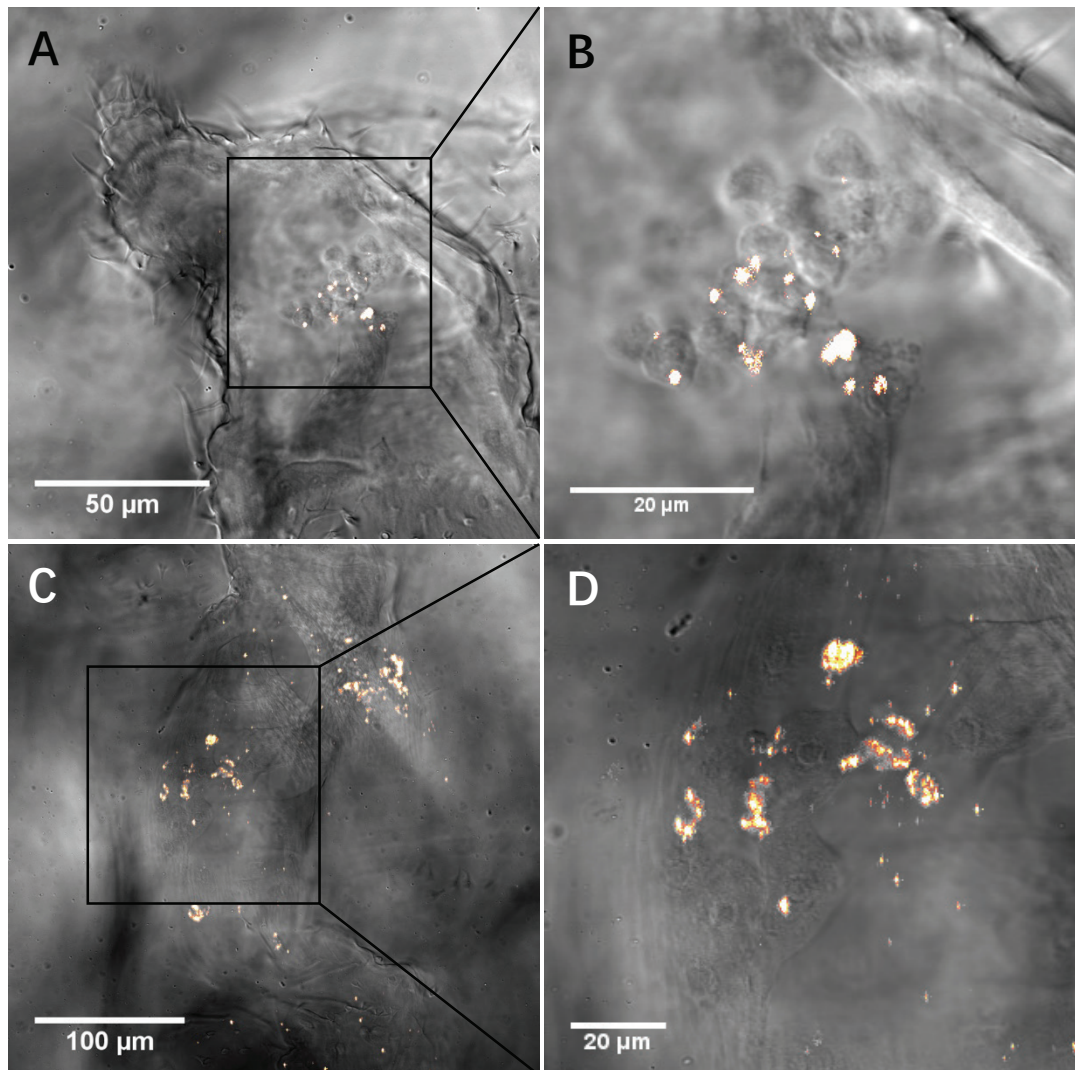
## Wan et al., Figure 6

**Figure 6: Venosomes coimmunolocalize with virulence factors in drosophila lamellocytes.**

Immunolocalisation of LbGAP (A) and LbGAP2 (B) by fluorescence microscopy (red spots) in the cytoplasm of bipolar modified lamellocytes of *Drosophila* YR larvae 14-18h after parasitism by LbISm females. Actin labelled with phalloidin (green) and nucleus with DAPI (blue). Confocal microscopy of lamellocytes 18h after injection in YR larvae with fluorescently labelled venosomes show an important co-immunolocalization with both LbGAP (panel C) and LbGAP2 (panel D): Green, fluorescent venosomes (C1, D1); Red fluorescence, proteins immunolocalization (LbGAP, C2; LbGAP2, D2); C3 and D3 merged images, yellow spots indicate co-immunolocalization. E, percent of colocalization between venosomes and LbGAP and venosomes and LbGAP2 is shown for LbISm (green, venosomes alone; red LbGAP or LbGAP2 alone; yellow, coimmunolocalization; percent expressed either on total venosomes spots (upper %) or total LbGAP or LbGAP2 spots (lower %)). Counted on 61 and 57 cells respectively in two separated experiments.



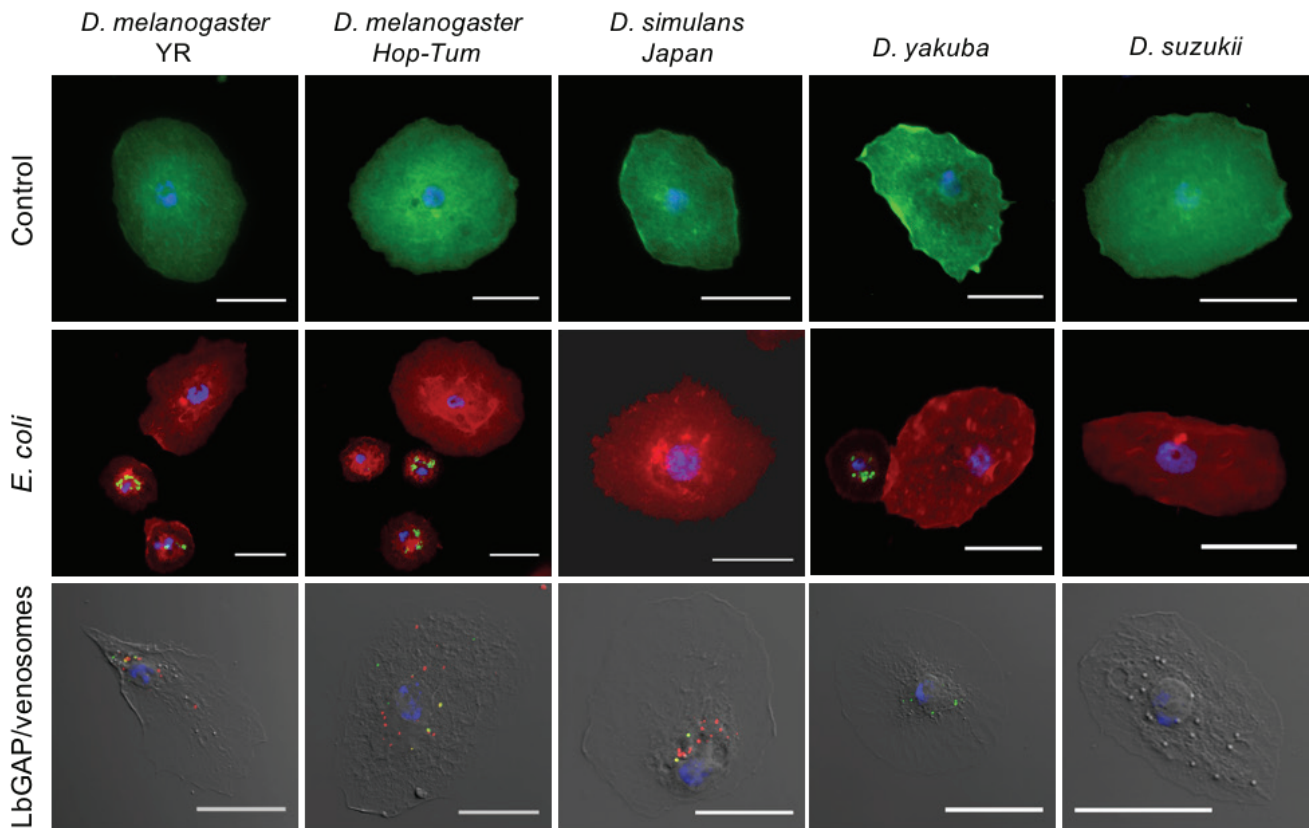
Wan et al., Figure 7



**Figure 7: Venosomes immunolocalization in sessile hemocytes of clarified *Drosophila* larvae.**

18h after injection of fluorescently labelled venosomes, YR larvae were fixed and treated to clarify their tissues. Confocal microscopy shows subcuticular patches of fluorescence in the head (A) and the back of the larvae (B). When enlarged (B, C) the fluorescently labelled venosomes are observed in small round cells of about 10 μm (A) and in large flat cells of 30-40 μm (B) representing certainly sessile plasmatocytes and lamellocytes respectively.

## Wan et al., Figure 8



**Figure 8: Species specific venosomes entry in lamellocytes.**

First row: Lamellocytes observed in hemolymph of *D. melanogaster* YR and Hop<sup>Tum-1</sup>, *D. simulans*, *D. yakuba* and *D. suzukii* (actin labelled with green fluorescent phalloidin, nucleus with DAPI in blue). Second row: Green fluorescent *E. coli* were not retrieved in lamellocytes indicating absence of phagocytosis while they can be seen in plasmatocytes (see also Suppl. Fig S4; actin labelled with red fluorescent phalloidin). Third row: Injected fluorescently labelled venosomes (green) and LbGAP (red) were observed and found to colocalized (yellow spots) in lamellocytes of *D. melanogaster* YR and Hop<sup>Tum-1</sup> and *D. simulans*, and in a very low number of *D. suzukii* lamellocytes (see also Fig. S6). Only labelled venosomes were observed in *D. yakuba* lamellocytes.

## Article 1 : Table 1

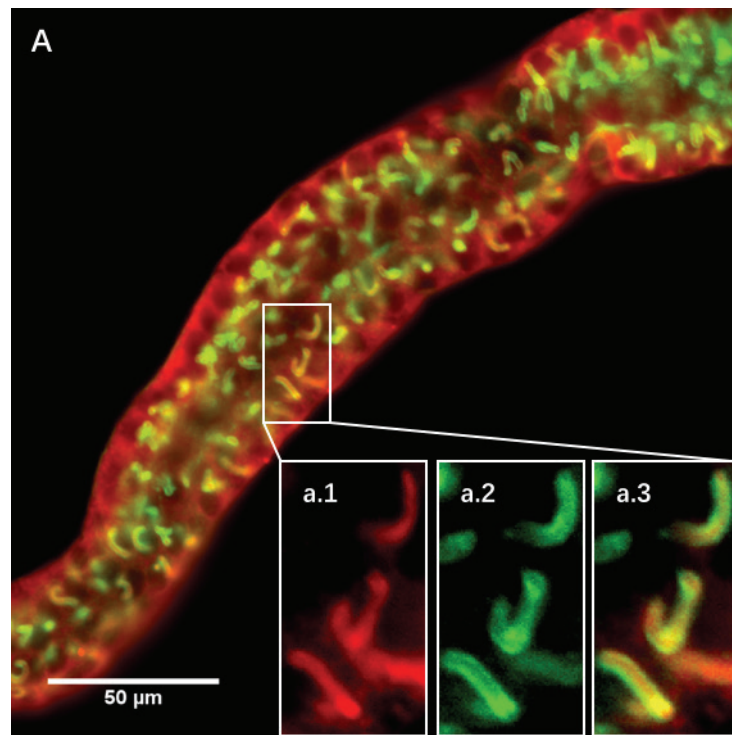
**Table 1: Parasitism success or failure**

	Parasitism success (Free parasitoid larvae)	Parasitism failure (Encapsulated parasitoid eggs)
LbISm parasitism	100%	0%
LbISy parasitism	6%	94%
LbISm crude venom injection	60%	40%
LbISm supernatant injection	2%	98%
LbISm pellet injection	76%	24%
Ringer injection	6%	94%
Rec. LbGAP injection	13%	87%
BSA injection	18%	82%

## Article 1 : Supplementary Materials (Figure S1-S6)

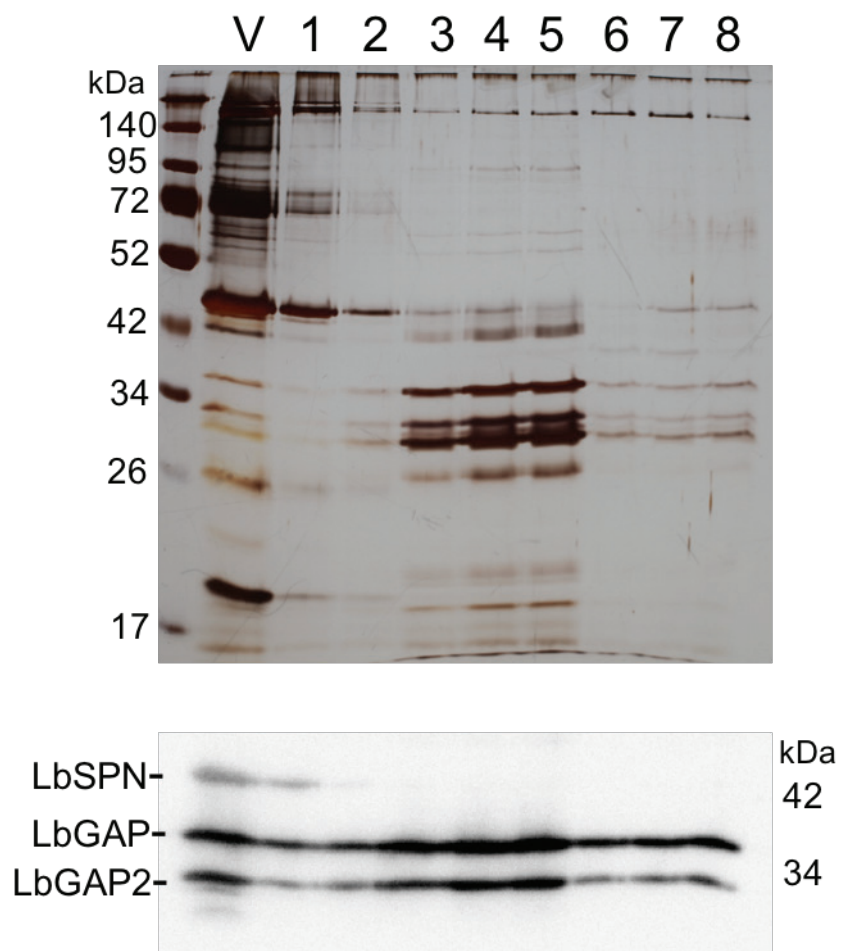
### Figure S1: Immunolocalization by confocal microscopy of LbGAP2 in LbISM venom gland.

Panel A shows the merged picture obtained from the gland labelled in red for LbGAP2 and counterstained for actin with green phalloidin. Panels a1, a2 and a3 show an enlarged region corresponding to the microvilli region of the secreting canal from the gland cell: LbGAP (a1, red) and actin (a2, green) show a strong coimmunolocalization on the merged picture (a3, yellow).



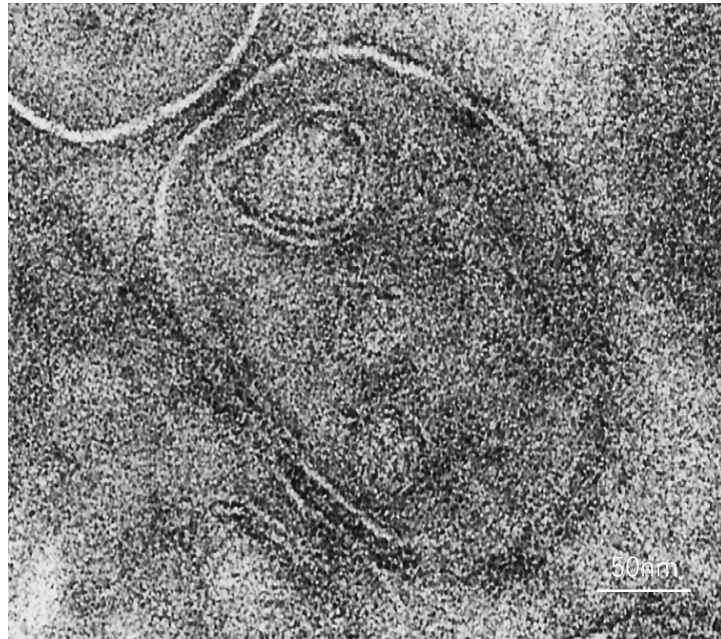
**Figure S2: LbIsm venosomes separation on Nicodenz® gradient.**

Upper panel: Crude LbIsm venom (V) was separated by ultracentrifugation on a Nicodenz® gradient and each recovered fractions (1 top to 8 bottom) were separated on a 12% SDS-PAGE. The venosomes migrated on fractions 3 to 5 where the ~30 kDa LbGAP and LbGAP2 were enriched but not LbSPN (~45 kDa). Lower panel: Western blot analysis with the anti-LbSPN, anti-LbGAP and anti-LbGAP2 antibodies.

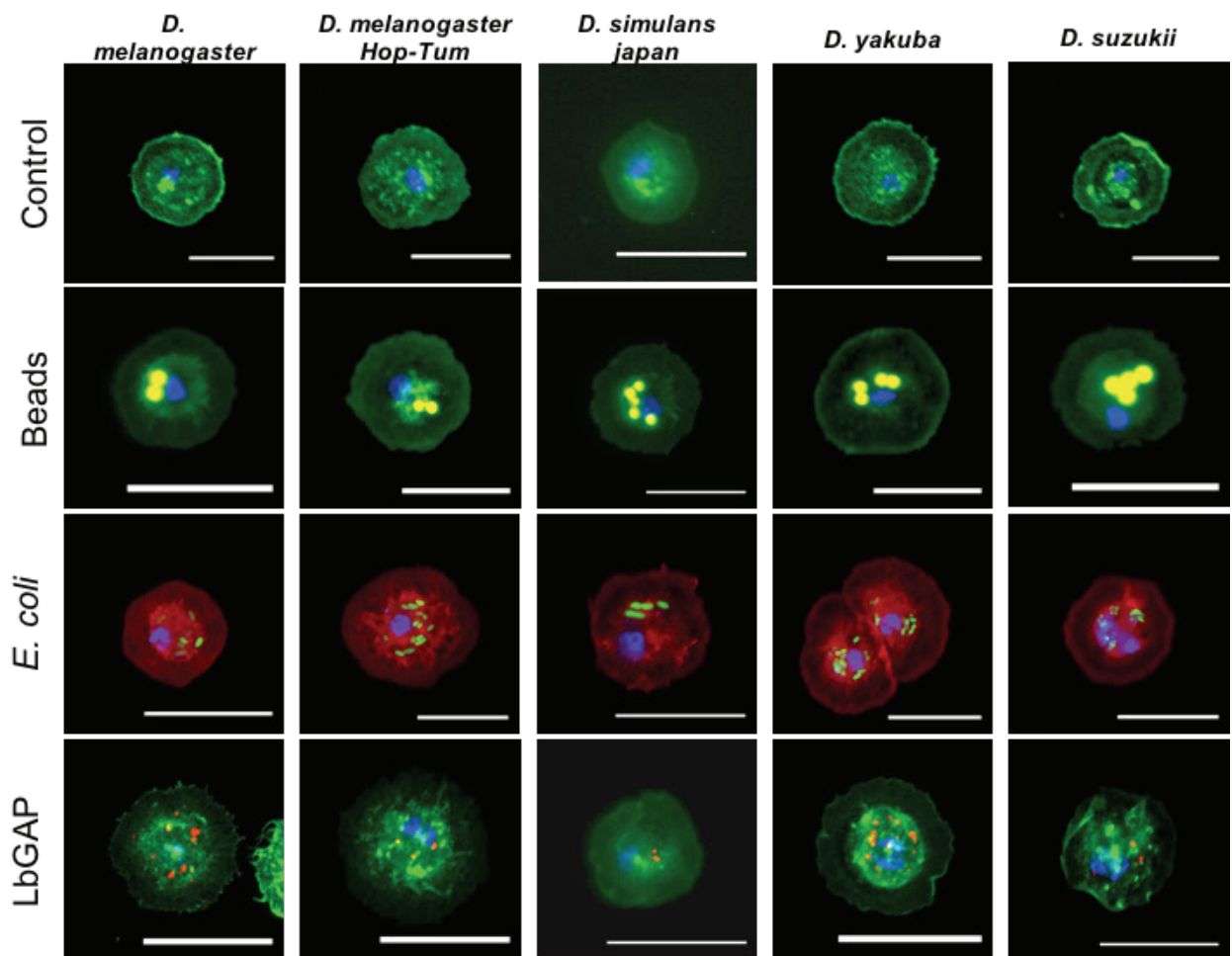




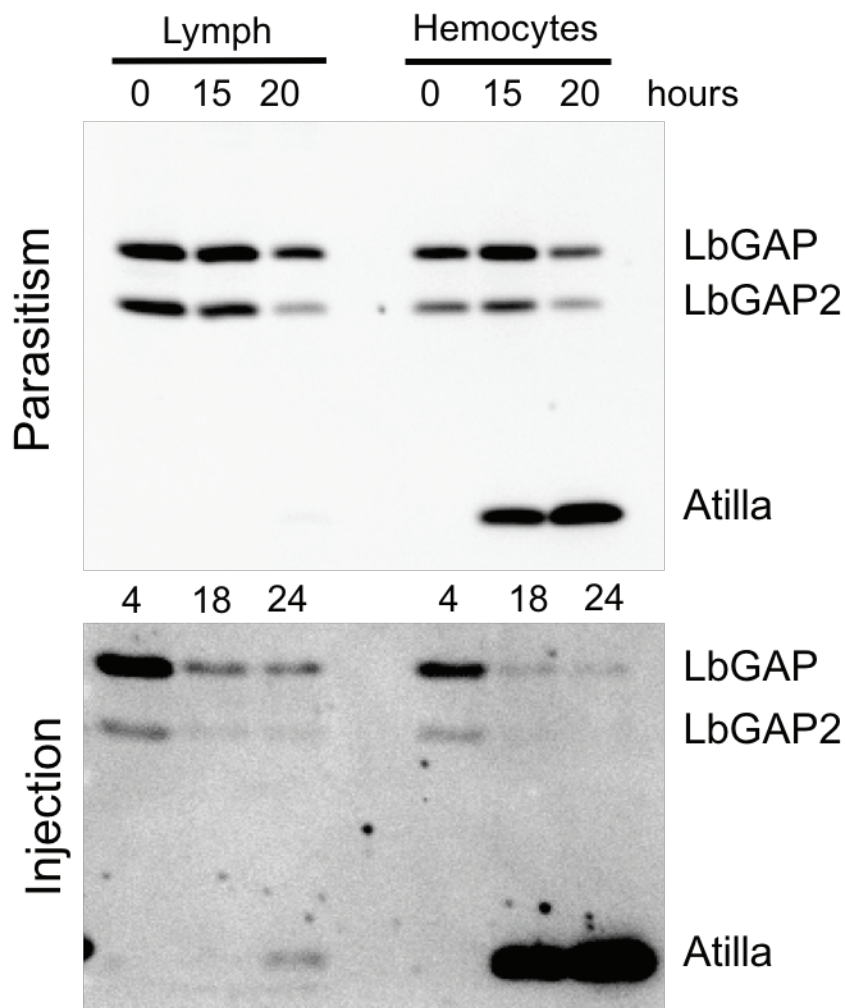
**Figure S3: LbSIIm venosome.** TEM image of a mature venosome in the wasp reservoir showing the surrounding membrane and membranes within the venosomes responsible of the punctuated appearance. The upper intravesicular vesicle showed a partial double or overlapped membrane.



**Figure S4: Phagocytic properties of plasmatocytes from different drosophila species.** First row: plasmatocytes observed in hemolymph of 18h parasitized *D. melanogaster* YR and Hop<sup>Tum-1</sup>, *D. simulans* Japan, *D. yakuba* and *D. sukukii*. Plasmatocytes were observed 4 hours after Injection of 18h parasitized L2 larvae with fluorescent latex beads (Second row), green fluorescent *E. coli* (third row) and venosomes (fourth row) to show their phagocytic properties. Actin labelled with green (rows 1, 2 and 4) or red (row 3) fluorescent phalloidin, in blue nucleus stained with DAPI. Row 4, phagocytosed LbGAP immunolocalized in red.

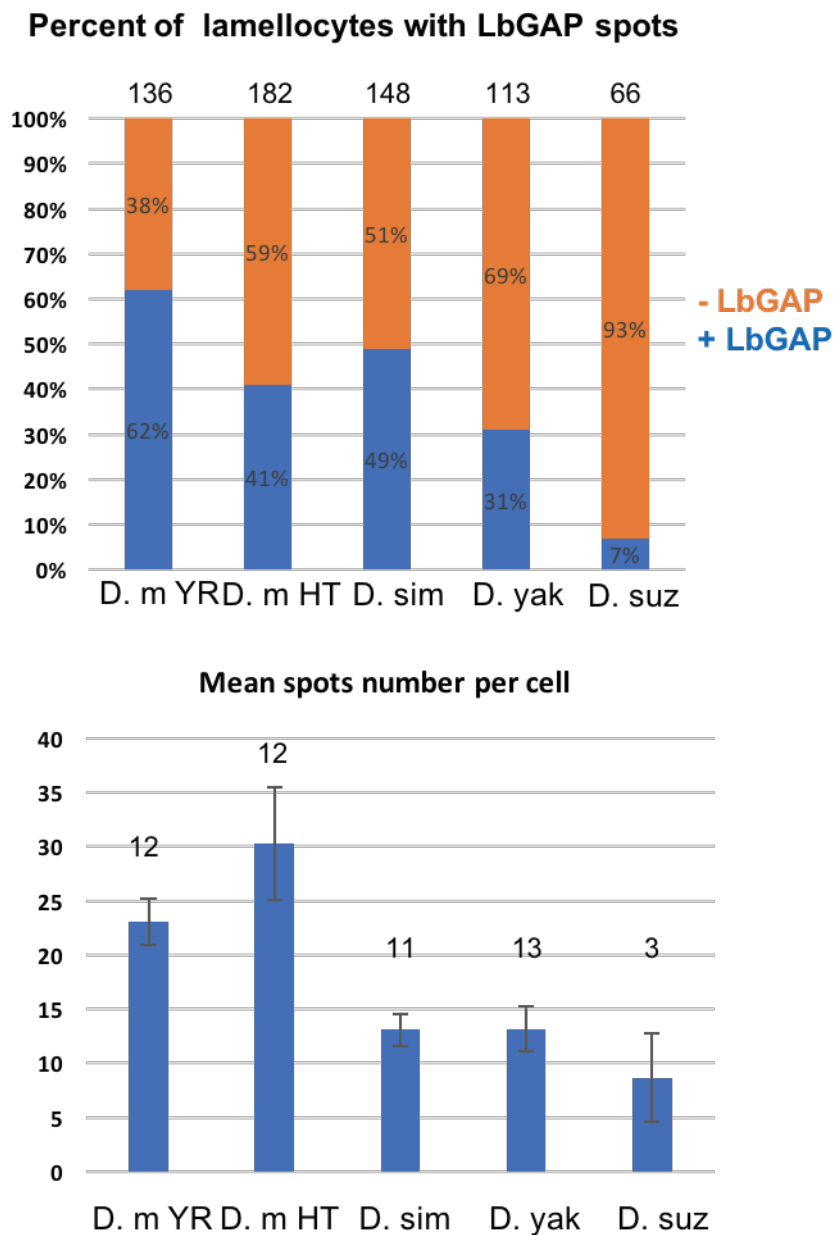


**Figure S5: Persistence of virulence factors in hemolymph and hemocytes.** Upper panel: *D. melanogaster* YR larvae hemolymph was collected at 0, 15 and 20h after the end of parasitism assay by LbISm female and the hemocytes separated by centrifugation. The cell free hemolymph (Lymph) and washed hemocytes pellets (hemocytes) were separated on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and probed with the anti-LbGAP, anti-LbGAP2 and anti-Atilla (a lamellocyte marker) antibodies. At all times LbGAP and LbGAP2 were present in clear hemolymph and cells pellets while lamellocytes increased strongly after 15h as shown by the Atilla reaction. Lower panel: the same experiment was done 4, 18 and 24h after purified venosomes injection. Although the amount of circulating and cellular LbGAP and LbGAP2 were lower at 18 and 24h they were still present. Increase in Atilla at 18h in cells pellets indicated that injection initiated also the lamellocytes increase response.



**Figure S6: LbGAP entry in lamellocytes of the different *Drosophila*.** Upper panel: 18h after parasitism by LbISm females the number of immunoreactives lamellocytes (cells with size  $\sim 30 \mu\text{m}$ ) in *Drosophila melanogaster* YR (D.m YR) and Hop<sup>Tum-1</sup> (D.m HT), *D. simulans* (D. sim), *D. yakuba* (D. yak) and *D. sukuzii* (D. suz) were counted. On the top of the column the total number of counted lamellocytes (note that *D. sukuzii* had a lower number of lamellocytes compared to the other species). Results from at least two experiments.

Lower panel: number of LbGAP immunoreactive spots in the most reactive lamellocytes of the different species excepted for *D. sukuzii* were all reactive lamellocytes were counted (number of lamellocytes indicated above the columns). Mean  $\pm$  sem.



## Discussion de l'article 1

Dans ce premier travail, j'ai décrit la biogénèse particulière des vénosomes de *L. bouvardi* et montré que la différence quantitative observée entre les souches virulente (ISm) et avirulente (ISy) provient d'une faible production et sécrétion de matériel précurseur au niveau des cellules de la glande. Le matériel sécrété chez ISm semble former des agrégats au fur et à mesure qu'il se déplace le long de la glande. Une partie des agrégats semble être emballée par des membranes au niveau de la jonction entre le canal et le réservoir où se forment les vénosomes matures qui sont ensuite stockés. Ce mécanisme original de formation de vésicules de façon extracellulaire n'a pas d'équivalent connu à ce jour et doit donc être confirmé par une étude plus approfondie.

Le matériel agrégé contient un des facteurs sécrétés par la glande à venin, LbGAP, qui est retrouvé au niveau des vénosomes. Une autre RhoGAP, LbGAP2 ainsi que la serpine LbSPN sont aussi sécrétées tout le long de la glande, seules LbGAP et LbGAP2 étant cependant retrouvées associées aux vénosomes. Il y a donc une sélection des facteurs qui sont « emballés » dans les vésicules avant leur arrivée dans le réservoir. LbGAP est sécrétée en beaucoup plus faible quantité chez ISy où il n'y a pas non plus d'agrégats immunoréactifs dans la glande et comme dit précédemment beaucoup moins de vésicules formées au niveau du réservoir. Ceci suggère une relation entre la formation d'agrégats et LbGAP, et peut être LbGAP2 et les autres RhoGAPs associées (toutes les autres RhoGAP présentes dans le venin sont retrouvées dans la fraction vénosomes par spectrométrie de masse ; résultats de l'équipe non-publiés). Les RhoGAPs en s'agréant formeraient une matrice reconnue par les membranes conduisant à la formation des vénosomes, ceci permettant d'atteindre des concentrations très élevées de ces facteurs dans ces vésicules. Les protéines solubles, comme la serpine sont soit i) non reconnues par le mécanisme d'emballage soit ii) ne peuvent être qu'en très faible quantité dans les vénosomes.

Ce travail démontre aussi clairement pour la première fois que les vénosomes sont le facteur de virulence que *L. bouvardi* ISm utilise pour bloquer la réponse d'encapsulation par les lamellocytes de *D. melanogaster*. L'absence de vénosomes chez ISy expliquant en partie son échec chez *D. melanogaster* (vis à vis de la souche résistante) puisque les vénosomes purifiés de ISm sont efficaces pour protéger l'œuf d'ISy de l'encapsulation. Les vénosomes sont retrouvés avec les facteurs qu'ils transportent au niveau des lamellocytes et produisent le changement de forme qui semble primordial pour les empêcher de fonctionner.

Comment et où agissent les facteurs une fois délivrés reste encore hypothétique, toutefois une action sur le cytosquelette des lamellocytes est évidente. Les RhoGAPs peuvent agir via les RacGTPases Rac1 ou Rac2 dont on sait qu'elles sont importantes dans la régulation du cytosquelette et aussi pour l'encapsulement, mais ceci semble vrai uniquement pour LbGAP, les autres RhoGTPases venimeuses étant porteuses de mutations soit au niveau du site actif soit au niveau du site de liaison. Le rôle de l'ensemble des RhoGAP transportées reste donc à explorer. J'ai aussi mis en évidence une corrélation entre l'entrée des vénosomes dans les lamellocytes et la réussite parasitaire sur différentes espèces de drosophiles.

**Les vénosomes servent donc de système transport spécifique pour des facteurs venimeux produits chez la guêpe pour cibler les lamellocytes de l'hôte et ils participent ainsi à sa réussite parasitaire. Les lamellocytes de toutes les espèces de drosophiles ne sont pas « réceptifs » aux vénosomes, indiquant un niveau supplémentaire dans la spécificité d'espèce du parasitoïde.**

Comme attendu, les lamellocytes ne sont phagocytaires dans aucune des espèces utilisées ce qui exclut ce mécanisme pour l'internalisation des vénosomes. Il y a donc un autre mécanisme impliqué. De plus, l'entrée est dépendante de l'espèce, suggérant la présence d'un mécanisme de reconnaissance spécifique au niveau de la membrane des lamellocytes ou d'internalisation spécifiques ou qui serait plus fortement « exprimé » chez *D. melanogaster* par rapport aux autres espèces. Les voies d'internalisation des lamellocytes et à fortiori ceux de l'entrée des vénosomes n'ont pas été étudiés jusqu'à présent et il existe peu d'information directe sur les récepteurs /protéines présentes à la surface de ces cellules. Ces deux points seront explorés dans les travaux suivants de ma thèse.

J'ai tout d'abord cherché par quel mécanisme se ferait l'internalisation des vénosomes en capitalisant sur les techniques acquises au cours de ce premier travail (Publication 2).

J'ai en parallèle, en utilisant la surproduction basale de lamellocytes de la souche Hop<sup>Tum-1</sup>, développé une méthode d'enrichissement de ces cellules afin de débiter par une approche protéomique le catalogage de leurs protéines membranaires dans l'idée de trouver des récepteurs potentiellement impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation (Publication 3).

**Partie 4 : Article 2**  
***Drosophila melanogaster* lamellocytes**  
**uptake parasitoid venosomes by a**  
**flotillin/lipid raft**  
**dependent endocytic pathway**

En préparation



## Introduction

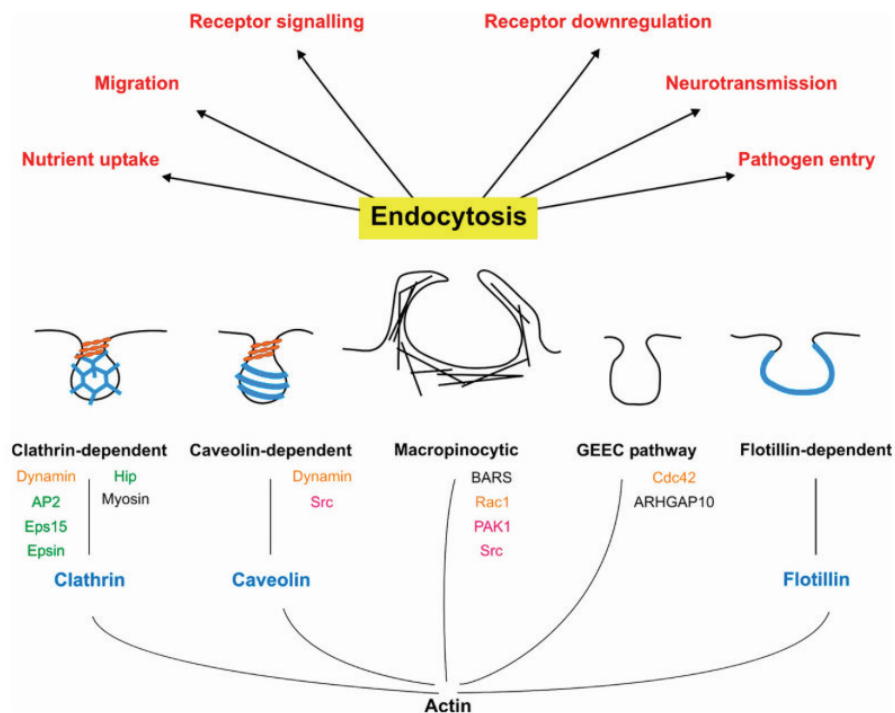
Dans le chapitre précédent, j'ai observé que les vénosomes pénètrent intégralement dans les lamellocytes pour y délivrer leur contenu. Il n'y a pas d'étude à ma connaissance sur les mécanismes d'internalisation présents dans ces cellules. Je commencerais donc cette introduction par un court rappel sur les voies d'endocytoses cellulaires connues. Je ne reviendrais pas sur la phagocytose qui a été traitée brièvement précédemment (Cf. Informations supplémentaires 2) et qui semble absente des lamellocytes (Cf. Article 1).

### Les mécanismes d'endocytoses

L'endocytose décrit la production *de novo* de vésicules ou de tubes intracellulaires à partir de la bicouche lipidique de la membrane plasmique cellulaire (Figure 32). Ce faisant, les lipides et les protéines intégrales de la membrane plasmique et le milieu extracellulaire sont internalisés. Ce mécanisme est commun à toutes les cellules eucaryotes. L'endocytose est le principal moyen pour les cellules d'interagir avec leur environnement et incorporer des éléments nutritifs ou des macromolécules qui se lient à des récepteurs présents sur la membrane plasmique. L'endocytose est constitutive et peut être déclenchée par la liaison des ligands à leurs récepteurs. Ces complexes récepteurs-ligands et le milieu externe endocytosé sont alors transportés au travers d'une série de compartiments vésiculaires internes (endosomes) qui ont différents destins (Cf. plus loin). En internalisant certains des complexes récepteurs-ligands qui induisent des signaux intracellulaires, l'endocytose limite leur action, ajuste la quantité de récepteur disponible et permet leur recyclage, leur activation ou leur élimination. Elle participe aussi aux fonctions de la membrane plasmique dans les interactions cellule-cellule ou aux déplacements cellulaires en contrôlant les phospholipides membranaires, les intégrines et certaines molécules d'adhésion. C'est le cycle d'endocytose et d'exocytose (qui peut être considéré comme le contraire morphologique de l'endocytose, c'est à dire la fusion de vésicules internes avec la membrane plasmique) qui permet de réguler avec précision les interactions entre la cellule et son environnement. De plus, les pathogènes, comme les bactéries et les virus, exploitent les voies endocytaires pour médier leur internalisation dans les cellules [304–307].

Au cours de ces dernières années, les très nombreuses études sur le sujet ont amené à abandonner l'idée d'un mécanisme simple et universel d'internalisation / trafic en faveur de la notion de voies d'entrée multiples et interconnectées qui coexistent dans le même type de cellule et sont plus ou

moins sélectives de différents types de cargaison (Figure 32). Ces études s'appuient sur des preuves ultrastructurales, l'analyse de l'absorption de différents cargaisons et l'utilisation d'inhibiteurs. Elles ont montré aussi que de nombreux attributs du système, comme les déterminants moléculaires, la spécificité de la cargaison et les besoins en lipides, dépendent du contexte cellulaire (pour revues [306,308–310]).



**Figure 32: Les différents types d'endocytose.**

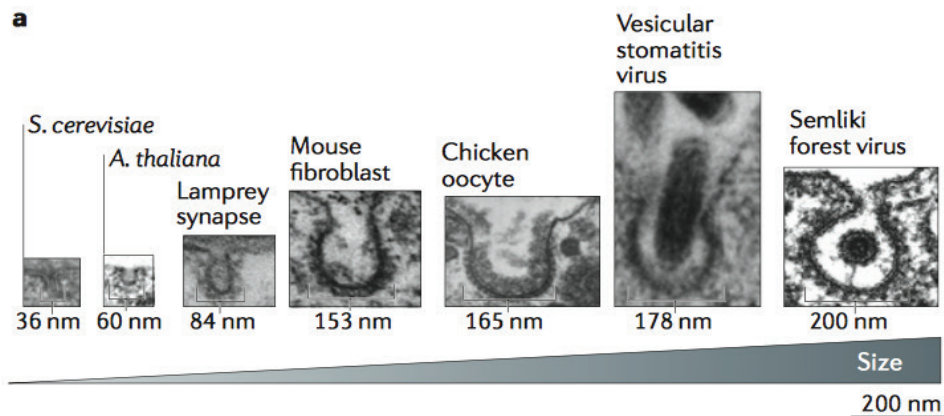
Les principales protéines impliquées sont codées en couleurs suivant leur fonction : bleu, rôle dans la structure (coat proteins) ; rouge, kinases ; orange, GTPases ; vert, molécules adaptatrices ; noir, autres fonctions. Les différentes fonctions de l'endocytose sont indiquées en rouge au-dessus (flèches). (d'après [309])

L'endocytose dépendante de la clathrine (CME)

La voie majeure d'internalisation des protéines membranaires est la voie dite dépendante de la clathrine (CME, clathrin-mediated endocytosis) [306,311] qui passe par des structures spécialisées de la membrane plasmique appelées puits recouverts de clathrine (CCP, clathrin coated pits). Ces structures débutent à la surface interne de la membrane par la présence d'une invagination (pits) enrichie en complexe AP-2 (assembly polypeptide 2 complex) certainement par reconnaissance de motifs sur des récepteurs. Ces zones membranaires de nucléation sont riches en Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) et contiennent certains types de protéines (ex. EGFR pathway substrate 15 (Eps15), Intersectines). AP-2 participe à la sélection des

molécules à internaliser (cargos) et recrute et contrôle la polymérisation de la clathrine. Les cargos s'accumulent dans les CCP qui grossissent et d'autres protéines interviennent pour courber la membrane et/ou stabiliser la vésicule en liaison avec la clathrine et AP2, comme les protéines contenant des domaines N-BAR et BAR (Bin/amphiphysin/Rvs), telles que SNX9 (Sorting nexin 9) et l'amphiphysine, les Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) et Hip1-related protein (Hip1R), ou pour participer à la structure comme la protéine Eps15. Les protéines de la famille Epsin peuvent également lier les cargos à la clathrine et les lipides pour aider à la courbure de la membrane lors de la formation du CCP. Le cytosquelette d'actine et ses régulateurs (Arp2/3, myosin, cofilin, calmoduline, RhoGTPases etc.) [312] participent aussi à la formation de la vésicule. La déformation de la membrane et la polymérisation de la clathrine conduisent à l'individualisation de la vésicule qui ne reste attachée à la membrane que par un pied étroit. Le détachement nécessite l'action de la dynamine GTPase. Une fois la vésicule libre, l'échafaudage de clathrine est démonté par la hsc70 et son cofacteur l'auxiline (ou la kinase associée à la cycline G (GAK) dans les tissus non neuronaux). L'ensemble de ces interactions est contrôlé via de nombreux facteurs à travers des cycles de phosphorylation / déphosphorylation orchestrés par différentes kinases [312]. La vésicule dénudée est dirigée dans la cellule vers le compartiment de destination où, par fusion, elle délivre sa cargaison (Cf. plus loin).

Il est maintenant montré que différents types d'adaptateurs distincts et de protéines accessoires contrôlent l'internalisation de cargaisons distinctes, formant ensuite différents sous-types de CCV impliquant des protéines spécialisées différentes pour les assembler. Par exemple, ARH (autosomal recessive hypercholesterolaemia) est un adaptateur spécifique pour les récepteurs de lipoprotéines de basse densité (LDLR), Numb lie Notch, Stonin lie la Synaptotagmin17, HRB (Arf-GAP domain and FG repeats-containing protein 1) lie les protéines SNARE19, et  $\beta$ -arrestin et Disheveled lient les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs). La plupart de ces protéines adaptatives se lient à AP2. Les différents types de vésicules formées sont aussi caractérisés par des temps de formation et d'internalisation variable allant de la seconde à la minute. La taille finale des vésicules est variable mais normalement n'excède pas 200 nm (Figure 33), ce qui classe la CME dans la micropinocytose. Les mutations de la clathrine dans les organismes unicellulaires, comme les protozoaires et les amibes, bloquent l'entrée des protéines à ancre GPI, le renouvellement global de la membrane plasmique ainsi que l'absorption de la phase liquide, mais ce n'est pas le cas dans les organismes supérieurs où ces processus passent par des voies indépendantes de la clathrine.



**Figure 33: Variations entre espèces et fonctions physiologiques de l'endocytose clathrine-dépendante.** Micrographies électroniques de puits de clathrine dans divers organismes et avec des cargaisons de tailles diverses. Les levures (par exemple, *S. cerevisiae*) et les plantes (par exemple *Arabidopsis thaliana*) ont les plus petits puits de clathrine. Au sein de la même espèce, les puits de clathrine sont plus petits au niveau des synapses neuronales que dans les fibroblastes. Les virus peuvent utiliser la CME pour pénétrer dans les cellules. (D'après [306]).

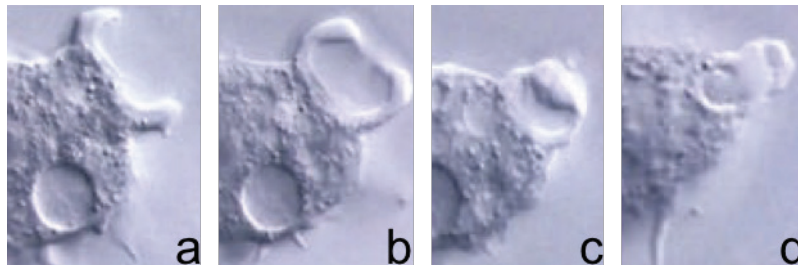
### L'endocytose indépendante de la clathrine (EIC)

Il existe plusieurs types de voies d'endocytose indépendante de la clathrine faisant appel à différents mécanismes et transportant des cargos de diverses natures (Figure 32). Un système de classification simple pour les EICs est leur dépendance vis à vis de la dynamine pour leur décrochage des vésicules de la membrane : il y a celles qui utilisent la dynamine (dynamine dépendantes) et celles qui nécessitent d'autres machineries (dynamine indépendantes). Une autre division est la présence ou l'absence d'un manteau qui marque la vésicule internalisée et, dans celles qui n'ont pas de manteau défini, ce sont les petites GTPases qui régulent l'actine qui sont souvent impliquées dans la médiation EIC (Figure 32). Étant donné que les cargaisons entrant dans les cellules par EIC n'ont pas de séquences de tri endocytaires spécifiques, cette voie est souvent décrite comme un processus peu spécifique (bulk endocytic process).

#### *La macropinocytose*

Dans des conditions normales, la macropinocytose est définie comme « un processus endocytairé actine-dépendant induit transitoirement, qui conduit à l'internalisation du milieu externe et des membranes pour former de grandes vacuoles intracellulaires. Ces vacuoles, de diamètre variable, peuvent atteindre jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  et sont appelés macropinosomes. La macropinocytose peut être induite par divers facteurs, comme les facteurs de croissance (EGF), certains peptides, la Phosphatidylserine (PS) provenant de cellules nécrotiques et les virus.

Lors de la macropinocytose sous l'action d'une augmentation locale de la polymérisation de l'actine, la membrane cellulaire produit de longues protrusions (ruffles) (Figure 34). Ces protrusions peuvent retourner à la surface cellulaire et disparaître ou elles peuvent se replier et fusionner entre elles ou directement avec la membrane plasmique pour former des macropinosomes englobant un large volume de milieu (Figure 34). Les macropinosomes intériorisent de larges zones de la membrane cellulaire ce qui fait que leur composition diffère peu de celle-ci ; cependant, un enrichissement en marqueurs des radeaux lipidiques (raft), peut s'observer dans les protrusions naissantes suggérant qu'elles débutent à partir de ces zones membranaires.



**Figure 34: Macropinocytose.**

Photographies séquentielles de la formation d'un macropinosome. Des protrusions se forment à la périphérie de la cellule (a), s'expandent vers l'extérieur (b), se rejoignent et forment le macropinosome dont la taille dépasse ici 10  $\mu\text{m}$  de diamètre (c). Celui-ci est ensuite internalisé (d). (Auteur inconnu).

Les facteurs régulateurs de la macropinocytose incluent différents acteurs de la polymérisation et de la fonction de l'actine comme PAK-1, Arf6 et les GTPases de la famille Rho, Rac1 et Cdc42. Le pH intracellulaire semble aussi jouer un rôle important, l'inhibition des canaux  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  par l'ouabaïne augmentant le pH et bloquant la formation des protrusions en inhibant Rac1 et Cdc42. Le destin des macropinosomes diffère selon le type cellulaire, mais dans la majorité des cellules, les macropinosomes mûrissent de façon parallèle aux endosomes classiques (Cf. plus loin). Ils commencent par s'acidifier, se réduisent et acquièrent les marqueurs endosomes précoces comme Rab5 et / ou l'antigène de l'endosome 1 (EEA1). Ensuite, l'acidification et le rétrécissement se poursuivent et le marqueur de l'endosome tardif Rab7 apparaît, puis ils fusionnent avec d'autres endosomes tardifs ou avec des lysosomes. Une partie de la membrane peut aussi dans certaines cellules être recyclée par d'autres voies.

La macropinocytose « abreuve » la cellule, elle est toujours associée à une augmentation de l'absorption de la phase liquide, comme le montre l'internalisation de nombreux marqueurs solubles non-perméants (ou non reconnus) par les cellules comme le jaune Lucifer, la peroxydase

du raifort et le dextran. La phagocytose n'entraîne pas d'augmentation de ces marqueurs dans la cellule permettant de différencier ces deux phénomènes.

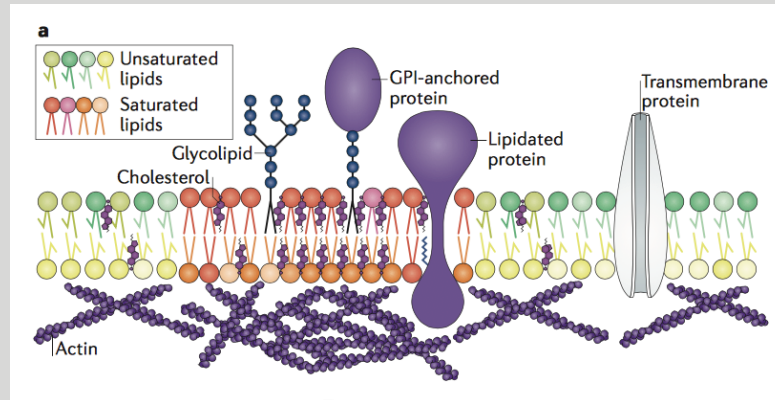
### *L'endocytose impliquant les radeaux lipidiques*

Ces voies endocytaires, comme la macropinocytose, intériorisent les protéines membranaires plasmiques dépourvues de séquences cytoplasmiques reconnaissables par les protéines adaptatrices de la clathrine. Ces mécanismes représentent donc une endocytose moins sélective. L'internalisation des récepteurs par ces voies non-CME entraînent généralement leur dégradation (et une atténuation de la signalisation) au lieu de leur recyclage (et du maintien de la signalisation) par la voie CME. Parmi les protéines internalisées il y a des protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol-anchored protéines, GPI-APs) qui n'ont pas de domaine cytoplasmique.

**Informations supplémentaires 3. Les radeaux lipidiques (raft domains).** L'hypothèse de radeaux membranaires ou radeaux lipidiques a émergé pour expliquer l'hétérogénéité membranaire observée expérimentalement comme la résistance partielle au détergent ou les différences de vitesse de diffusion latérale des lipides et des protéines dans les membranes. Il a été proposé que les interactions entre lipides spécifiques (par exemple, cholestérol, lipides relativement saturés et lipides glycosylés) dans le plan de la membrane entraînent la formation de régions relativement ordonnées et fonctionnellement importantes qui recrutent d'autres lipides et protéines. La définition opérationnelle des radeaux lipidiques a été formulée en 2006 avec les preuves disponibles suggérant que ces radeaux sont : hétérogènes, dynamiques (en termes de mobilité latérale et association-dissociation), représentent des nanodomains membranaires (10-200 nm) riches en cholestérol et en sphingolipide qui ont le potentiel de former des domaines microscopiques (> 300 nm) induits par des interactions protéine-protéine et protéine-lipide [313]. Les deux feuillettes opposés de la membrane n'ont pas forcément la même composition et les interactions entre les protéines internes et externes jouent certainement un rôle structurant. Bien de nouvelles techniques biochimiques et biophysiques aient récemment fourni un support pour la présence de ces domaines dans les cellules et suggéré des rôles clés pour l'hétérogénéité de la membrane dans diverses fonctions cellulaires [314], l'existence et la nature exacte des radeaux dans les cellules vivantes restent sujettes à débat.

La fonction la plus apparente de ces domaines (ou de l'hétérogénéité dans la distribution des lipides membranaires en général) est de séparer les éléments spécifiques sur des propriétés physiques (ex. hydrophobicité) afin de contrôler leurs interactions avec d'autres composants membranaires et donc leur activité. Les domaines rafts sont impliqués dans la signalisation immunitaire (la signalisation médiée par l'immunoglobuline E (IgE) a été la première voie de signalisation associée aux radeaux lipidiques), dans les interactions hôte-pathogène (les virus et les toxines bactériennes se lient préférentiellement aux régions de membrane plasmique hautement ordonnées résistantes au détergent pour pénétrer dans la cellule) et dans certaines pathologies humaines.





**Figure 35: Schéma d'un microdomaine lipidique de la membrane plasmique.**

Les microdomaines « radeaux lipidiques » sont enrichis en phospholipides saturés, en sphingolipides, en glycolipides, en cholestérol, en protéines modifiées par des lipides et en protéines à ancre GPI. L'enrichissement en ces composants hydrophobes confère à ces domaines lipidiques des propriétés physiques distinctes par une augmentation de l'encombrement stérique et une diminution de la fluidité par l'organisation ordonnée des lipides. En plus des composants membranaires, l'actine corticale joue un rôle actif dans la maintenance et le remodelage du domaine. En outre, les lipides membranaires sont répartis asymétriquement dans les feuillettes interne et externe, ce qui peut affecter davantage l'organisation de la membrane. (D'après [313]).

Les cavéoles.

C'est la forme particulière des cavéoles en oméga inversé qui a facilité leur première identification en microscopie électronique (pour revues [315–317]). Les cavéoles peuvent occuper jusqu'à 40% de la surface de la membrane plasmique de cellules de mammifères tels que les adipocytes et les cellules musculaires mais sont absentes des lymphocytes et des neuroblastes. Ces différences de distribution tissulaire soulignent des fonctions spécifiques contrairement à la CME qui est ubiquitaire. Les cavéoles ne sont pas étiquetées par des marqueurs de phase fluide ou les ligands de la voie clathrine. Leur caractérisation moléculaire a été facilitée par l'identification de la cavéoline [43], une protéine intégrale impliquée dans leur formation et qui se lie au cholestérol. La formation de cavéoles dans les cellules de vertébrés nécessite deux familles de protéines distinctes : les cavéolines (CAV1 à 3) et les protéines membranaires Cavines (caveolae associated protein ; Cavin 1 à 4) qui forment une structure autour de la vésicule. L'enrichissement spécifique des cavéoles en cholestérol et en glycosphingolipides leur confère les propriétés caractéristiques des microdomaines lipidiques. La présence de la dynamine et des protéines de fusion SNARE indique qu'elles possèdent l'équipement protéique nécessaire pour se détacher de la membrane et fusionner avec les compartiments intracellulaires. La présence d'intermédiaires des voies de signalisation laisse à penser qu'elles jouent un rôle important dans la signalisation. Elles sont impliquées dans la transcytose de molécules dans les cellules endothéliales et dans l'endocytose de certaines protéines comme l'albumine, des toxines bactériennes et des virus.



L'absence de gène codant pour les caveolines et les cavines chez *D. melanogaster* suggèrent que ce type de mécanisme est absent et remplacé par un autre type d'endocytose.

#### La voie CLIC-GEEC

L'endocytose des protéines à ancrage lipidique telles que les GPI-APs n'utilise pas de vésicules mantelées ; aucun matériel dense aux électrons entourant les premiers intermédiaires endocytaires n'est détectable (pour revues, [308,318]). Les GPI-APs sont endocytés par une voie indépendante de la dynamine, dans un compartiment endosomal précoce spécialisé qui contient également une fraction importante de la phase liquide internalisée. Ces structures contenant des GPI-APs endocytosés sont appelées GEECs (compartiments endosomaux précoces enrichis en GPI-AP) et résultent de la fusion des transporteurs tubulo-vésiculaires non revêtus appelés CLIC (CI carriers), structures polymorphes allongées qui peuvent être décrites comme étant approximativement tubulaires (Figure 32) et qui dérivent de la surface cellulaire. Le processus est ainsi appelé la voie CLIC / GEEC (CG). L'actine est importante pour la formation des CLICs qui est inhibée par des inhibiteurs de la polymérisation ou de la dépolymérisation de l'actine. La voie CG est apparemment initiée par le recrutement de GBF1, un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) qui sert à activer Arf1. Arf1 activé recrute à son tour ARHGAP10/21, une RhoGAP. Ce complexe est utilisé pour maintenir la RhoGTPase Cdc42 active pour le recrutement de la machinerie de polymérisation de l'actine.

#### Caveolae sans cavéolines - endocytose dépendante de la flotilline ?

Les flotillines semblent une autre voie d'endocytose des GPI-APs indépendant de la dynamine (pour revues [319–321]). Dans les cellules HeLa appauvries en flotilline1, il y a un défaut d'absorption d'une protéine ancrée au GPI, CD59. Il y a deux gènes de flotilline, la flotilline 1 et 2 (identiques à Reggie 2 et 1, respectivement), la surexpression de flotilline 1 et 2 induit des invaginations membranaires d'une manière dose-dépendante. De plus, la phosphorylation de la flotilline par la tyrosine kinase Fyn semble déclencher l'endocytose par cette voie qui pourrait aussi impliquer une polymérisation d'actine et Rac1 [322]. Les flotillines sont enrichies dans les radeaux lipidiques et leur extrémité N-terminale contient un domaine prohibitine (PHB) homologue avec un certain nombre de protéines associées à ces domaines, comme la stomatine, la podocine et la prohibitine. Bien que les flotillines puissent définir un processus endocytique indépendant de la dynamine, certaines études suggèrent que la dynamine pourrait être impliquée dans l'endocytose des cargos qui nécessitent de la flotilline. Les flotillines pourraient servir d'adaptateurs pour les

diriger vers d'autres voies dépendant de la dynamine. Le mécanisme de génération de même que le trafic intracellulaire des vésicules par les flotillines reste mal connu à ce jour. Une fois formées, elles pourraient rejoindre/former des endosomes particuliers.

Autres voies EIC.

Endocytose médiée par ARF6. Un autre mode d'EIC qui est aussi indépendant de la dynamine est celui qui a été identifié à l'origine en raison de son association avec Arf6 (pour revues [323,324]). Arf6 est présent à la surface de la cellule et dans de nombreuses cellules sur des endosomes contenant des protéines cargos des EIC. Une grande variété de protéines de surface pénètre dans les cellules par cette voie incluant des protéines impliquées dans le transport de nutriments (Glut1, CD98, Lat1), l'interaction matricielle (CD44, CD147), la fonction immunitaire (MHC Classe I, CD1a) et des protéines ancrées à la membrane par GPI (CD55 et CD59). Les protéines d'adhésion cellulaire comme les cadhérines et les intégrines sont aussi des exemples de cargaison internalisée et recyclée par cette voie. La voie associée à l'ARF6 ressemble à la voie CLIC / GEEC car elles intériorisent des cargaisons similaires. Savoir si elles sont identiques ou non n'est pas une question complètement tranchée. Il est probable que ces deux processus utilisent des mécanismes similaires pour l'entrée initiale et l'association avec Arf6 dans le contexte de types cellulaires spécifiques générerait un système de trafic endosomal distinct. L'endocytose associée à Arf6 semble une importante voie de trafic pour l'adhésion cellulaire, la migration et l'invasion tumorale.

Endocytose rapide endophiline-dépendante (FEME ; Fast Endophilin-Mediated Endocytosis). La FEME est une nouvelle voie endocytaire indépendante de la clathrine, régulée par l'endophiline, où les invaginations tubulo-vésiculaires se forment en quelques secondes sur la membrane plasmique lors de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les vésicules migrent ensuite rapidement vers la zone périnucléaire [325,326]. FEME nécessite la signalisation PI3K. L'endophiline exerce 3 fonctions distinctes dans cette voie : son domaine SH3 se lie à la cargaison, son domaine BAR induit la courbure de la membrane et ses multiples hélices membranaires supportent la scission de la membrane en coopération avec la dynamine et l'actine. Cette voie est détournée par les toxines bactériennes Shiga et cholériques lors de l'infection.

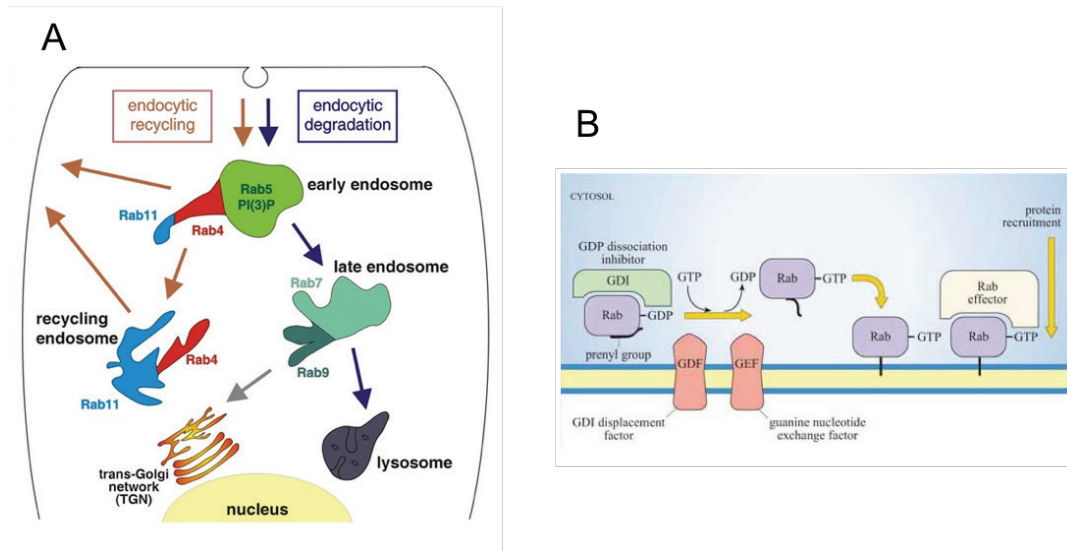
Rho-dépendent IL-2 receptor endocytose. L'endocytose du récepteur des cytokines, IL-2R, se produit via une voie constitutive, dynamine-dépendante et clathrine et cavéole indépendantes [327]. Cette voie dépend de la RhoGTPase RhoA et est régulée par la kinase phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cette voie implique aussi l'activation de Rac1, de la kinase p21-activée (Pak1), de la cortactine et des protéines N-WASP pour déclencher la polymérisation de l'actine.

*Le trafic et le destin intracellulaire des vésicules internalisées.*

Les endosomes provenant de la voie CME fusionnent avec les endosomes précoces ou de tri comme, éventuellement, ceux dérivés des EIC (Figure 36). Les endosomes précoces « classiques » sont de morphologie tubulo-vésiculaire et présentent un haut degré de capacité de fusion. Ce compartiment est constitué de tubules minces (diamètre de 50-60 nm) qui émanent de grandes vésicules (diamètre de 200-400 nm). La lumière légèrement acide (pH 6,0) des endosomes de tri favorise la dissociation de nombreux ligands de leurs récepteurs. Les cargos se retrouvent mélangés dans ce compartiment. Les membranes des endosomes précoces sont organisées en compartiments morphologiquement et biochimiquement distincts qui sont supposés être essentiels pour leurs fonctions de tri (Figure 36). Par des processus de maturation et de libération des véhicules de transport, les protéines et la membrane de la cargaison peuvent se diriger soit vers les endosomes tardifs et les lysosomes, soit vers le réseau trans-Golgien ou vers des endosomes de recyclage qui retournent à la membrane.

Les vésicules endocytaires précoces se distinguent en grande partie par la présence de Rab5, PI3P et EEA1. Plus récemment, l'existence d'endosomes précoces Rab5-positifs distincts, par exemple ceux associés à APPL1/2 et ceux associés à EEA1, a été montré. On pense que les endosomes Rab5-positif mûrissent ou progressent vers les compartiments tardifs, marqués par Rab4 ou Rab11 pour le recyclage et marqués par Rab7 pour la conversion en corps multi-vésiculaires (MVB) et en endosome tardif (Figure 36). Les endosomes Rab5 / EEA1 marquent généralement la progression vers les endosomes tardifs et les lysosomes. Un modèle intéressant pour la maturation endosomale implique la conversion séquentielle à travers le cycle GTPase d'échange d'une protéine Rab par une autre dans le compartiment suivant (Figure 36).

Suivant le type d'EIC, la destination finale des membranes et des cargos varie en fonction des protéines transportées et du type cellulaire. Par exemple, les cargos entrant par la voie Arf6 sont dirigés vers le recyclage ou la dégradation sur la base de séquences cytoplasmiques spécifiques et de la présence d'ubiquitinylation sur les queues cytoplasmiques des protéines.



**Figure 36: Trafic des vésicules d'endocytose dans une cellule.**

A) Un certain nombre de compartiments et de destins sont disponibles pour les cargaisons endocytées via le EIC, tandis que les voies clathrine et cavéolaire livrent généralement leur cargaison directement au système endosomal précoce ou de tri (early endosomes). Elles peuvent être adressées ensuite aux endosomes tardifs (late endosome), aux endosomes de recyclage (recycling endosome), aux lysosomes, puis rejoindre le système Golgien (TGN) ou le réticulum endoplasmique (ERC) (non-montré). Les voies EIC utilisent souvent des machineries moléculaires distinctes et des compartiments de recyclage séparés de celles de la CME pour adresser leur cargaison. En bleu, les voies conduisent à la dégradation du cargo, en brun, à son recyclage. B) modèle pour le remplacement des Rabs. La Rab-GDP est présente dans le cytosol, liée à un inhibiteur de dissociation du GDP (GDI). Au niveau de la membrane appropriée, une protéine (GDF) déplace l'inhibiteur et un facteur d'échange de la guanine (GEF) active une autre Rab, exposant le groupe prényle, qui se fixe à la membrane. La Rab-GTP se lie ensuite aux protéines effectrices qui recrutent un ensemble spécifique de protéines. Ce cycle se reproduit à chaque compartiment. (D'après [318])

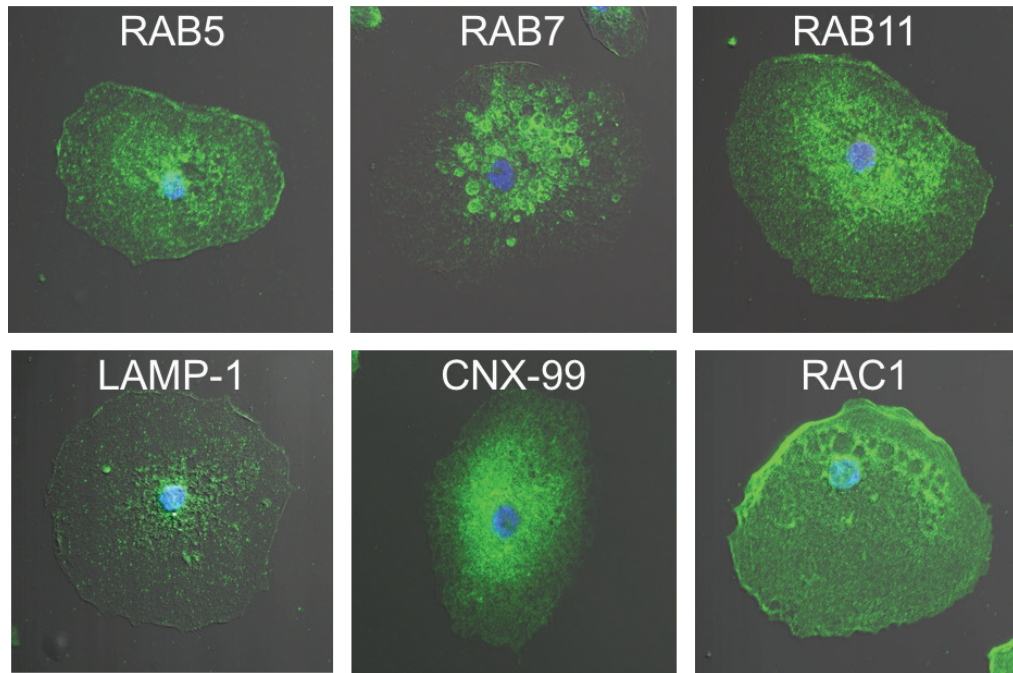
## Présentation des résultats

Pour déterminer les voies d'entrée des vénosomes dans les lamellocytes, j'ai utilisé une approche par immunocytochimie. J'ai soit injecté les vénosomes de *L. boulandi* ISm marqués de façon fluorescente, soit utilisé LbGAP comme marqueur des vénosomes à l'intérieur de la cellule (cf. Article 1) pour tester des coimmunolocalisations avec des marqueurs des voies d'endocytose (clathrine pour l'EDC, Dextran fluorescent pour la macropinocytose, la flotilline 1 et la protéine Atilla/L1 à ancre GPI pour les radeaux lipidiques). J'ai aussi recherché dans quel compartiment LbGAP/vénosomes étaient distribués après endocytose avec les marqueurs des compartiments de l'endosome précoce de tri (Rab5), de recyclage (Rab11), des endosomes tardifs et des endolysosomes (Rab7 et Lamp1) et du réticulum endoplasmique (Calnexin 99) et également si LbGAP pouvait immunolocaliser avec Rac1, une de ses cibles potentielles.

### Mises au point techniques.

Bien que tous les anticorps utilisés aient été validés sur la drosophile par différents auteurs (voir Table S1 de l'article), la plupart d'entre eux sont commerciaux et il n'existe pas de sérum préimmuns correspondants pour vérifier leur spécificité sur nos cellules. Cependant, les tests effectués avec les préimmuns provenant des lapins qui ont servi pour l'anticorps LbGAP n'ont pas montré de marquage non spécifique, comme ceux effectués avec les anticorps secondaires seuls. Certains des anticorps que nous ne connaissions pas ont été d'abord testés sur des lamellocytes prélevés sur des larves L2/L3 Hop<sup>Tum-1</sup>. Ces anticorps marquent clairement les lamellocytes (Figure 37) avec des patrons bien différenciés. Rab5 marque le cytoplasme sous forme de spots et on peut voir des accumulations autour de certaines vésicules de plus grande taille dans la partie centrale de la cellule. Rab7 marque fortement des structures vésiculaires alors que Rab11, LAMP-1 et CNX-99 donnent un signal plus diffus dans le cytoplasme. LAMP-1 marque aussi des structures vésiculaires de petite taille. Ceci montre, comme attendu, que les principaux compartiments

endocytaires sont présents dans ces cellules. Rac1 donne à la fois un marquage diffus et de certaines grandes vésicules dans la cellule présentée, alors que dans d'autres cellules j'ai observé un marquage ressemblant plus au cytosquelette d'actine (voir Article).

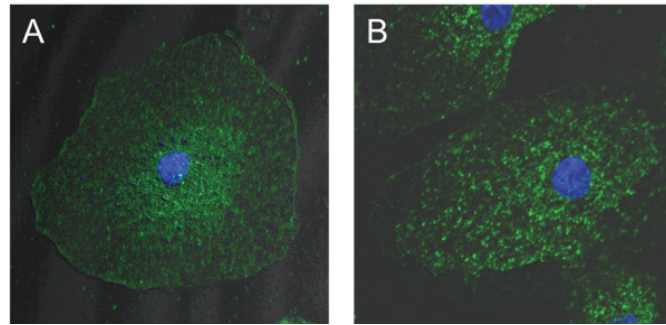


**Figure 37: Images en microscopie confocale des lamellocytes de larves L3 Hop<sup>Tum-1</sup> marqués avec différents anticorps des compartiments endosomaux.**

La technique est celle décrite dans les matériels et méthodes de l'article. Les cellules font environ 30 µm de diamètre.

Pour l'ensemble de ce travail, la technique de fixation inclue une étape de perméabilisation, ce qui pourrait être un problème pour bien visualiser les protéines membranaires (ex Flotilline, Atilla/L, Myosphéroïde). J'ai donc comparé cette fixation PFA/TX100 à une fixation à l'acétone (qui devrait préserver mieux les membranes) pour une protéine membranaire, la flotilline (Figure 38). Comme on peut le voir, le marquage global est sensiblement le même, bien que les structures semblent mieux conservées avec le marquage à l'acétone.





**Figure 38: Comparaison des méthodes de fixation.**

Lamellocytes de *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> fixés au PFA/tritonX100 (A) ou à l'acétone (B) et marqués par l'anti-Flotilline (révélée en vert).

### Au niveau expérimental.

J'ai soit injecté les vénosomes marqués dans les larves de drosophile soit localisé LbGAP après parasitisme en utilisant les possibilités offertes par deux souches de drosophiles, YR et Hop<sup>Tum-1</sup>, qui n'encapsulent pas les œufs de *L. bouvardi* ISm. La souche Hop<sup>Tum-1</sup> qui présente naturellement de nombreux lamellocytes permet de visualiser rapidement l'entrée des vénosomes après injection ou parasitisme. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être une souche mutante sur une voie cellulaire importante pour les hémocytes (par exemple, elle ne possède pas ou peu de cellules à cristaux) ce qui pourrait induire des modifications physiologiques des lamellocytes et se traduire par des difficultés à généraliser l'interprétation. J'ai donc aussi comparé les résultats obtenus par injection avec ceux obtenus après parasitisme sur ces deux souches à des temps similaires, quand cela s'est révélé possible, pour m'assurer de leur validité. Ces deux approches permettent aussi de vérifier que la présence des autres protéines de venin (parasitisme) n'interfère pas avec les voies d'entrée des vénosomes.

## Résumé des résultats

A l'exception de la macropinocytose qui n'a été étudiée qu'après injection de vénosomes, l'ensemble des résultats obtenus étaient similaires que ce soit par injection ou parasitisme et pour les deux souches de drosophiles. Je ne décrirais donc ici que le résultat global des observations.

- 1) Il n'y a pas de coimmunolocalisation entre les vénosomes marqués et la clathrine, et entre Rab5 et LbGAP, au niveau des lamellocytes quel que soit le temps après injection ou parasitisme indiquant que la voie d'entrée est clathrine indépendante.
- 2) L'absence de coimmunolocalisation importante avec du dextran fluorescent quel que soit le temps après injection indique que la macropinocytose n'est pas impliquée de même que certaines des voies des radeaux lipides (GEEC) qui internalisent du milieu externe en même temps que leurs cargos.
- 3) La forte co-immunolocalisation de LbGAP avec la flotilline 1 et également avec Atilla/L1 dès 4h après injection ou parasitisme indique que la voie d'entrée implique les radeaux lipidiques contenant la flotilline. L'absence de colocalisation avec la bêta-intégrine myosphéroïde suggère que l'entrée par la voie flotilline/raft est spécifique et qu'elle n'intervient pas dans le recyclage de cette intégrine membranaire.
- 4) Après entrée, LbGAP est retrouvée dans le compartiment de recyclage des endosomes et dans la voie de dégradation des endolysosomes. Elle semble aussi dirigée vers le reticulum endoplasmique ou fusionne avec des vésicules en provenant.
- 5) Je n'ai pas observé d'immunomarquage clair et concordant entre Rac1 et LbGAP.

## Article 2 : Texte principal

***Drosophila melanogaster* lamellocytes uptake parasitoids venosomes by a flotillin / lipid raft-dependent endocytic pathway.**

Bin Wan, Marylène Poirié<sup>§</sup>, Jean-Luc Gatti<sup>§\*</sup>

Université Côte d'Azur, INRA, CNRS, ISA, France

<sup>§</sup> last co-authors

\*Corresponding author

Email: jean-luc.gatti@inra.fr

Full address: Evolution and Specificity of Multitrophic Interactions (ESIM), Sophia Agrobiotech

Institute (ISA), INRA / CNRS / Université de Nice, 400 route des Chappes, BP 167, 06903

Sophia Antipolis Cedex – France

Phone; +33(0)4 92 38 65 64

Keywords: Lamellocytes; endosomes; lysosomes; rafts; immunohistochemistry; *Drosophila*; vénosomes; parasitoids.

## ABSTRACT

Venosomes are vesicles found in the venom of *Leptopilina* parasitoid wasps that are involved in the transport of virulence factors and their specific targeting in lamellocytes of their *Drosophila* host, thus preventing the immune response. Here, we used the co-immunolocalisation of fluorescently labelled *Leptopilina bouleari* venosomes and one of the transported virulence factor, LbGAP, with known markers of different endocytic pathways to decipher their entry into *D. melanogaster* lamellocytes. We have shown that endocytosis of the venosomes is clathrin- and micropinocytosis-independent and that they rapidly reached all vesicular compartments, including late endosomes, recycling endosomes, lysosomes, and the endoplasmic reticulum network, but apparently bypassing the early sorting endosomal compartment Rab5 positive. Moreover, LbGAP strongly colocalized with the lipid rafts protein Flotillin-1 and the GPI-anchored protein Attila/L1 (a lamellocyte-specific surface marker) suggesting entry *via* the flotillin / lipid rafts-dependent pathway. These data are also an important clue for determining the existence of a venosome-specific lamellocyte surface ligand in the flotillin / rafts membrane domains.

## INTRODUCTION

*Leptopilina bouleari* is a parasitoid wasp of *Drosophila* that develops inside and at the expense of the host, leading to its death. The parasitic success of the wasp is ensured by the injection of venom upon the oviposition, which protects the egg from the host immune response, the encapsulation. In *D. melanogaster*, encapsulation involves a specific hemocyte type, the lamellocytes, as well as the melanization of the formed cell capsule. (Carton and Kitano, 1979; Russo et al., 1996; Carton et al., 2008; Poirié et al., 2009). *L. bouleari* venom contains vesicles of about 200 nm produced in the venom gland, named venosomes, which are stored in the

reservoir and injected with soluble venom factors into the host hemolymph (Dupas et al., 1996; Labrosse et al., 2003; Gatti et al., 2012; Wan et al., 2017). Injection of venom impedes encapsulation by acting on lamellocytes (Labrosse et al., 2003), and we have recently shown that venosomes are sufficient to reproduce this phenotype and alter the encapsulation response of *D. melanogaster* (Wan et al., 2017). These vesicles indeed serve as transport vehicles for potential virulence factors that affect the cytoskeleton of lamellocytes, inducing a change in their morphology correlated with their loss of function in encapsulation. Among the virulence factors transported and co-immunolocalized with the venosomes in the lamellocytes, a RhoGTPase activating protein (RhoGAP) named LbGAP is the main candidate to produce this rearrangement of the cytoskeleton. It would interact with RacGTPases such as Rac1 and Rac2, as demonstrated *in vitro* (Labrosse et al., 2003; Colinet et al., 2007, 2010). In addition, the invalidation of Rac1 and Rac2 in hemocytes alters the encapsulation response against the wasp egg (Williams, 2006, Fauvarque and Williams, 2011). However, the mechanisms involved in the interaction between vesosomes and lamellocytes remain unclear.

The trafficking of membranes and cargoes through endocytosis and exocytosis allows a precise regulation of the interactions between the cell and its environment. The entry of external molecules, fluids, cargoes and even pathogens into the cells is through various endocytotic pathways that lead to the production of internal vesicles from the invagination of the plasma membrane (Watson et al., 2006; Doherty and McMahon, 2009; Kumari and Mayor, 2010). Endocytosis also plays a key role in the regulation of many intracellular signaling cascades by mediated internalization of ligand-associated receptors, for example. Apart from phagocytosis, which is restricted to macrophage-like cells (*D. melanogaster* plasmatocytes (Charroux and Royet, 2009)) to destroy particles larger than 500 nm as bacterial invaders, and has multiple functions in homeostasis of organisms (Botelho and Grinstein, 2011; Gray and Botelho, 2017)), the main and most studied endocytic cell pathway is clathrin-mediated endocytosis (CME)

(McMahon and Boucrot 2011). The adapter proteins involved in this process recruit cargoes at the cell membrane into developing clathrin-coated pits, which are then internalized in clathrin-coated vesicles (Mettlen et al., 2010; McMahon and Boucrot 2011). Once internalized, clathrin is removed from the vesicles, and the naked vesicles rapidly fuse with the endosomal sorting compartments (early endosomes) (McMahon and Boucrot 2011). Although CME is responsible for a high proportion of endocytic events, there is a continuously expanding description of clathrin-independent endocytosis. These clathrin-independent pathways include micropinocytosis (the cell drinking pathway), the (CLIC)/GPI-AP-enriched early endosomal compartment (GEEC pathway), caveolae- or flotillin-dependent endocytosis, arf6-dependent endocytosis, and other more specific receptor-dependent pathways (Kirkham and Parton, 2005; Doherty and McMahon, 2009; Mayor et al., 2014). The clathrin-mediated pathway is constitutively active, while the others are ligand-mediated and involve signaling pathways that engage tyrosine kinases and other cytosolic signaling factors. These mechanisms are interconnected and participate in specific cargoes, the entry of external fluids, and the renewal of the cell membrane proteins and lipids. Part of these endocytic processes, including clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis and caveolar endocytosis, requires dynamin activity and actin polymerization to generate vesicles (Smythe and Ayscough, 2006; Doherty and McMahon, 2009; Mayor et al., 2014). In general, most coat-dependent endocytosis mechanisms use dynamin for cleavage of vesicles scission from the inner cell surface. While clathrin-mediated endocytosis and micropinocytosis are ubiquitous, some of the other pathways may be restricted to cell-types, tissues and even species (Doherty and McMahon, 2009; Mettlen et al., 2010; McMahon and Boucrot, 2011).

After reaching early endosomes, the membrane proteins and lipids of the endocytic vesicles are either returned to the plasma membrane or transported to the late endosomes and lysosomes for degradation, depending on the molecules of the cargo and the adapter (Doherty and McMahon,

2009; Maldonado-Báez et al., 2013). Another transport route links early endosomes to the trans-Golgi network. Many Rab GTP-binding proteins exert a regulatory function in endocytic transports, by the recruitment of effector proteins specific to the membrane on which they are located (Watson et al., 2006; Stenmark, 2009; Donaldson et al., 2016). Among members of the Rab family, Rab5 organizes a membrane domain defining the site of entry into early endosomes. Rab4 and Rab11 are involved in the recycling pathways and are located on separate membrane domains on early endosomes distinct from those harboring Rab5. Rab7 is present on the vesicles routed toward the pathway of degradation leading to fusion with lysosomes.

Various endocytic pathways operate in *Drosophila* as shown by studies on cultured cells, isolated wing discs, oocyte nurse cells, and cultured neurons and pericardial cells for selected cell-surface proteins, mainly signaling receptors and bulky components. (Narayanan and Ramaswami, 2001; Guha, 2003; Fischer et al., 2006; Hemalatha et al., 2016). One of these studies (Guha, 2003) analyzed some of these pathways in embryonic hemocytes (mainly plasmatocytes) from the dynamin-like shibire (*shi*) mutant fly, and showed that these cells exhibit dynamin-dependent (such as CME) and -independent endocytosis (such as GEEC). Both pathways converge in a Rab7-positive endosome population and subsequently target the endocytosed cargoes for degradation in lysosomes. GPI-AP-containing membranes are endocytosed via the dynamin-independent pathway, and are not directed to early Rab5-positive endosomes compartments.

Here, we sought to decipher how venosomes interact with lamellocytes and what endocytic pathway is involved in the entry and cell distribution of these cargoes, by testing the co-immunolocalization of *L. bouvardi* fluorescently labelled venosomes and the virulence factor LbGAP with known markers of plasma membrane and endosomal compartments. We conclude that the entry and internalization of venosomes entry occurred independently of clathrin- via a specific flotillin / raft-dependent pathway. Once in the cell, venosomes and LbGAP are



distributed in almost all endosomal compartments except early endosomes. Since Flotillin is a marker of membrane domains of lipid raft, these specific domains will be the target for future cell surface ligand research for venosomes.

## RESULTS AND DISCUSSION

Parasitoid wasps venosomes may fall into the category of extracellular vesicles (EVs), such as exosomes or microvesicles, released by donor cells that can be absorbed by recipient cells (Akers et al., 2013; Simons and Raposo, 2009; Février and Raposo, 2004; Mathivanan and Simpson, 2010; Braicu et al., 2015). Venosomes are derived from cells, by a still unclear mechanism of formation (Morales et al., 2005; Gueguen et al., 2011; Wan et al., 2017), and they transport putative virulence factors to specific recipient cells, although not in the same organism in this particular case. Target cells appear to uptake EVs through a variety of endocytic pathways, including clathrin-dependent endocytosis and clathrin-independent pathways such as caveolin-mediated uptake, macropinocytosis, phagocytosis, and lipid raft-mediated internalization (Clayton, 2004; Feng et al., 2010; Lim and Gleeson, 2011; Yang and Gould, 2013; Mulcahy et al., 2014; Costa Verdera et al., 2017). Because EVs represent a heterogeneous population of vesicles, they can enter cells via more than one route depending on the proteins and glycoproteins found on the vesicle surface and the target cells. *Leptopilina boulardi* venosomes are more homogenous vesicles of about 200 nm (Dupas et al., 1996; Labrosse et al., 2003; Wan et al., 2017) and they mainly target a type of immune cells in their *Drosophila melanogaster* host, the lamellocytes, which are produced in response to wasp oviposition (Wan et al., 2017). Lamellocytes are large flat cells with many types of vesicles in their cytoplasm suggesting active endocytic and exocytic pathways (Ribeiro and Brehélin, 2006), but very little is known about these pathways or the pathways of internalization of venosomes. Here, we used two strains of *D. melanogaster*, the well-characterized YR strain (Dubuffet et al., 2009) and Hop<sup>tum-1</sup> (that

continuously produces a high number of lamellocytes (Hanratty and Dearolf, 1993; Luo et al., 2002)) in which eggs of the *L. boulandi* ISm line are not encapsulated thanks due to the induced modification of lamellocytes (Dubuffet et al, 2009). We searched for co-immunolocalisation with available markers of endocytosis (Table S1) in these two *Drosophila* strains at different times (Table S2) after either parasitism of larvae or injection of labelled venosomes from the ISm line in order to ascertain the results and avoid the risk of misinterpretation using only the mutant fly, and compare with the natural situation, namely parasitism. Our previous data suggest that after parasitism or injection, the venosomes circulate in the hemolymph for at least 24 h and can may enter the lamellocytes continuously (Wan et al., 2017).

We first analyzed the role of CME in venosomes internalization. Clathrin is present in *D. melanogaster* lamellocytes and showed intense labelling (Figure 1). Eighteen hours after injection of fluorescently labelled venosomes in *D. melanogaster* L2 larvae, no colocalization with clathrin was found (Figure 1). Because once internalized, clathrin uncoated vesicles fuse rapidly with the early (sorting) endosomal compartment, we search for colocalization with Rab5, a marker of this structure (Donaldson et al., 2016). No such colocalization could be found in the lamellocytes of the two strains at 18h and even 4h after injection in Hop<sup>Tum-1</sup> (Figure 1). Since once injected, venosomes are present continuously in the hemolymph (Wan et al., 2017), this lack of coimmunolocalisation does not result from exhaustion of external venosomes by rapid internalization. Thus, CME and early endosomal compartment do not appear to be involved in venosomes uptake. Clathrin-coated vesicles are generally small (of the order of 100nm) and can not accommodate larger cargoes because of the curvature limitation imposed by the coat. Since venosomes are vesicles in the range of 200 nm, they may not fit well into clathrin vesicles. Other endocytic pathways that can uptake large vesicles/particles are micropinocytosis and lipid raft domain endocytosis.

Macropinocytic vesicles have no apparent coat structures, can reach a size of 5  $\mu\text{m}$  in diameter, and allow cells to internalize non-selectively large amounts of solute and membrane (Lim and Gleeson, 2011). Macropinocytosis was tested using micro-injection into larvae of a mixture of fluorescently labelled venosomes and dextran, a classical probe for fluid phase internalization that occurs during this process (Lim and Gleeson, 2011). Using  $\text{Hop}^{\text{Tum-1}}$ , we observed that fluorescent dextran and venosomes were internalized in live lamellocytes 2h, 4h and 18h after injection (Figure 2). After 2h, no colocalization was observed, and at 4h and 18h very few venosomes colocalized with dextran, although in some cases this probe labelled a large part of the cell at that time (not shown). Venosomes and dextran thus appeared to be sequestered in different vesicles. Thus, while the process of separation between venosomes and the bulk phase ingested by macropinocytosis can occur rapidly and could not be observed in our experimental time-frame, we should have observed more colocalization anyway due to newly formed endocytic vesicles. These data suggest that macropinocytosis may not be the main route of entry. We then tested the raft-dependent endocytosis. Different types of lipid-raft endocytosis have been described. In mammalian cells, the main raft-dependent pathway involves the caveolae (Bastiani and Parton 2010; Parton and Collins, 2016) which require two types of protein to form a coat, caveolins and cavins. However, there are no genes related to caveolin and cavins in the *Drosophila* genome (Wurm et al. 2011). Another raft-dependent endocytosis is the (CLIC)/GPI-AP-enriched early endosomal compartment (GEEC pathway) which is important for internalizing and recycling GPI-anchored proteins and lipids (Doherty and McMahon, 2009; Mayor et al., 2014). This pathway gives rise to tubular endosomes rich in GPI-linked proteins and typically incorporate large volumes of extracellular fluid. Although not definitive, the fact that dextran and venosomes do not colocalize minimizes the possible role of this pathway. A third raft-domain endocytic pathway is associated with Flotillins (Meister and Tikkanen, 2014). As in mammals, there are two flotillins, flotillin 1 (*Flo1*) and flotillin 2 (*Flo2*), in *Drosophila*

(Galbiati et al., 1998). Flotillins form hetero-oligomers constitutively associated with cholesterol-enriched lipid microdomains like GPI-anchored proteins. We used here an antibody against flotillin 1 that labelled numerous small spots/vesicles in the cytoplasm of lamellocytes (Figure 3 and Figure S1). At 4h and 18h after injection, almost 100% of LbGAP “spots” (used as a venosomes entry marker) colocalized with flotillin spots (Figure 3). A similar result was obtained after parasitism of the two *Drosophila* strains (Figure S1).

Raft-dependent endocytosis plays a role in the recycling of surface anchored GPI-proteins, but also other membrane proteins such as integrins. To further investigate the specificity of the venosome-flotillin endocytosis, we took advantage of the presence on the lamellocytes membrane of two well described markers: one is the GPI-protein Atilla/L1 (Honti et al., 2014), the other the beta-integrin Myospheroid (MacKrell et al., 1988; Xavier and Williams, 2011). Studies in mammals have shown that Flotillins mediate endocytosis of the GPI-anchored CD59 protein and colocalize with it in early endosomes (Kumari and Mayor, 2010). Interestingly, Atilla/L1 is part of the Ly6 protein family as the human leukocyte CD59 antigen (Hijazi et al., 2009; Lee et al., 2013; Tanaka et al., 2015). In *Drosophila*, Ly6 proteins are involved in the formation of septate junctions of different tissues (Hijazi et al., 2009; Nilton et al., 2010; Syed et al., 2011), but the role of Atilla/L1 in lamellocytes is unknown. Integrins are a family of receptors for ligands found in the extracellular space, including extracellular matrix. Ligand binding and clustering of integrins provides a platform for the assembly of multimeric complexes that cause signaling responses, and the availability of integrins at the plasma membrane controls different functions such as cell-cell adhesion and motility (Caswell et al., 2009; Puklin-Faucher and Sheetz, 2009; Paul et al., 2015). Several integrins are present on the surface of lamellocytes including myospheroid which plays an important role in the capsule formation (Irving et al., 2005; Xavier and Williams 2011).

As for flotillin, Atila/L1 labelling showed a spot-like pattern and almost 100% of LbGAP spots colocalized with Atila/L1 spots (Figure 3 and Figure S1) whereas myospheroid, which gave a fuzzy decoration of the cell, did not colocalize with LbGAP (Figure S1). This result is again in favor of a specific flotillin-endocytic pathway for venosomes in lamellocytes, with no evidence of flotillin-dependent recycling of myospheroid.

Since venosomes, once entered in lamellocytes, were not directed to sorting Rab5 positive-endosomes, we wondered if they were just “bypassing” this step and could be retrieved in other classic endosomal compartments or if they were following a completely specific and different path. Normally, after entering the sorting endosomes, the cargoes are directed to the recycling or degradation pathways depending on the adapter to which they bind and their molecular properties (Watson et al., 2006; Stenmark, 2009; Donaldson et al., 2016). Endosomes sorted for degradation (endolysosomes may be the main route for raft-endocytosis (Mayor et al., 2014)) are marked by their association with Rab7. They then fuse with the lysosomes, whose maturation is signaled by the acquisition of Rab7 and lysosome-associated membrane proteins (LAMPs).

LbGAP spots clearly colocalize with Rab7 and Lamp-1 as early as 4h after injection or parasitism (Figure 4 and Figure S2) suggesting that this factor has reached the endolysosomal compartments. In addition, we also observed the colocalization of LbGAP with calnexin 99, an endoplasmic reticulum (ER) marker (an integral membrane ER chaperone that ensures in complex with calreticulin the proper folding and quality control of newly synthesized glycoproteins (Williams, 2006)) or the recycle vesicles marker Rab 11. Colocalization was already apparent 4h after injection and after parasitism suggesting that LbGAP is rapidly distributed in almost all endocytic compartments (Figure 5 and Figure S3).

Because LbGAP can target RacGTPases, particularly Rac1 and Rac2 (Colinet et al., 2007), to induce the rearrangement of the cytoskeleton of lamellocytes that change morphology from round to elongated (fusiform or bicoid) cells, we tried to coimmunolocalize this factor with Rac1.

Rac1 showed intense labelling of the lamellocyte cytoskeleton (Figure S3) and although in some case co-immunolocalisation occurred, this was not a general pattern suggesting that Rac1 and LbGAP may not be associated.

## CONCLUSION

In this study, we examined the mechanism of internalization of venosomes and trafficking in their lamellocyte target cells. We demonstrate that the uptake of venosomes in lamellocytes is a Flotillin / raft-dependent process. Venosomes enter these cells rapidly and their associated LbGAP protein (a putative virulence factor) is rapidly transported to recycling endosomes, endolysosomes, and the endoplasmic reticulum network. One exception is the lack of colocalisation with the sorting Rab5 positive-endosome compartments. Interestingly, studies on embryonic hemocytes (mainly plasmatocytes) suggest a similar by-pass of this compartment by a dynamin-independent pathway involving raft-domains. Whether this is a general feature of *Drosophila* hemocytes lineage needs to be ascertain. We found no discrepancies between injection of labelled venosomes and parasitism, a more natural situation, indicating that no other venom components are required for venosomes uptake by the cell as it was suggested for PDVs, virus-derived vesicles also used as virulence factors by other wasp species (Strand and Burke 2013; Gauthier et al., 2017). It will be interesting in the future to test whether the venom vesicles of other closely related species such as those of *Leptopilina heterotoma* that also enter lamellocytes and produce shape changes, use the same endocytic pathway, and whether their transported factors (which may differ from those of *L. boulardi* (Colinet et al., 2013; Goecks et al. 2013; Heavner et al., 2017; Wan et al., 2017)) show the same intracellular distribution. We also observed, as in our previous work (Colinet et al., 2007; Wan et al., 2017), that LbGAP remains as large spots within the cells even after being released from the venosomes membrane

(Wan et al, 2017). LbGAP, and other transported proteins, which comprise another RhoGAP named LbGAP2 carrying a mutation in the active site (Colinet et al., 2013; Wan et al., 2017), can form a matrix allowing a slow release of this factor or the increase of its local concentration for its action on the cell, explaining why no interaction with Rac 1 could be observed at the cytoskeleton level. Another explanation is that this material scrambles the cell endocytic pathway, which requires the action of small GTPases (Qualmann and Mellor 2003; Donaldson et al., 2016), thus blocking its normal function and the cycling of endosomal vesicles. This could lead to cell poisoning and affect the transport of new cell surface components required for the capsule formation around the egg such as myospheroid (Xavier and Williams, 2011). More work is needed to understand the mechanism of action of the transported factors. Because flotillin / raft dependent endocytosis is not a constitutive but a signal-triggered pathway, our work also suggests the presence of a venosome receptor within the flotillin / raft domain of the lamellocytes plasma membrane, and paves the way to search for it.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Biological material**

The ISm virulent strain of *L. bouvardi* originates from Nasrallah (Tunisia) (Gif stock number G431; Dupas and Boscaro, 1999). It was reared at 25°C on the Nasrallah susceptible *D. melanogaster* strain (Gif stock 1333). After emergence, adults were kept at 20°C on agar medium with honey. All experiments were performed with 5-10 days-old mated females.

The *Drosophila D. melanogaster* YR strain (Gif-1088) was produced from isofemales lines from a population of Brazzaville (Congo). Thanks to genetic experiments, it is homozygous for the resistant allele of a major resistance gene to the ISy line of *L. bouvardi* located in a region of chromosome 2R. The mutant Hop<sup>Tum-1</sup> was obtained from the Bloomington *Drosophila* stock



center (stock number 8492). *Drosophila* strains were reared on standard medium (10% cornmeal, 10% yeast, agar and nipagine) at 25°C.

### **Venosomes purification and microinjection with Dextran**

Venosomes were obtained by dissection of *L. boulandi* ISm females reservoirs. 20 to 30 reservoirs were dissected in 20-30µl of Insect Ringer. The venom extract was centrifuged 5 min. at 500g at 4° to remove large debris, and the supernatant 10 min at 15000g at 4°C. The pellet containing the venosomes (Gatti et al., 2011; Wan et al. 2017(in prep)) was resuspended in IR and centrifuged again. This latter pellet was diluted in 50 µl IR and labelled with NHS-Alexa 481XXL (2mM; Interchim) as previously described (Wan et al., 2017). After one wash in IR to remove the non-reactive NHS-Alexa 481XXL, the fluorescent venosomes were used directly or mixed with fluorescently labeled 10 kDa Dextran-Alexa fluor 488 (10µg/µl; In Vitrogen). The labeled venosomes or the venosomes-dextran solution were microinjected in second-instar host larvae (FemtoJet, Eppendorf).

### **Parasitism**

For immunohistochemistry of hemocytes, batches of 30 second instar larvae (L2) put on a dish with drosophila food were submitted to parasitism by three female wasps for 4h. After this period, parasitoids were removed and the larvae left at 25°C until used. For each batch, three larvae were dissected, and only those batches in which three larvae contained an egg or parasitoid larva were used for collection of the hemolymph.

### **Lamellocytes immunolabelling and imaging**

The hemolymph of *Drosophila* larvae was collected in a drop of 30 µl of PBS at the end of the parasitism period and 14h later, or 2h, 4h and 18h after microinjection with labelled venosomes

or venosomes-Dextran solution. The drop was placed in the center of a 15-mm glass coverslip in a 24-well culture plate and the hemocytes were allowed to adhere for 1h.

For observation of macropinocytosis, the adherent cells were washed with PBS and the coverslip was mounted on a slide using a 5  $\mu$ l drop of PBS. Although PBS is not the best medium to keep cells alive, we were able to observe fluorescent probes in less than 20 minutes before cell degradation.

For immunostaining, the adherent cells were washed with PBS and fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature. After three washes with PBS, the cells were permeabilized with PBS-0.1% Triton X100 for 20 min at room temperature and then incubated with PBS-0.3% BSA for 30 min and with the different primary antibodies diluted in the same buffer for 1h at room temperature (RT). After three PBS washes, they were incubated with the secondary antibodies for 1h at RT. After three additional PBS washes and one with deionized water, the coverslip was mounted on a slide using an antifading medium containing DAPI to stain the cell nucleus (Interchim). Commercial antibodies used are described in Table S1, the anti-LbGAP was described in (Labrosse et al., 2005), all were used at a 1:500 dilutions. All antibody solutions were prepared in PBS 0.3% BSA. Secondary antibodies were fluorescently labelled goat anti-rabbit IgG (Fluoprobes 547H for LbGAP (Interchim); 1/1,000 as indicated and Andy Fluor 488 for other rabbit polyclonals (GeneCopoeia); 1/500 as indicated), goat anti-mouse IgG (Andy Fluor 488, GeneCopoeia; 1/500 as indicated) and rabbit anti-goat IgG (FITC, Sigma; 1/500 as indicated).

Preparations were observed and imaged using a laser scanning confocal microscope equipped with an array scan detector (LSM 880; Zeiss) and pictures were edited with the Zen software (Zeiss). Each experiment was repeated at least twice.

**FIGURES LEGEND (see Figures)**

## REFERENCES

- Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC (2013) Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 113: 1–11. doi:10.1007/s11060-013-1084-8.
- Bastiani M, Parton RG (2010) Caveolae at a glance. *J Cell Sci* 123: 3831–3836. doi:10.1242/jcs.070102.
- Botelho RJ, Grinstein S (2011) Phagocytosis. *Curr Biol* 21: 533–538. doi:10.1016/j.cub.2011.05.053.
- Braicu C, Tomuleasa C, Monroig P, Cucuianu A, Berindan-Neagoe I, et al. (2015) Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? *Cell Death Differ* 22: 34–45. doi:10.1038/cdd.2014.130.
- Carton Y, Kitano H (1979) Changes in the hemocyte population of *Drosophila* larvae after single and multiple parasitization by *Cothonaspis* (Parasitic Cynipidae). *J Invertebr Pathol* 34: 88–89.
- Carton Y, Poirié M, Nappi AJ (2008) Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Sci* 15: 67–87. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x.
- Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC (2009) Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 843–853. doi:10.1038/nrm2799.
- Colinet D, Schmitz A, Cazes D, Gatti J-L, Poirié M (2010) The origin of intraspecific variation of virulence in an eukaryotic immune suppressive parasite. *PLoS Pathog* 6: e1001206.
- Colinet D, Schmitz A, Depoix D, Crochard D, Poirié M (2007) Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. *PLoS Pathog* 3: e203. doi:10.1371/journal.ppat.0030203.
- Colinet D, Deleury E, Anselme C, Cazes D, Poulain J, et al. (2013) Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: The case of *Leptopilina* parasitoids of *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* 43: 601–611. doi:10.1016/j.ibmb.2013.03.010.
- Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P (2017) Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release* 266: 100–108. doi:10.1016/j.jconrel.2017.09.019.
- Charroux, B., and Royet, J. (2009). Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9797–9802.
- Clayton A (2004) Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J* 22: 1–22. doi:10.1096/fj.03-1094fje.
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78: 857–902. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Donaldson JG, Johnson DL, Dutta D (2016) Rab and Arf G proteins in endosomal trafficking and cell surface homeostasis. *Small GTPases* 7: 247–251. doi:10.1080/21541248.2016.1212687.
- Dupas S, Brehelin M, Frey F, Carton Y (1996) Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology* 113: 207–212. doi:10.1017/S0031182000081981.
- Dupas S, Boscaro M (1999) Geographic Variation and Evolution of Immunosuppressive Genes in a *Drosophila* Parasitoid Geographic variation and evolution of immunosuppressive genes in a *Drosophila* parasitoid. *Ecography (Cop)* 22: 284–291.
- Dubuffet, A., Colinet, D., Anselme, C., Dupas, S., Carton, Y., and Poirie, M. (2009). Variation of *Leptopilina bouvardi* success in *Drosophila* hosts: what is inside the black box? *Adv Parasitol* 70, 147–188.
- Fauvarque M-O, Williams MJ (2011) *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci* 124: 1373–1382. doi:10.1242/jcs.064592.
- Février B, Raposo G (2004) Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 16: 415–421. doi:10.1016/j.ceb.2004.06.003.
- Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, et al. (2010) Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 11: 675–687. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x.

- Fischer JA, Eun SH, Doolan BT (2006) Endocytosis, Endosome Trafficking, and the Regulation of *Drosophila* Development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 181–206. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093205.
- Gatti J-L, Schmitz A, Colinet D, Poirié M (2012) Diversity of Virus-Like Particles in Parasitoids' Venom: Viral or Cellular Origin? In *Parasitoid viruses: symbionts or pathogens*, eds Nancy E. Beckage, Jean-Michel Drezen; Elsevier pp. 181-192 doi:10.1016/B978-0-12-384858-1.00015-1.
- Galbiati F, Volonté D, Goltz JS, Steele Z, Sen J, et al. (1998) Identification, sequence and developmental expression of invertebrate flotillins from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 210: 229–237. doi:10.1016/S0378-1119(98)00064-X.
- Gauthier J, Drezen J-M, Herniou E (2017) The recurrent domestication of viruses: major evolutionary transitions in parasitic wasps. *Parasitology*: 1–13. doi:10.1017/S0031182017000725.
- Goecks J, Mortimer NT, Mobley JA, Bowersock GJ, Taylor J, et al. (2013) Integrative Approach Reveals Composition of Endoparasitoid Wasp Venoms. *PLoS One* 8: 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0064125.
- Gray M, Botelho RJ (2017) Phagocytosis and Phagosomes, eds Roberto Botelho, 1519. doi:10.1007/978-1-4939-6581-6.
- Guha A (2003) shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of *Drosophila* hemocytes. *J Cell Sci* 116: 3373–3386. doi:10.1242/jcs.00637.
- Guha A, Sriram V, Krishnan KS, Mayor S. Shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of *Drosophila* hemocytes. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 16):3373-3386
- Gueguen G, Rajwani R, Paddibhatla I, Morales J, Govind S (2011) VLPs of *Leptopilina boulardi* share biogenesis and overall stellate morphology with VLPs of the heterotoma clade. *Virus Res* 160: 159–165. doi:10.1016/j.virusres.2011.06.005.
- Hanratty WP, Dearolf CR (1993) The *Drosophila* Tumorous lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* 238: 33–37. doi:10.1007/BF00279527.
- Heavner ME, Ramroop J, Gueguen G, Ramrattan G, Dolios G, et al. (2017) Novel Organelles with Elements of Bacterial and Eukaryotic Secretion Systems Weaponize Parasites of *Drosophila*. *Curr Biol* 27: 2869–2877.e6. doi:10.1016/j.cub.2017.08.019.
- Hemalatha A, Prabhakara C, Mayor S (2016) Endocytosis of Wingless via a dynamin-independent pathway is necessary for signaling in *Drosophila* wing discs. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E6993–E7002. doi:10.1073/pnas.1610565113.
- Honti V, Csordás G, Kurucz É, Márkus R, Andó I (2014) The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol* 42: 47–56. doi:10.1016/j.dci.2013.06.005.
- Hijazi, A., Masson, W., Auge, B., Waltzer, L., Haenlin, M., and Roch, F. (2009). boudin is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. *Development* 136, 2199–2209.
- Irving, P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7, 335–350.
- Kirkham M, Parton RG (2005) Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1745: 273–286. doi:10.1016/j.bbamcr.2005.06.002.
- Kumari S, MG S, Mayor S (2010) Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* 20: 256–275. doi:10.1038/cr.2010.19.
- Labrosse C, Carton Y, Dubuffet A, Drezen J., Poirie M (2003) Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J Insect Physiol* 49 : 513–522. doi:10.1016/S0022-1910(03)00054-4.
- Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, Grangeia a, Huguet E, et al. (2005) A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem Mol Biol* 35 : 93–103. doi:10.1016/j.ibmb.2004.10.004.
- Lee, P.Y., Wang, J.X., Parisini, E., Dascher, C.C., and Nigrovic, P.A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* 94, 585–594.

- Lim JP, Gleeson PA (2011) Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* 89: 836–843. doi:10.1038/icb.2011.20.
- Luo H, Rose P, Roberts T, Dearolf C (2002) The Hopscotch Jak kinase requires the Raf pathway to promote blood cell activation and differentiation in *Drosophila*. *Mol Genet Genomics* 267: 57–63. doi:10.1007/s00438-001-0632-7.
- Maldonado-Báez, L., Williamson, C., and Donaldson, J.G. (2013). Clathrin-independent endocytosis: A cargo-centric view. *Exp Cell Res* 319, 2759–2769.
- Mayor S, Parton RG, Donaldson JG (2014) Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6. doi:10.1101/cshperspect.a016758.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ (2010) Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 73: 1907–1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- MacKrell, A.J., Blumberg, B., Haynes, S.R., and Fessler, J.H. (1988). The lethal mysospheroid gene of *Drosophila* encodes a membrane protein homologous to vertebrate integrin beta subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2633–2637.
- Meister M, Tikkanen R (2014) Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: A flotillin point of view. *Membranes (Basel)* 4: 356–371. doi:10.3390/membranes4030356.
- Mettlen M, Loerke D, Yasar D, Danuser G, Schmid SL (2010) Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 188: 919–933. doi:10.1083/jcb.200908078.
- McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 517–533. doi:10.1038/nrm3151.
- Morales J, Chiu H, Oo T, Plaza R, Hoskins S, et al. (2005) Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victoriana*. *J Insect Physiol* 51: 181–195. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.11.002.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3: 1–14. doi:10.3402/jev.v3.24641.
- Narayanan R, Ramaswami M (2001) Endocytosis in *Drosophila*: Progress, Possibilities, Prognostications. *Exp Cell Res* 271: 28–35. doi:10.1006/excr.2001.5370.
- Nilton, A., Oshima, K., Zare, F., Byri, S., Nannmark, U., Nyberg, K.G., Fehon, R.G., and Uv, A.E. (2010). Crooked, Coiled and Crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components. *Development* 137, 2427–2437.
- Paul NR, Jacquemet G, Caswell PT (2015) Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Curr Biol* 25: R1092–R1105. doi:10.1016/j.cub.2015.09.049.
- Parton RG, Collins BM (2016) Unraveling the architecture of caveolae. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 14170–14172. doi:10.1073/pnas.1617954113.
- Poirié M, Carton Y, Dubuffet A (2009) Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *C R Biol* 332: 311–320. doi:10.1016/j.crv.2008.09.004.
- Puklin-Faucher E, Sheetz MP (2009) The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci* 122: 575–575. doi:10.1242/jcs.049544.
- Qualmann B, Mellor H (2003) Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem J* 371: 233–241. doi:10.1042/bj20030139.
- Ribeiro, C., and Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *J Insect Physiol* 52, 417–429.
- Russo J, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehélin M (1996) Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 ( Pt 1: 135–142. doi:10.1017/S0031182000065173.
- Smythe E, Ayscough KR (2006) Actin regulation in endocytosis. *J Cell Sci* 119: 4589–4598. doi:10.1242/jcs.03247.
- Simons M, Raposo G (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21: 575–581. doi:10.1016/j.ceb.2009.03.007.
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 513–525. doi:10.1038/nrm2728.

- Strand MR, Burke GR (2013) Polydnavirus-wasp associations: Evolution, genome organization, and function. *Curr Opin Virol* 3: 587–594. doi:10.1016/j.coviro.2013.06.004.
- Syed, M.H., Krudewig, A., Engelen, D., Stork, T., and Klambt, C. (2011). The CD59 Family Member Leaky/Coiled Is Required for the Establishment of the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*. *J Neurosci* 31, 7876–7885.
- Tanaka, K., Diekmann, Y., Hazbun, A., Hijazi, A., Vreede, B., Roch, F., and Sucena, É. (2015). Multispecies Analysis of Expression Pattern Diversification in the Recently Expanded Insect Ly6 Gene Family. *Mol Biol Evol* 32, 1730–1747.
- Watson HA, Zastrow M Von, Wendland B (2006). Endocytosis. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. doi:10.1002/3527600906.mcb.200300063.
- Wan B, Goguet E, Ravallec M, Pierre O, Lemauf S, Volkoff A-N, et al. (2017). Atypical extracellular vesicles as interspecies comunicasomes involved in host specificity: the case of a parasitoid wasp of *Drosophila*. En Soumission.
- Williams MJ (2006). Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J Cell Sci* 119: 2015–2024. doi:10.1242/jcs.02920.
- Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119, 615–623.
- Wurm Y, Wang J, Riba-Grognuz O, Corona M, Nygaard S, et al. (2011). The genome of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5679–5684. doi:10.1073/pnas.1009690108.
- Xavier MJ, Williams MJ (2011). The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in *Drosophila* immunosurveillance cells. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0019504.
- Yang JM, Gould SJ (2013). The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochem Soc Trans* 41: 277–282. doi:10.1042/BST20120275.

## ACKNOWLEDGEMENTS

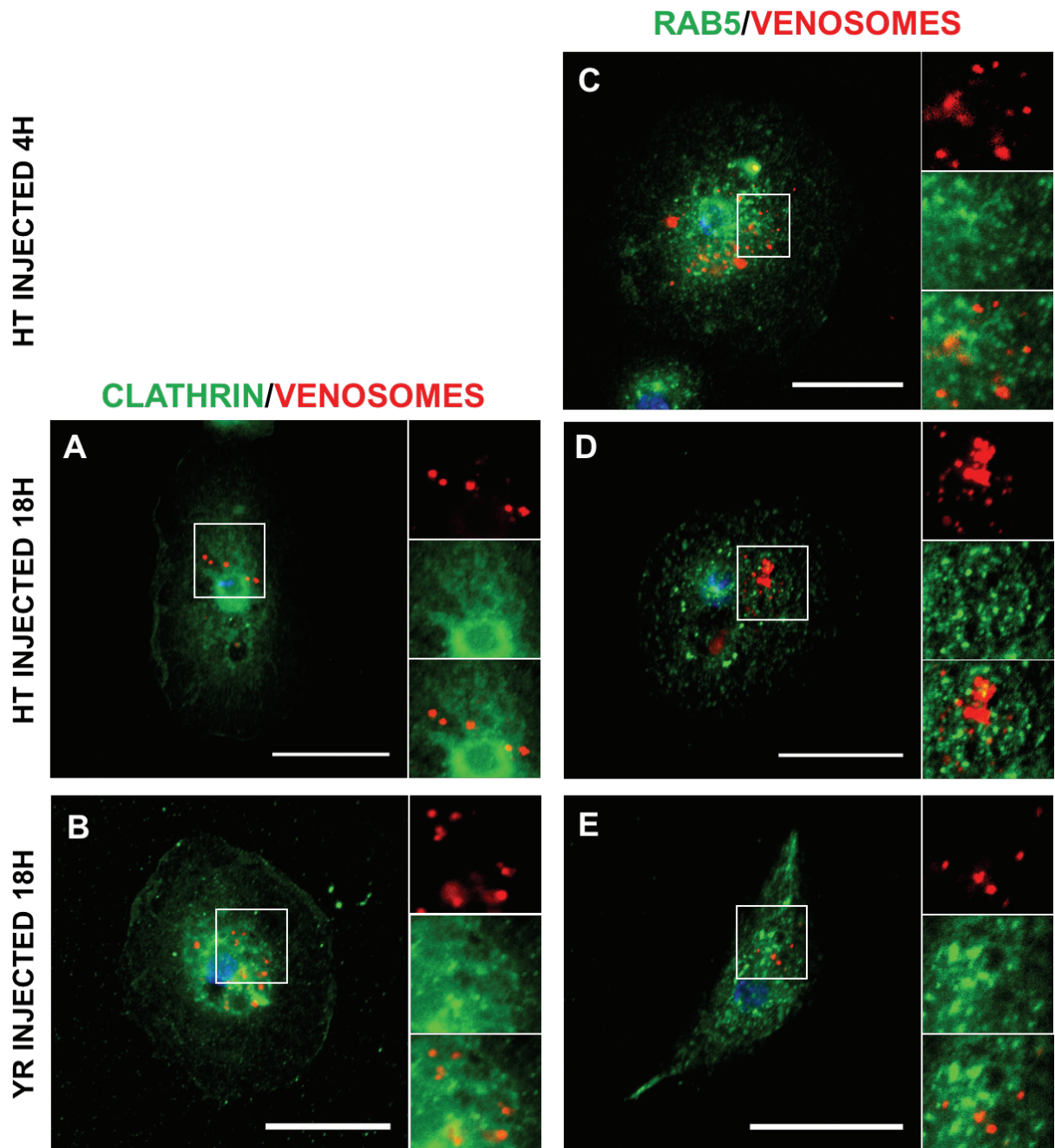
We thank C. Rebuf for maintaining the insect rearing facility and Dr Andó I. (Biological Research Centre, Szeged, Hungaria) for the gift of the mouse monoclonal Atilla/L1. This work received support from the Department of Plant Health and Environment (SPE) from the French National Institute for Agricultural Research (INRA), the French National Research Agency through the PARATOXOSE project (ANR-09-BLAN-0243-01), the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028) and the European Union's Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration, under grant agreement No 613678 (DROPSA). Wan B. PhD was funded by the DROPSA program.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

B.W. performed light and fluorescence microscopy, purifications and labelling. J.-L.G. and M.P. designed and coordinated the study. B.W., J.-L.G. and M.P. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.



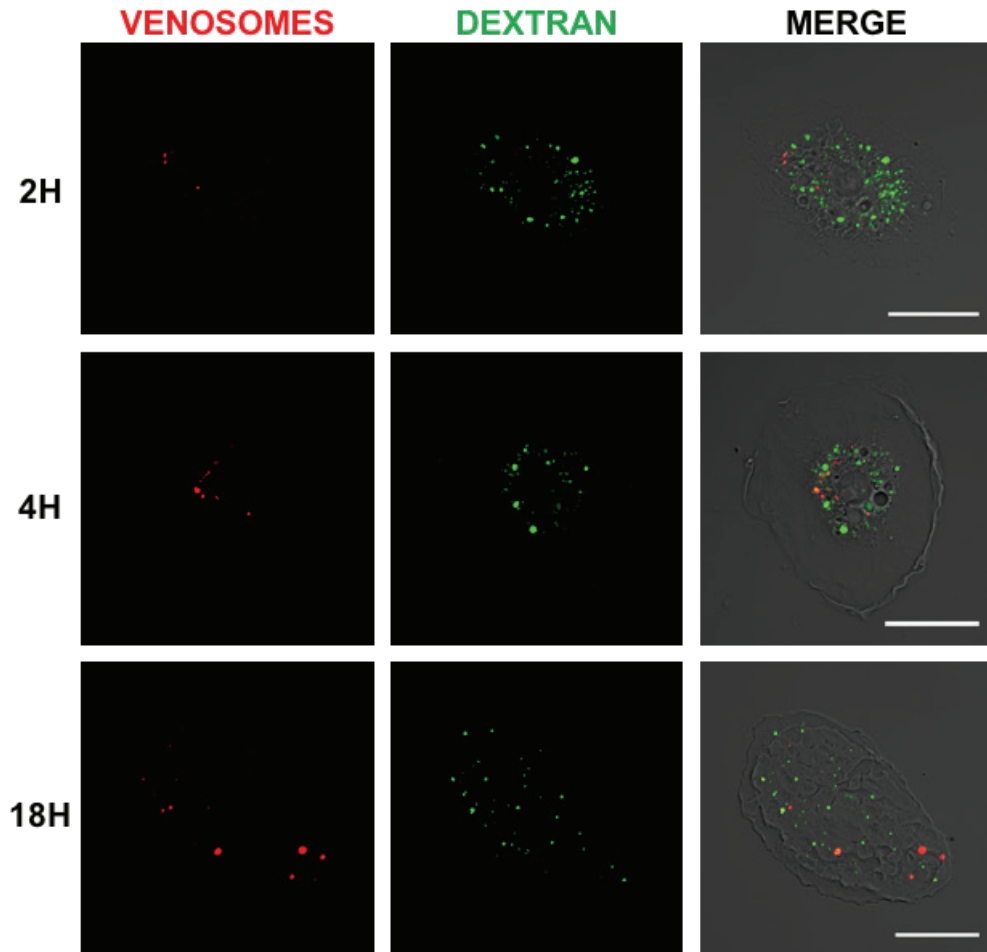
## Article 2: Figures 1-5



**Figure 1: Venosomes do not colocalize with Clathrin and Rab5 in lamellocytes.**

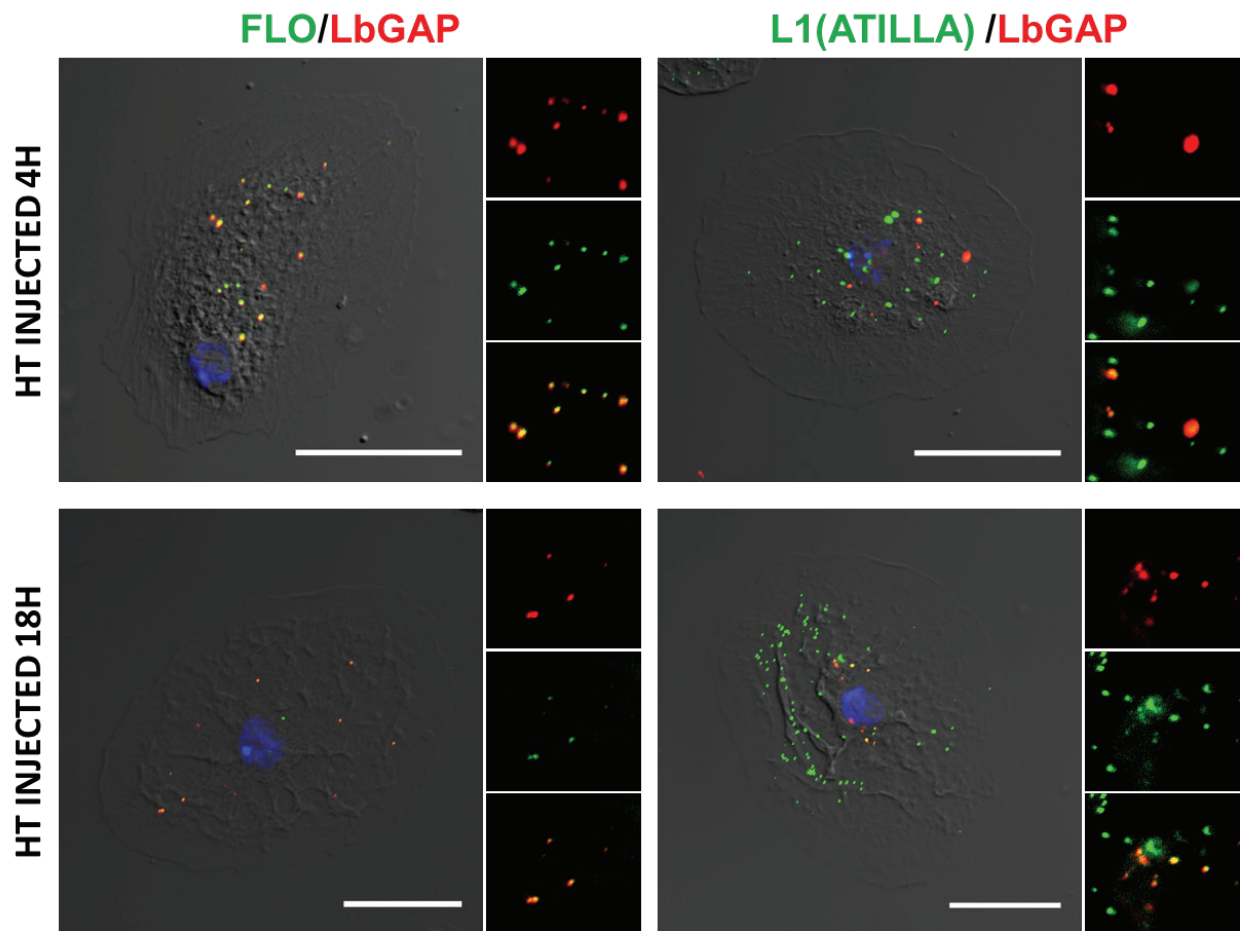
Confocal microscopy observations of lamellocytes 4h or 18h after injection of fluorescence labelled venosomes (red) in *D. melanogaster* YR and Hop<sup>Tum-1</sup> (HT) larvae show no colocalization with either Clathrin (A-B) or Rab5 (C-E) (Green). C, lamellocytes of Hop<sup>Tum-1</sup> larvae 4h after injection; A and D, lamellocytes of Hop<sup>Tum-1</sup> larvae 18h after injection; B and E, lamellocytes of YR larvae 18h after parasitism. Bar, 20µm.



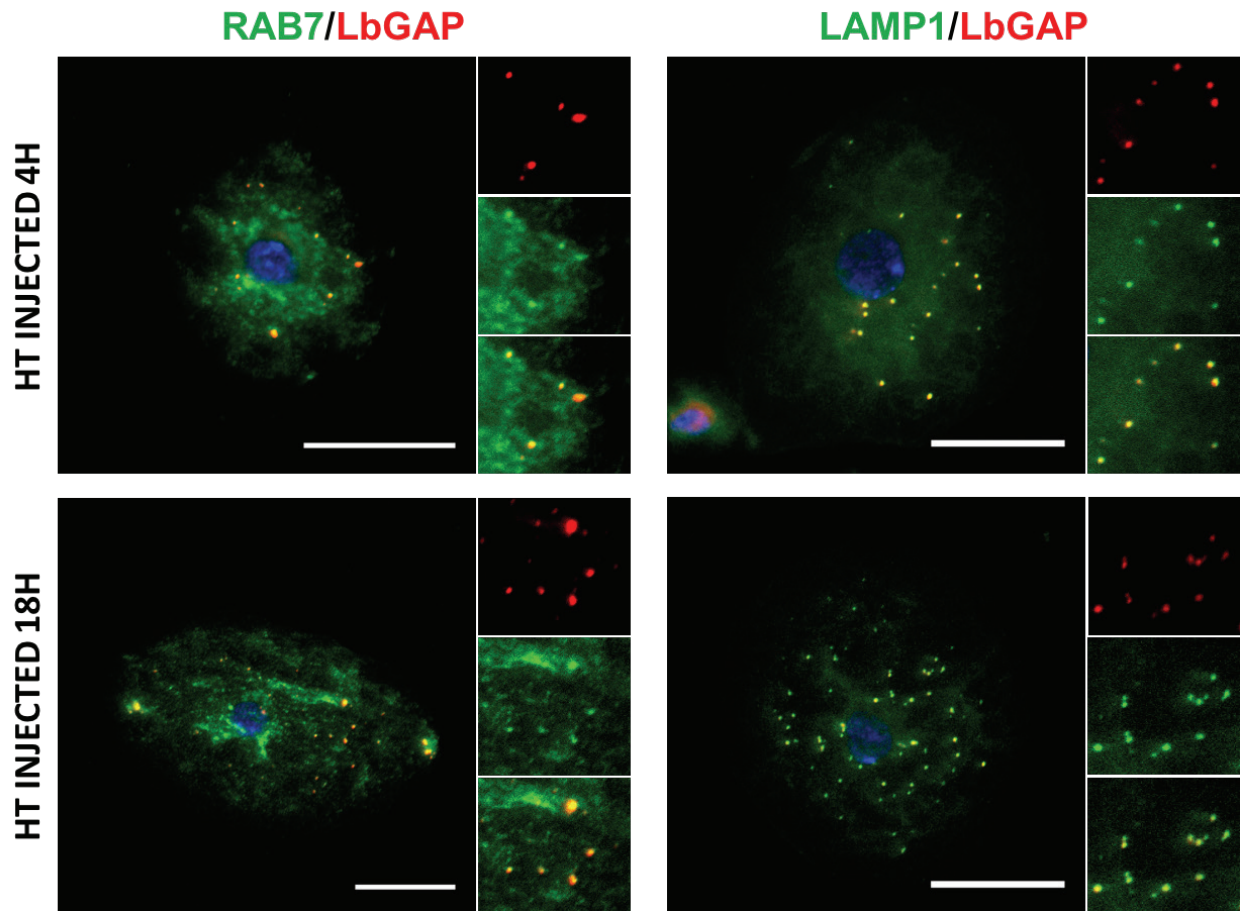


**Figure 2. Absence of venosomes in macropinocytic vesicles.**

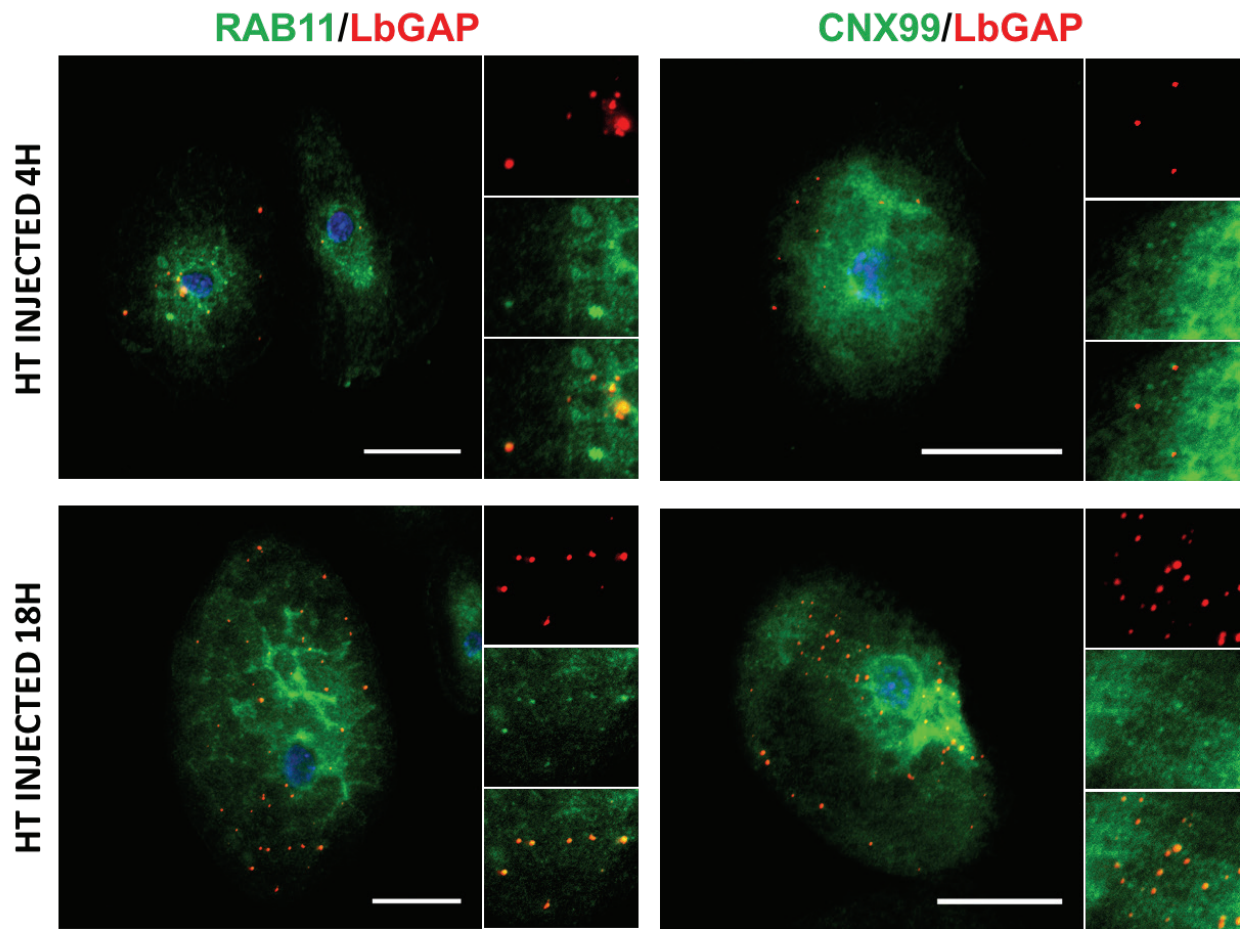
Internalization of the fluid phase marker (Dextran; green) by macropinocytosis and venosomes (red) in lamellocytes of  $Hop^{Tum-1}$  larvae after co-injection (right pictures, merged of the two fluorescence channels). Lamellocytes were not fixed. No colocalization between venosomes and dextran was observed 2h after injection (panel A), and very few venosomes colocalized with dextran 4h and 18h after injection (B and C, respectively). Scale bars, 20  $\mu$ m.



**Figure 3. LbGAP coimmunolocalize with Raft membrane proteins in *Drosophila* lamellocytes.** Merged pictures of Hop<sup>Tum-1</sup> (HT) lamellocytes 4h and 18h after larvae injection with venosomes, fixation and immunostaining with anti-LbGAP antibody (red) and either anti-Flotilline 1 or anti-L1/Attila antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the selected area). The yellow/orange spots on the merged pictures indicate a co-immunocalization between LbGAP and Flotilline 1 or L1/Attila. Nucleus are stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.

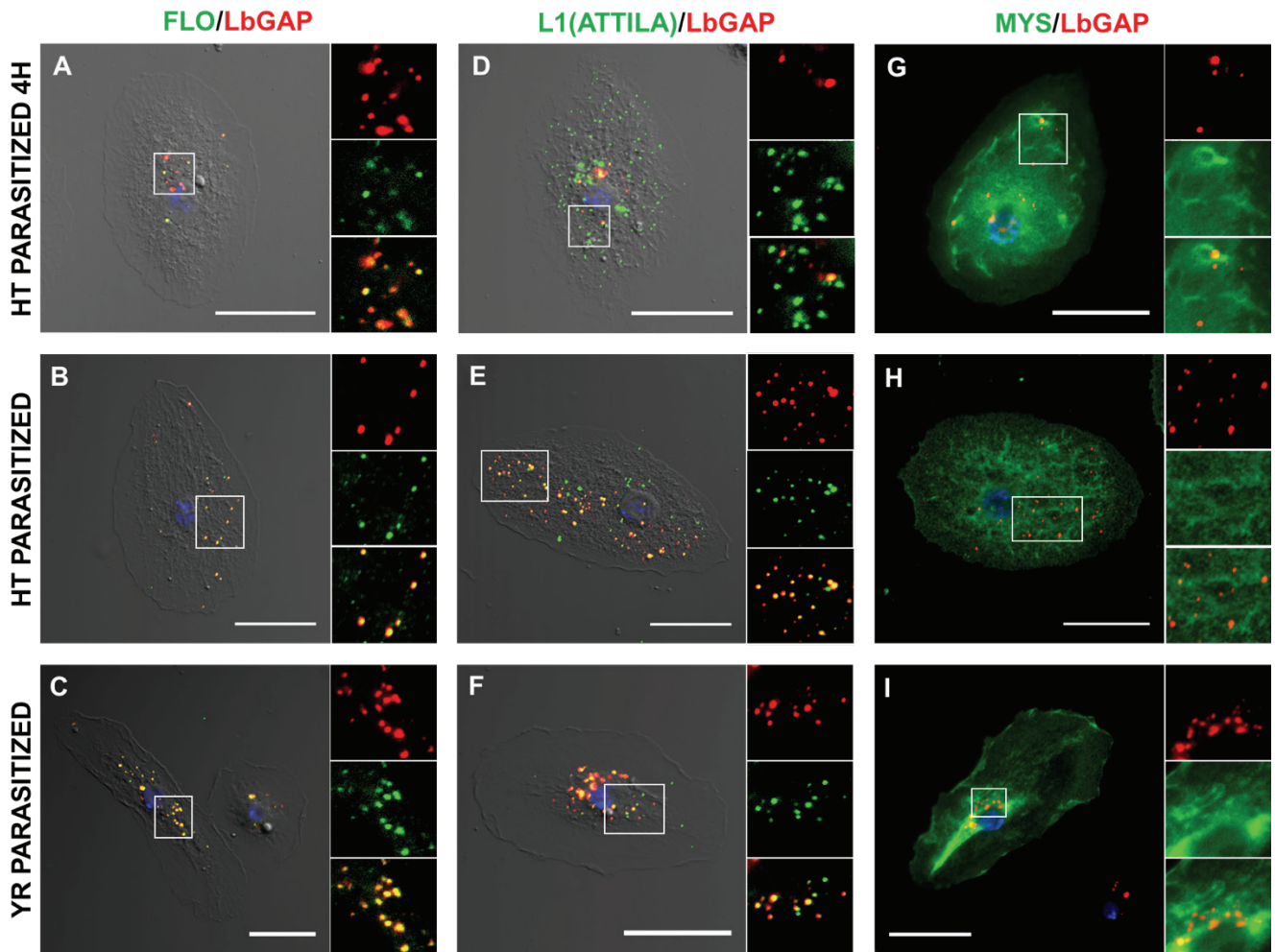


**Figure 4. LbGAP coimmunolocalize with endolysosomal compartments in *Drosophila* lamellocytes.** Merged pictures of Hop<sup>Tum-1</sup> (HT) lamellocytes 4h and 18h after larvae injection with venosomes, fixation and immunostaining with anti-LbGAP antibody (red) and either anti-Rab7 or anti-Lamp1 antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the areas). The yellow/orange spots on the merged pictures indicate a co-immunocalization. Nucleus are stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.



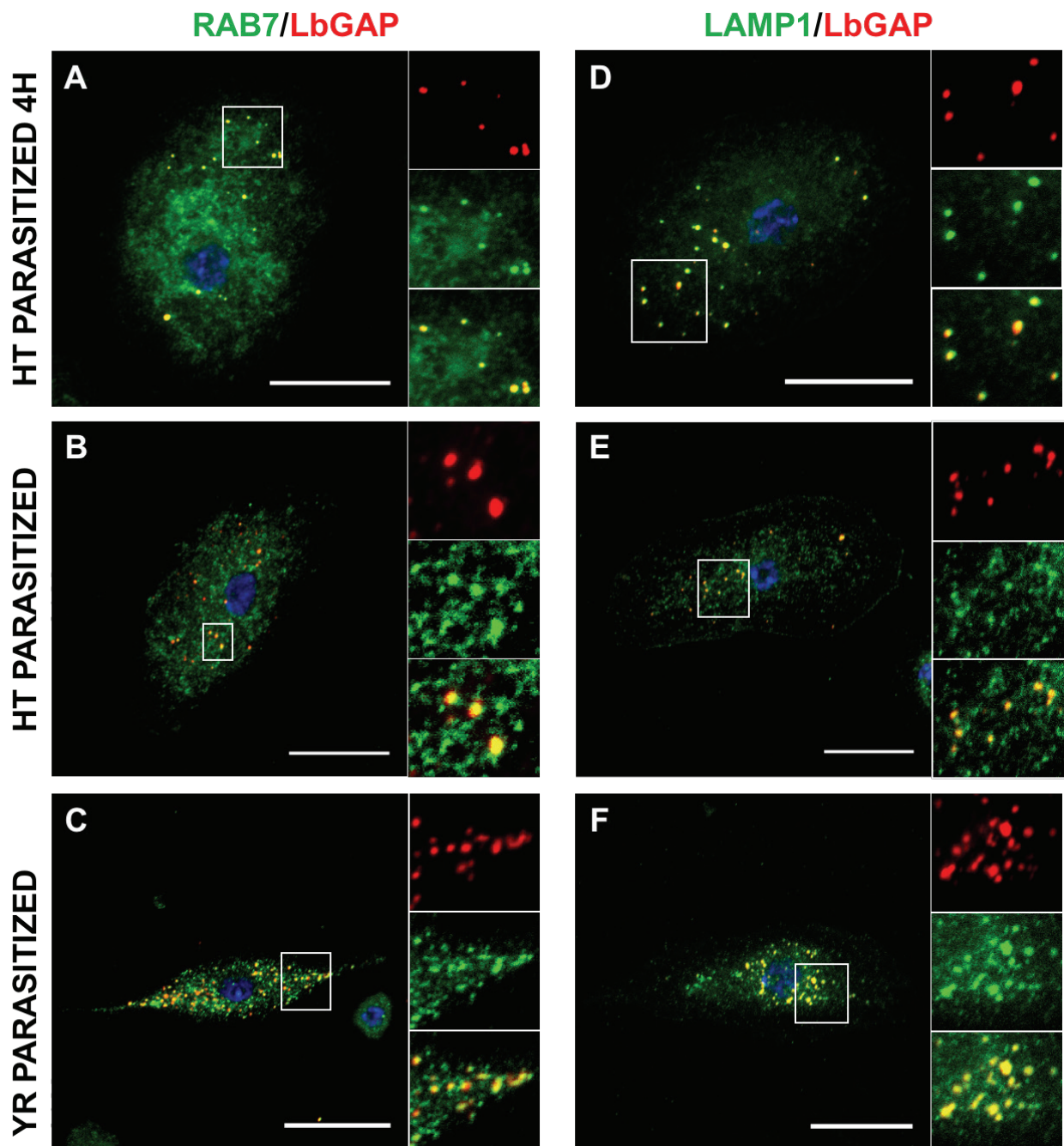
**Figure 5. LbGAP coimmunolocalize with recycling endosomes and endoplasmic compartments in *Drosophila* lamellocytes.** Merged pictures of Hop<sup>Tum-1</sup> (HT) lamellocytes 4h and 18h after injection of larvae with venosomes, fixation and immunostaining with anti-LbGAP antibody (red) and either anti-Rab11 or anti-CNX99 antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the areas). The yellow/orange spots on the merged pictures indicate a co-immunocalization. Nucleus are stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.

## Article 2: Supplementary Materials (Figures S1-S3)

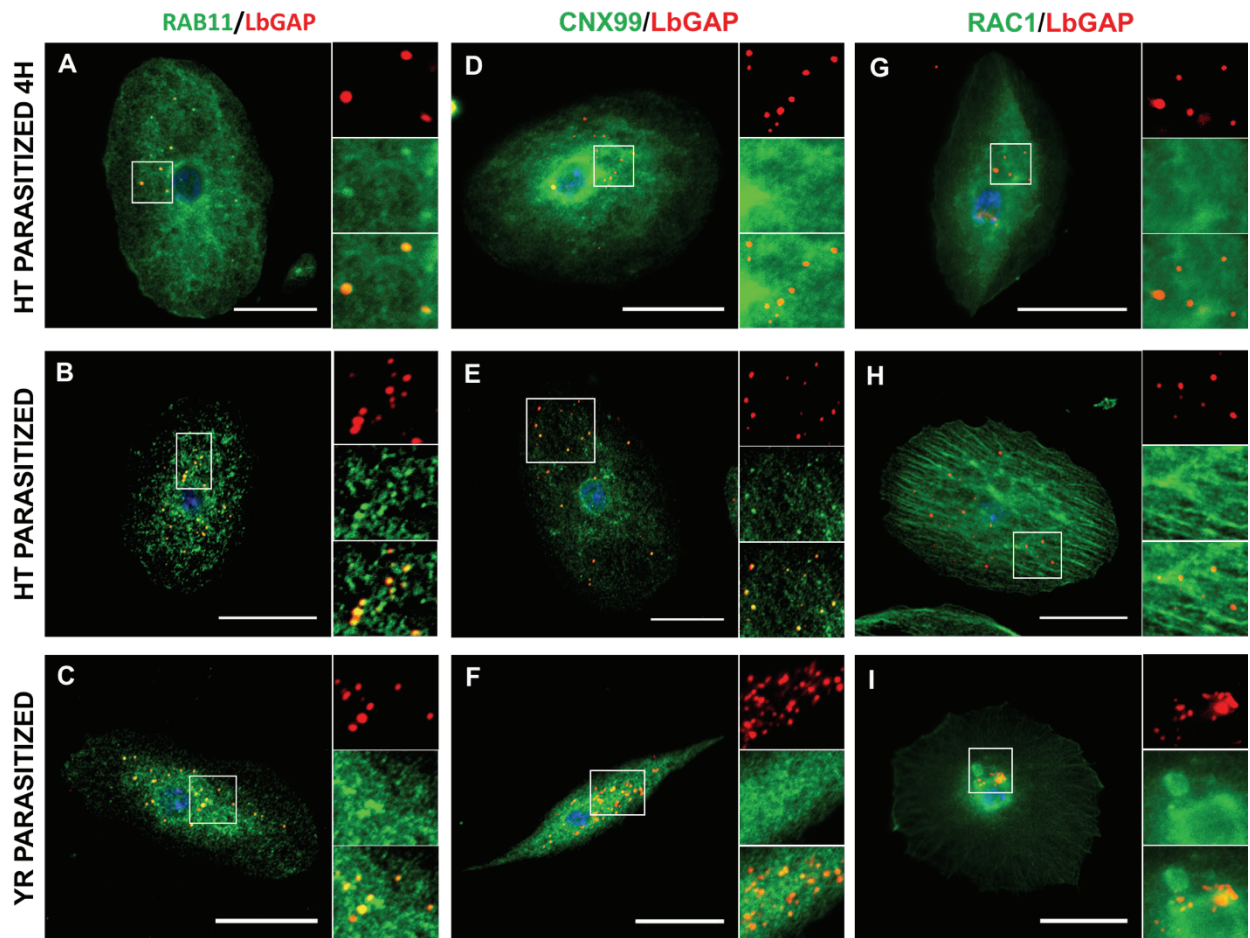


**Figure S1. LbGAP coimmunolocalize only with Raft membrane proteins in *Drosophila* lamellocytes after parasitism.** Merged pictures of lamellocytes fixed and immunostained with anti-LbGAP antibody (red) and either anti-Flotilline 1 (A-C), anti-L1/Attila (D-F) or anti-Myospheroid (G-I) antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the selected area). The yellow spots on the merged picture (A-I) indicate a co-immunocalization between LbGAP and Flotilline 1 or L1/Attila. LbGAP does not colocalize with Myospheroid. A, D, and G, lamellocytes of  $Hop^{Tum-1}$  larvae 4h after parasitism; B, E, and H, 18h after parasitism; C, F and I, lamellocytes of YR larvae 18h after parasitism. Nucleus were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.





**Figure S2. LbGAP coimmunolocalize with Rab7 and Lamp-1 in *Drosophila* lamellocytes after parasitism.** A-F merged images of lamellocytes fixed and immunostained with anti-LbGAP antibodies (red) and either anti-Rab 7 (A-C) or anti-Lamp-1 (D-F) antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the selected area). The yellow spots indicate co-immunocalization. A and D, amellocytes of  $Hop^{Tum-1}$  (HT) larvae 4h after parasitism; B and E, 18h after parasitism; C and F, lamellocytes of YR larvae 18h after parasitism. Nucleus were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.



**Figure S3. LbGAP colocalize with Rab11 or Calnexin99, but not with Rac1.** (A-I) merged images of fixed lamellocytes immunostained with anti-LbGAP antibodies (red) and either anti-Rab11 (A-C), anti-Calnexin 99 (D-F) or anti-Rac1 (G-I) antibodies (Green) (inserts show each individual fluorescence channel and the merged image for the selected area). Yellow spots indicate coimmunocalization of LbGAP and Rab11 or Calnexin99. LbGAP does not colocalize with Rac1. A, D and G, lamellocytes of Hop<sup>Tum-1</sup> (HT) larvae 4h and B, E and H, 18h after parasitism; C, F and I, lamellocytes of YR larvae 18h after parasitism. Nucleus were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 $\mu$ m.



## Article 2: Supplementary Materials (Tables S1-S2)

**Table S1: Commercial antibodies used for the study**

Primary antibodies	Publication	Reseller	Secondary antibodies
Rab 7	Riedel et al., 2016	DSHB (Rab7-s)	Goat anti-mouse IgG (Andy Fluor 488, GeneCopeia; 1/500)
Rab 11	Steiner et al., 2002	BD Biosciences (Cat N <sup>o</sup> : 610656)	
calnexin 99	Riedel et al., 2016	DSHB (Cnx99A 6-2-1)	
Flotilline-1	Volonte et al., 1998	BD Biosciences (Cat N <sup>o</sup> : 610820)	
L1/Attila	Honti et al., 2009	Gift from Dr. Ando	
Myospheroid	Brower et al., 1984	DSHB (CF.6G11)	
Rac-1	Kuroda et al., 1996	BD Biosciences (Cat No: 612652)	
Lamp-1 Rat Fluorescently labelled (Alexa-488)	Fujita et al., 2017	Santa Cruz Biotechnology (Cat N <sup>o</sup> : sc-19992)	none
Rab 5	Huang et al., 2010	Abcam (Cat N <sup>o</sup> : ab31261)	Goat anti-rabbit IgG (Andy Fluor 488, GeneCopeia; 1/500)
Clathrin	Zhang et al., 1998	Sigma (Cat N <sup>o</sup> : 031M4798)	Rabbit anti-goat IgG (FITC, Sigma; 1/500)

Riedel, F., Gillingham, A.K., Rosa-Ferreira, C., Galindo, A., and Munro, S. (2016). An antibody toolkit for the study of membrane traffic in *Drosophila melanogaster*. *Biology Open*, 5, 987–992.

Steiner P, Floyd Sarria JC, Glauser L, Magnin S, Catsicas S, et al. (2002). Modulation of receptor cycling by neuron-enriched endosomal protein of 21 kD. *J Cell Biol*, 157: 1197–1209.

Volonte D, Galbiati F, Li S, Nishiyama K, Okamoto T, et al. (1999). Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. *J Biol Chem*, 274: 12702–12709.

Honti V, Csordás G, Kurucz É, Márkus R, Andó I (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol*, 42: 47–56.

Brower, D.L., Wilcox, M., Piovant, M., Smith, R.J. and Reger, L.A. (1984). Related cell-surface antigens expressed with positional specificity in *Drosophila* imaginal discs. *PNAS USA*, 81(23), pp.7485-7489.

Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. (1996). Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem*, 271(38), pp.23363-23367.

Fujita, N., Huang, W., Lin, T.H., Groulx, J.F., Jean, S., Kuchitsu, Y., Koyama-Honda, I., Mizushima, N., Fukuda, M. and Kiger, A.A. (2017). Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *Elife*, 6, p:e23367.

Huang, H. R., Chen, Z. J., Kunes, S., Chang, G. D., and Maniatis, T. (2010). Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling. *PNAS USA*, 107(18), 8322-8327.

Zhang, B., Koh, Y.H., Beckstead, R.B., Budnik, V., Ganetzky, B. and Bellen, H.J. (1998). Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron*, 21(6), pp.1465-1475.

DSHB: Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biology

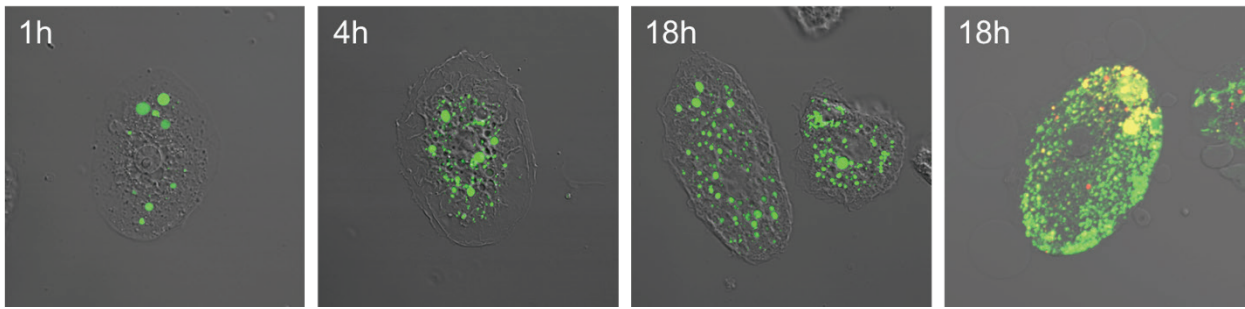
Table S2 : Experimental design

	<i>D. melanogaster</i> Hop <sup>Tum-1</sup>				<i>D. melanogaster</i> YR			
	PARASITISM		INJECTION		PARASITISM		INJECTION	
	4H	18H	4H	18H	4H	18H	4H	18H
Clathrin				+				+
RAB5			+	+				+
FLOTILLINE	+	+	+	+		+		
Atilla/L1	+	+	+	+		+		
RAB7	+	+	+	+		+		
LAMP1	+	+	+	+		+		
RAB11	+	+	+	+		+		
CNX99	+	+	+	+		+		
MYS	+	+				+		
RAC1	+	+				+		

## Discussion de l'article 2

L'entrée des vénosomes dans les lamellocytes semble donc impliquer une voie flotilline / radeaux lipidiques (raft)-dépendante. Le contenu des vénosomes (marqué par LbGAP) est transporté rapidement dans tous les compartiments endosomaux à l'exception de celui de tri Rab5 positif. Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs réflexions et hypothèses.

Dans la plupart des cas, à l'exception de Rac1 et myosphéroïde, nous avons vu clairement une coimmunolocalisation avec un marquage ponctuel précis entre les vénosomes ou les spots de LbGAP et le marqueur utilisé. Cependant tous les spots vénosomes/LbGAP et marqueurs ne correspondent pas, ce qui exclut un possible problème de recouvrement de fluorescence au niveau de la microscopie (bien que le matériel utilisé soit de très haute qualité et que toutes les précautions techniques aient été prises). Un autre problème a été rencontré au niveau de l'observation de la macropinocytose. L'injection dans les larves a été faite avec un mélange de Dextran fluorescent et de vénosomes marqués. Le Dextran s'accumule très fortement au cours du temps (Figure 39) et diffuse dans le cytoplasme des lamellocytes qui sont des cellules très plates (quelques  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sur les bords) avec un renflement cytoplasmique central autour du noyau. Bien que dans la majorité des lamellocytes les vénosomes marqués ne colocalisent pas avec le dextran, dans les cas extrêmes, il devient plus difficile de distinguer les vénosomes et donc d'être certain de la non coimmunolocalisation (Figure 39). La faible épaisseur des cellules est aussi un problème pour les autres marqueurs car en effet, si deux vésicules sont très proches ou une au-dessus de l'autre, le résultat de la superposition informatique des images donnera une fausse coimmunolocalisation. Pour s'affranchir de cet effet, des coupes optiques (Z-stack) pourraient être tentées mais le faible volume cellulaire ne le permet pas.



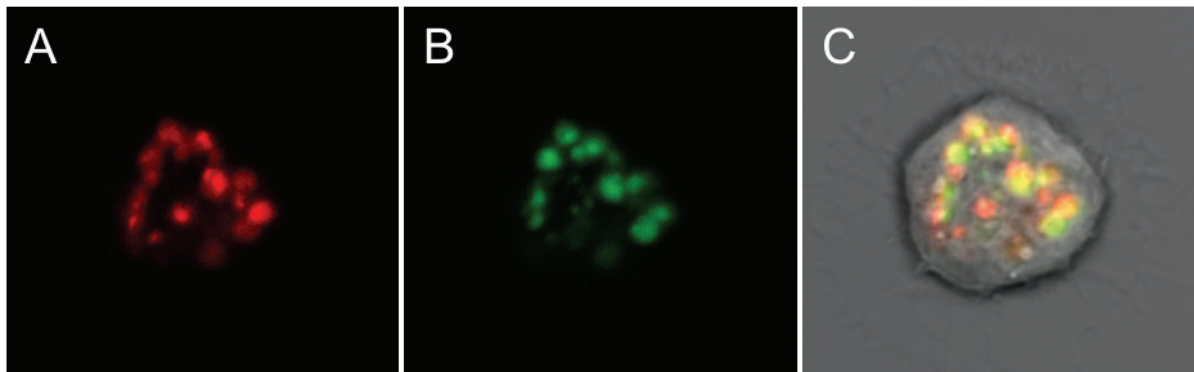
**Figure 39: Accumulation du Dextran fluorescent (vert) dans le cytoplasme des lamellocytes au cours du temps.**

On observe que les cellules après 1h contiennent quelques grandes vacuoles marquées bien différenciées. Après 4h, il y a toujours des grandes vacuoles visibles et un grand nombre de vésicules de petites tailles sont apparues dont le nombre augmente après 18h. A ce moment, dans certains lamellocytes, le cytoplasme est extrêmement chargé en Dextran et il devient difficile de distinguer les spots des vénosomes bien que ceux-ci ne coimmunolocalisent presque jamais avec le Dextran (image de droite, double marquage Dextran en vert et vénosomes en rouge).

Enfin un dernier point est d'ordre cinétique. La plupart des endocytoses se font rapidement (de la milliseconde à la seconde), or nos pas de temps d'observation sont beaucoup plus larges (de l'heure à la dizaine d'heures), dus au temps nécessaire à la microinjection et à la récupération de l'hémolymphe ou au parasitisme et au temps nécessaire ensuite au déclenchement de la réponse lamellocytaire. Ce que nous avons observé est donc pour partie une accumulation et pour partie l'entrée des vénosomes toujours circulants. Il est cependant difficile dans nos conditions de séparer les deux.

Il est possible aussi que les temps de latence soient trop long pour voir le passage dans le compartiment Rab5 positif. Une étude effectuée sur des hémocytes embryonnaires en culture (principalement des plasmocytes) provenant de la mouche mutante pour la dynamine shibire (*shi*) ont montré que ces cellules présentent une endocytose dépendante de la dynamine (comme la voie clatrine) et une indépendante (ressemblant au GEEC) [328]. Dans ces cellules, les membranes contenant du GPI-AP sont endocytées par la voie indépendante de la dynamine et sont dirigées vers les compartiments endosomaux Rab7 positifs sans passer par les Rab5 positifs. Ceci ressemble fortement à ce que nous avons observé et pourrait suggérer des mécanismes similaires d'endocytose dans la lignée hématopoïétique. Nos observations précédentes (Article 1) avaient montré une accumulation de vénosomes dans les plasmocytes et nous avons fait l'hypothèse

qu'ils étaient phagocytés. Lors des expériences de macropinocytose, j'ai observé que les plasmatoctes internalisaient le Dextran, or la phase fluide n'est pas internalisée lors de la phagocytose (Figure 40). Il y a donc également de la macropinocytose chez les plasmatoctes et il semble qu'une partie des vénosomes entre dans ces cellules par cette voie. Il est possible aussi qu'une partie de cette entrée se fasse par la voie GEEC décrite qui internalise aussi la phase fluide [328]. L'effet des vénosomes sur les plasmatoctes reste inconnu, même s'il y a des indications chez *L. heterotoma* que les vénosomes pourraient induire de l'apoptose, mais l'entrée de ceux-ci par une voie autre que la phagocytose méritera d'être étudiée plus en détail.



**Figure 40: Entrée des vénosomes par macropinocytose dans les plasmatoctes ?**

En A) image confocale des vénosomes marqués (rouge) ; en B) Dextran (vert) ; en C) superposition de A et B montrant la colocalisation en jaune. Une partie des vénosomes et du dextran colocalisent, cependant tous les vénosomes ne colocalisent pas avec les vésicules marquées au dextran et inversement. Plasmatocyte de la souche Hop<sup>Tum-1</sup> observé à 18h (Taille de la cellule <10µm).

L'utilisation *in vitro* de lamellocytes Hop<sup>Tum-1</sup> pourrait être envisageable pour des études de cinétiques rapide d'entrée puisqu'il n'y a apparemment pas de différence notable avec la souche YR. Cependant, cela nécessitera beaucoup de mise au point car il faudra en particulier trouver un milieu de culture adéquat pour les lamellocytes qui n'impacte pas leur capacité d'adhésion et permette de les maintenir en vie suffisamment longtemps ainsi que définir les quantités optimales de vénosomes à infuser. En effet, les premiers tests que j'ai effectués avec les vénosomes marqués, même en faible quantité, se sont révélés non concluants car les lamellocytes et les lames de verres montraient un très fort marquage non spécifique (les vénosomes collaient partout). Cette approche

permettrait aussi de tester les différents inhibiteurs d'endocytose qui risquent d'être toxiques s'ils sont injectés dans les larves [329].

Les lamellocytes sont donc des cellules qui échangent beaucoup avec le milieu par différentes voies. Ils utilisent pour ce faire les voies classiques constitutives ECM (indiquée par la présence de clathrine) et la macropinocytose (qui semble être très présente dans ces cellules), mais font aussi appel à des voies inductibles comme la voie flotilline/radeaux lipidiques dépendante. Comme nous l'avons vu dans l'introduction du chapitre, cette voie est particulière en ce qu'elle prend en charge des molécules non reconnues par les adaptateurs de la voie ECM et participe au recyclage de certains récepteurs et des protéines à ancre GPI. Effectivement, nous avons montré qu'une protéine GPI Atilla/L1 présente au niveau de ces cellules colocalise avec LbGAP. Cette protéine qui fait partie de la famille des protéines Ly6 de drosophile (comme boudin, crooked, coiled et crimped) a des similitudes avec l'antigène CD59 des lymphocytes humains [227,229]. La plupart des Ly6 de drosophile sont impliquées dans la formation de jonction serrées (serrate junctions) au niveau des différents épithélium [232,330]. Le rôle d'Atilla/L1 n'est pas connu mais il pourrait intervenir dans la formation des jonctions serrées qui apparaissent entre lamellocytes ou entre lamellocytes et plasmotocytes lors de l'encapsulation. Cependant, l'invalidation de ce gène par l'insertion d'une cassette GFP [226] ne semble pas affecter le phénotype d'encapsulation (observation de l'équipe). L'entrée des vénosomes se fait aussi de façon indépendante au recyclage de la bêta-intégrine myosphéroïde. Myosphéroïde semble distribuée uniformément sur la membrane et peut aussi être endocytée ([113] ; nos observations), cela confirme que seules certaines zones précises de la membrane sont impliquées dans la voie d'entrée des vénosomes et que la sélection se fait certainement par une liaison à un récepteur qui pourrait déclencher des voies de signalisation responsable de cette endocytose (ex : Fyn kinase).

Nous avons également observé, comme dans nos travaux précédents [110,331], que LbGAP perdure sous forme de spots intenses (autour de 0,4  $\mu\text{m}$  pour les plus petits) même après avoir été



libéré de la membrane des vénosomes [331]. LbGAP et d'autres protéines transportées pourraient former une matrice se dissolvant lentement, maintenant une concentration locale élevée pour agir. Dans ce cas, il n'y aurait que peu de facteurs transportés libérés dans le cytoplasme, ce qui pourrait expliquer l'absence observée de coimmunolocalisation avec Rac1 au niveau du cytosquelette. Une possibilité serait que ce matériel encombre/bloque la voie endocytaire cellulaire en agissant localement sur les GTPases, inhibant ainsi la fonction normale et le cycle des vésicules endosomales ce qui entraînerait un empoisonnement de la cellule et l'arrêt du transport à la surface des nouveaux composants tel que myosphéroïde impliqués dans la formation de la capsule [113]. Des études plus spécifiques sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'action et les effets *in vivo* des facteurs transportés.

En conclusion, ce travail apporte une base solide de démonstration du rôle de l'endocytose flotilline/radeaux lipidiques-dépendante dans l'entrée des vénosomes dans les lamellocytes. Des expériences complémentaires pourront être réalisées dans le futur avec des drosophiles RNAi inductibles par exemple pour la flotilline 1 et 2 dans les lamellocytes ou d'autres acteurs importants dans cette voie. Il serait aussi possible d'utiliser des souches exprimant des protéines marquées de façon fluorescentes (ex RabGFP) mais il faudra au préalable tester le phénotype résistant ou sensible des souches de drosophiles utilisées, ou produire des mouches mutantes à partir de la souche Hop<sup>Tum-1</sup>. Enfin, il pourrait être possible de rechercher les voies de signalisation activées en utilisant des marqueurs de phosphorylation disponibles de certains acteurs importants. Le déclenchement de la voie Flotilline/radeaux lipidiques-dépendante étant ligand-récepteur dépendant, on peut aussi faire l'hypothèse qu'il existe un récepteur reconnaissant les vénosomes dans ces domaines lipidiques et donc le rechercher spécifiquement.

La partie suivante de ma thèse constitue une étape pour la recherche des acteurs impliqués dans l'entrée des vénosomes et potentiellement la compréhension de leur action.

**Partie 5**

**Séparation et protéomique des  
lamellocytes de *D. melanogaster***

**Hop<sup>Tum-1</sup>**

## Introduction

La connaissance de la composition en protéines des cellules hémocytaires de drosophile vient de l'utilisation de mutants soit par des études ciblées sur une ou quelques protéines soit par des études globales de type transcriptomiques utilisant différents types de mutants produisant seulement deux des trois types d'hémocytes [234]. La plupart de ces études se font dans le cadre de comparaisons entre des conditions normales et après infection par des pathogènes. La plus complète à ma connaissance a démontré que plus de 2500 transcrits étaient significativement enrichis dans ces cellules et par expression différentielle que certains de ces gènes étaient spécifiques des différents types d'hémocytes [234]. Plusieurs études ont également décrit les profils d'expression de cellules des lignées cellulaires Schneider 2 (SL2) et mbn-2 de *Drosophila* [332,333]. Ces cellules dérivées de cellules embryonnaires hématopoïétiques ont conservé leur capacité à phagocyter des bactéries et à répondre à des substances microbiennes par l'activation *via* Rel / NF- $\kappa$ B de gènes codant pour des peptides antimicrobiens, suggérant que ce sont principalement des plasmacytes. Le protéome des cellules mbn-2 analysées après stimulation avec le LPS bactérien, a identifié 24 protéines intracellulaires qui étaient augmentées et diminuées, dont certaines précédemment non liées à l'immunité innée [334].

Le nombre d'hémocytes circulants totaux dans une larve de drosophile de type sauvage en homéostasie est assez faible (3000 à 10000 hémocytes circulants / larve en fonction du stade larvaire [201]) et il est constitué principalement de plasmacytes même après stimulation par des pathogènes ou des parasitoïdes. Cette prépondérance d'un type cellulaire pose un problème quand on veut faire des études biochimiques sur les autres types d'hémocytes, en particulier les lamellocytes qui ne sont circulants qu'après parasitisme.

Une façon de surmonter en partie ce problème est d'utiliser le mutant Hop<sup>Tum-1</sup> qui produit de manière constitutive un plus grand nombre d'hémocytes et en particulier des lamellocytes qui représentent plus de 30% des hémocytes collectés (estimé par observation microscopique sur > 4500 hémocytes dans l'hémolymphe des L3 de notre souche Hop<sup>Tum-1</sup> à l'état basal). Cependant, même dans ces conditions se posent d'autres problèmes, comme celui de la quantité d'hémolymphe disponible par larve qui n'est que de quelques centaines de nanolitres dans une larve L3 [335] et la façon de séparer les lamellocytes des autres cellules. Des études récentes ont montrées que les techniques de cytométries en flux permettaient de distinguer les types différents d'hémocytes portant des protéines avec des étiquettes fluorescentes ou avec des marqueurs de

surface [46,336]. Cette approche permettrait de trier plus facilement les cellules mais elle n'a été à ma connaissance utilisée que pour obtenir des plasmacytes extraits de la glande lymphatique de mutant Hop<sup>Tum-1</sup> [337]. Bien que rapide et adaptable à un faible nombre de cellules, cette technique nécessite soit l'utilisation de mutants soit de marquages cellulaires, ainsi que la disponibilité d'un appareillage spécifique.

Une méthode plus abordable est la séparation en gradient de densité (ex : gradient de percoll) utilisée couramment en clinique humaine et déjà avec succès chez certains insectes [338–340]. Par exemple, Pech et al. [340] ont séparé les plasmacytes des cellules granulaires et des sphérulocytes de l'hémolymphe de *Pseudaletia includens* (Lepidoptera : Noctuidae) avec une pureté supérieure à 99% pour les plasmacytes. Pour ce faire, ils sont partis de  $2 \times 10^6$  cellules qui contenaient déjà presque 70% de plasmacytes. Dans la plupart de ces études, la purification était très bonne pour les plasmacytes, mais ne permettait pas de séparer les autres types cellulaires.

Les plasmacytes et les lamellocytes de *D. melanogaster* ayant une morphologie et une taille très différentes, j'ai entrepris de les séparer par leur différence de densité sur gradient de Percoll. Après de nombreuses tentatives en utilisant des gradients avec des gammes de densité différentes, et en miniaturisant la méthode, j'ai mis au point une méthodologie répétable qui m'a permis d'obtenir une fraction contenant entre 70 et 80% de lamellocytes.

J'ai utilisé cette fraction enrichie en lamellocytes pour effectuer une étude protéomique tout d'abord de leurs protéines majeures séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) et ensuite de leur protéines membranaires de surface après biotinylation et purification par affinité.

L'analyse présentée sous forme de pré-article en français n'est pas encore définitive car comme avec toutes les méthodes produisant une grande masse de données, beaucoup de temps est nécessaire pour en tirer un maximum d'informations pertinentes. Les résultats de la protéomique des membranes ne me sont parvenus que récemment et cette partie est donc la moins aboutie et nécessitera encore (beaucoup) de travail.

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr M. Belghazi, Plateforme de Recherche en Neurosciences-CAPM, Faculté de Médecine-secteur Nord, Aix Marseille Université.

## Résumé

Chez *Drosophila melanogaster*, les hémocytes constituent le système immunitaire inné cellulaire des larves et des adultes. Trois principaux types d'hémocytes circulants ayant des fonctions distinctes ont été décrits : plasmatocytes, cellules cristallines et lamellocytes. Ces types de cellules sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et dans la réponse aux blessures, aux micro-organismes pathogènes et aux parasites. Dans des circonstances normales, très peu de lamellocytes circulent mais leur nombre augmente fortement après l'oviposition par une guêpe parasitoïde, leur rôle principal étant leur participation à la réponse d'encapsulation-mélanisation de l'œuf de parasitoïde. Grâce au mutant Hop<sup>Tum-1</sup> de *D. melanogaster* produisant constitutivement un nombre élevé de lamellocytes circulants, nous avons mis au point une méthode de purification de ces cellules et analysé les protéines majeures après séparation par électrophorèse 2D et les protéines membranaires purifiées après biotinylation par 1D. L'analyse par spectrométrie de masse de 70 spots de 2D a identifié 514 protéines et 390 dans les 25 bandes 1D provenant de protéines membranaires purifiées. 388 (2D) et 263 (1D) protéines sont uniques à une analyse et 117 sont trouvées dans les deux, soit au total 768 protéines uniques. La technique de purification a montré un enrichissement de nombreuses protéines de la membrane plasmique et permis leur identification. Nos données ont confirmé la présence de marqueurs connus (Myosphéroïde, Prophénoloxydase 3, Atila/L1) et décrit un grand nombre de protéines impliquées dans différentes fonctions de ces cellules (réarrangement du cytosquelette, chaperons, signalisation cellulaire, sécrétion, endocytose, etc.). Cette étude fournira la base pour une meilleure compréhension de la physiologie des lamellocytes et de leur rôle dans la réponse immunitaire au parasitisme. Elle pourra servir aussi à établir de nouveaux marqueurs membranaires pour mieux caractériser les populations différentes de lamellocytes et leur rôle respectif dans la réponse au parasitisme.

## Matériels et méthodes

### Séparation des lamellocytes Hop<sup>Tum-1</sup> de *D. melanogaster* sur gradient discontinu de Percoll.

La souche *D. melanogaster* Hop<sup>Tum-1</sup> (n°8492, Bloomington Drosophila Center) a été élevée sur un milieu standard (10% de farine de maïs, 10% de levure, agar et nipagine) à 25 ° C avec un cycle 12 / 12h lumière / obscurité et 50% d'humidité. L'hémolymphe a été recueillie à partir des larves tardives L2 ou jeunes L3. Les larves ont été lavées trois fois dans du PBS et la cuticule sur la partie antérieure des larves a été délicatement déchirée avec des pinces fines dans une goutte de solution de Ringer Insecte (IR).

Une solution mère fraîche de Percoll à 90% (GE Healthcare) a été préparée par dilution 9 : 1 (v/v) avec de l'IR 10x. Cette solution mère a ensuite été diluée avant utilisation avec IR pour préparer des solutions à une concentration finale de 50%, 40%, 20% et 10%. Le gradient discontinu a été formé dans des tubes à fond rond de 750 µl en ajoutant du fond vers le haut 150 µl de solution de Percoll à 50%, 200 µl à 40%, 150 µl à 20% et 100 µl à 10%. 100 µl d'hémolymphe diluée provenant de 100 larves ont été déposés au sommet du gradient et centrifugés à 500 g pendant 30 min (4°C) en utilisant un rotor oscillant. Sept fractions de gradient de 100 µl chacune ont été délicatement prélevées du haut (fraction 1) vers le fond (fraction 7) du tube en utilisant une seringue Hamilton afin de ne pas abîmer les cellules. Dans une première étude, pour déterminer la position et le type de cellules dans le gradient, chaque fraction a été divisée en trois : 50 µl pour l'observation microscopique, 50 µl qui sont centrifugés à 500g, et le culot repris dans 200 µl d'IR, centrifugé à nouveau et resuspendu dans 50µl avant traitement pour uséparation par SDS-PAGE 1D (25 µl pour une coloration à l'argent et 25 µl pour western blot).

### Marquage à la biotine, extraction et purification des protéines membranaires.

La fraction enrichie en lamellocytes (100 µl) a été mélangée avec 2 mM de NHS-SS-PEO4-biotine (un composé couplant clivable et non perméable (Interchim)) et incubée pendant 30 min (4°C) sous agitation douce.

Les cellules marquées ont été recueillies par centrifugation (500 g pendant 10 minutes) et lavées une fois avec 100 µl d'IR-BSA à 3% pour inactiver la NHS-SS-PEO4-biotine résiduelle libre. Après un second lavage avec 200 µl d'IR, le culot cellulaire a été mis en suspension dans 200 µl

de solution d'extraction (solution 1 : IR supplémenté avec 30 mM Octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (Sigma), 0,5% Tween (Sigma) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (SigmaFAST Protease Inhibitor Cocktail EDTA free, Sigma)) et incubé pendant 30 minutes à 4 ° C. Les protéines membranaires extraites ont été récupérées dans le surnageant après une centrifugation de 10 min, à 5 000g (4°C) pour éliminer les débris et noyaux non solubilisés, puis mélangées avec des billes magnétiques de streptavidine (GE Healthcare) et incubées pendant 1h à 4°C sous agitation modérée. Avant utilisation, les billes de streptavidine (25  $\mu$ l de suspension) ont été lavées deux fois dans 500  $\mu$ l d'IR, incubées avec 500  $\mu$ l d'IR-BSA à 3% pendant 30 minutes, rincées avec IR et incubées avec la solution 1 pendant 1 heure. Après incubation avec les protéines biotinylées, les billes sont recueillies, lavées une fois avec 100  $\mu$ l de la solution 1 et de nouveau avec 10x IR pour éliminer les protéines non spécifiquement liées. Les protéines liées à l'avidine ont été libérées par chauffage à 96°C pendant 10 mn en présence de 30  $\mu$ l de tampon Laemmli dilué 2x contenant 5% de  $\beta$ -mercaptoethanol pour cliver la liaison S-S du bras de la NHS-biotine. Les échantillons ont été utilisés directement ou stockés pendant une courte période. Une quantité équivalente de protéines membranaires extraites non-marquées a été traitée de la même façon pour servir de témoin.

## Immunohistochimie.

L'immunochimie a été faite comme décrite dans les articles précédents. Une goutte de 50  $\mu$ l d'hémolymphe (ou de fractions) a été transférée au centre d'une lamelle couvre-objet dans une plaque de culture à 12 puits pour former une chambre humide et les cellules ont été laissées adhérer pendant 1h. Pour les protéines intracellulaires : une fixation de 15 min avec du formaldéhyde à 4% dans du PBS a été faite. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS, puis incubées en PBS-0,1% de Triton 100X (PBS-T) pendant 20 minutes. Pour les protéines membranaires : les cellules ont été fixées 6 min avec 100% d'acétone et lavées 3 fois avec du PBS, puis incubées avec du PBS 0,3% de BSA pendant 30 minutes.

Pour l'immunolocalisation, après perméabilisation ou fixation à l'acétone, les cellules ont été incubées avec l'un des anticorps primaires décrits précédemment ou indiqués ci-dessous. Après une heure d'incubation à température ambiante, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire. L'actine est marquée à la phalloïdine (7nM, phalloïdine alexa 490,  $\lambda_{exc}$  \  $\lambda_{em}$  491/515nm, (Interchim). Après trois lavages en PBS et un avec de l'eau désionisée, la lamelle couvre-objet a été montée sur une lame en utilisant un milieu anti-fading contenant du DAPI (Interchim) pour marquer le noyau.



La surface des hémocytes purifiés a été estimée à partir des images d'hémocytes colorés analysées en utilisant le logiciel Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Les images numériques prises avec le microscope axioplan Z1 (objX20 ; Zeiss) ont été numérisées puis contrastées et les cellules transformées en ROI pour mesurer leur surface. Les cellules ont été regroupées en 6 classes en fonction de leur surface ( $25 < 100 \mu\text{m}^2$  ;  $100 < 250 \mu\text{m}^2$  ;  $250 < 400 \mu\text{m}^2$  ;  $400 < 625 \mu\text{m}^2$  ;  $625 < 900 \mu\text{m}^2$  ;  $> 900 \mu\text{m}^2$ ).

Primary antibodies	Publication	Seller	Secondary antibodies
G-beta	Gao et al., 2013	Santa Cruz Biotechnology (Cat N°:sc-378)	goat anti-rabbit IgG (Fluoprobes 488, Interchim; 1/500)
CD 26 dipeptidyl peptidase-4	Saglam et al., 2015	Santa Cruz Biotechnology (Cat N°:sc-9153)	
PO3	Polyclonal de lapin anti-peptide	Equipe	
Atila/L1	Polyclonal de lapin anti-peptide	Equipe	

Gao, X., Sinha, S., Belcastro, M., Woodard, C., Ramamurthy, V., Stoilov, P. and Sokolov, M. (2013). Splice isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase control the expression of heterotrimeric G proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 288(36), pp.25760-25768.

Sağlam, Ö., Ünal, Z.S., Subaşı, C., Ulukaya, E. and Karaöz, E. (2015). IL-6 originated from breast cancer tissue-derived mesenchymal stromal cells may contribute to carcinogenesis. *Tumor Biology*, 36(7), pp.5667-5677.

## Séparation SDS-PAGE

Pour la SDS-PAGE 1D, les protéines ont été séparées sur un gel à 12,5% dans des conditions réductrices. Les échantillons mélangés avec du tampon Laemmli en présence de 2,5% de  $\beta$ -mercaptoethanol sont chauffés pendant 10 minutes à 95 ° C avant le chargement. Les gels ont été colorés à l'argent selon Morrissey [341].

Séparation en deux dimensions 2D [342,343]: pour la première étape, la focalisation isoélectrique (IEF), la fraction contenant les lamellocytes a été centrifugée et le culot remis en suspension dans 35 $\mu$ l d'IR, mélangée avec 5 $\mu$ l de solution de solubilisation dénaturante (dithioérythritol 0,15M, SDS 10%) et chauffée à 95°C pendant 5 min. Après refroidissement, l'échantillon est mélangé (1/1; v/v) avec une solution 9,2M d'urée, 0,1M de dithioérythritol et 2% de CHAPS. L'IEF est réalisée en utilisant un gel en tube à 4% d'acrylamide contenant 9,2 M d'urée, 2% d'ampholytes [1% de pH 3-10 (Pharmacia) et 1% de pH 2-11 (Servalytes)] et 2% de CHAPS. Après migration, le gel IEF est incubé avec du tampon réducteur Laemmli 4x et déposé sur un gel SDS-PAGE 1D

à 12,5%. Après séparation, les protéines sont colorées à l'argent. Les marqueurs de poids moléculaire sont un mélange de protéines prédéfinies de 10 à 170 kDa (Thermo Scientific).

## Immunoblotting

Après 1D SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été bloquée avec 2% de lait écrémé dans du TBS-Tween 0,1% (TBS-T) et incubée pendant une nuit à 4 ° C avec les anticorps indiqués. Les membranes sont incubées après 3 lavages en TBS-T incubées avec les anticorps secondaires peroxydase (1/2 000 pendant 2 h en TBS-T-Lait écrémé). Après trois lavages avec du TBS-T, la membrane a été révélée en utilisant le substrat chémoluminescent (Immobilon, Millipore) et imagée avec un analyseur numérique (Chemi Genius2).

## Spectrométrie de masse

L'identification des protéines par spectrométrie de masse a été réalisée par Ion Trap LC-MS/MS (Q exactive, Thermofischer scientifique). Les spots et les bandes excisées des gels ont été traitées à la trypsine (10 ng/ $\mu$ l trypsin (Promega)) pour générer les fragments de protéines comme décrit précédemment [342].

L'analyse des données a été réalisée avec le logiciel Mascot (<http://www.matrixscience.com>) à l'aide de la base de données NR *D. melanogaster* du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, March 3rd 2017). Les critères de validation des données étaient (i) un peptide avec un score ionique individuel supérieur à 50 (le seuil d'identité significatif de Mascot correspondant à  $p < 0,05$  est de 43 dans notre cas) ou (ii) au moins deux peptides de score ionique individuel supérieur à 20 (correspondant à 1 % de probabilité qu'un spectre de peptide corresponde à un événement aléatoire). Le score a été calculé comme  $-10\log(P)$ . Le FDR calculé variait de 0,11% pour les protéines biotinylées et de 2,9% pour les spots 2D. L'analyse a été effectuée avec une tolérance de masse d'ions pour les fragments de 0,02 ppm et une tolérance d'ions parents de 10 ppm. La carbamidomethylation des cystéines et l'oxydation de la méthionine indiquée comme une modification variable pour le calcul des masses de peptide. Le maximum de clivage manqué autorisé a été fixé à 2. La modification résiduelle des peptides par la biotine a été prise en compte [344].

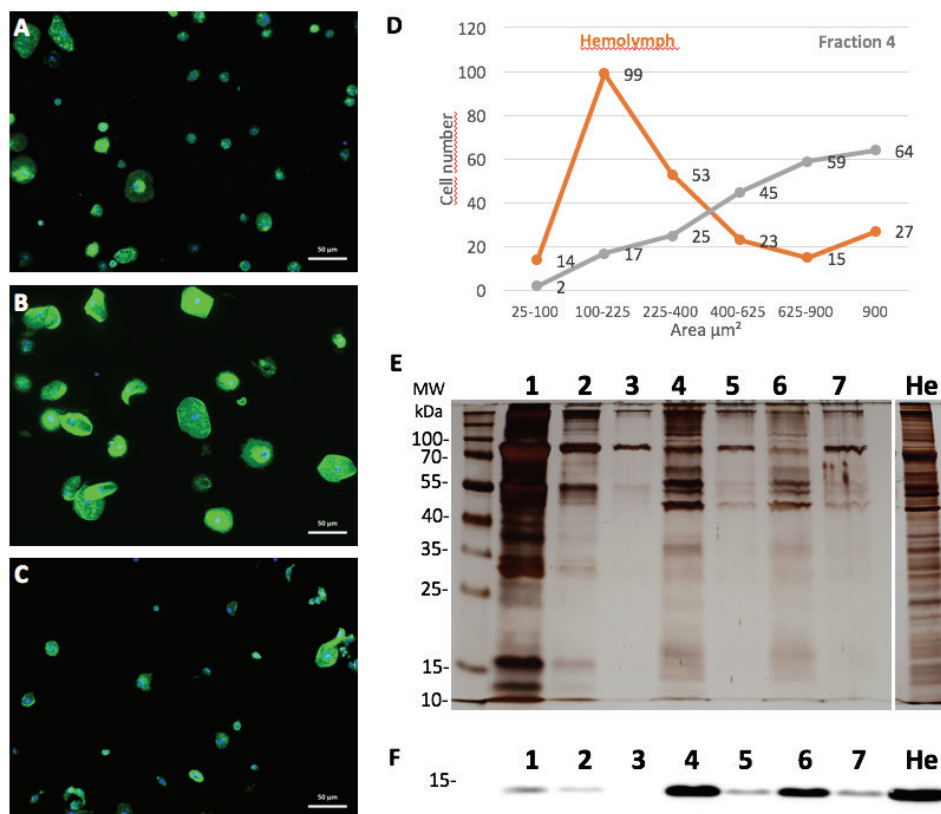
## Analyse de GO.

Pour chaque protéine identifiée, son nom ou numéro de gène ainsi que les informations le concernant a été récupéré dans Flybase (<http://flybase.org>). La liste des identifiant de gènes à été introduite dans l'outil PANTHER™ Version 13.0 sur le site <http://pantherdb.org> en sélectionnant *D. melanogaster* comme organisme pour obtenir la liste des GO. Ceux-ci ont été ensuite classés suivant les fonctions moléculaires et les processus cellulaires.

## Résultats

### Purification des lamellocytes

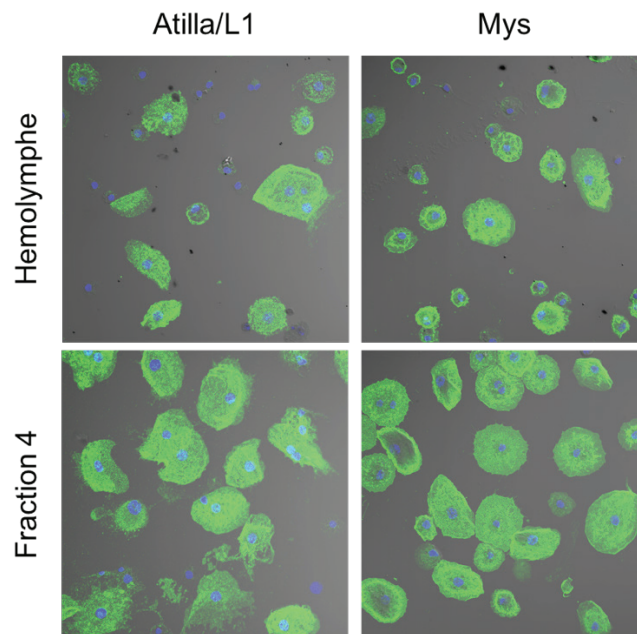
L'hémolymphe provenant de 100 larves a été séparée sur un gradient de Percoll discontinu. L'analyse microscopique des 7 fractions collectées (Figure 1) montre que les cellules sont principalement à l'interface de deux couches correspondant à la fraction 4 (Percoll 20-40%) et la fraction 6 (Percoll 40-50%). Dans la fraction 4, entre 70 et 80% des cellules sont larges et plates, ressemblant à des lamellocytes, et ayant une taille supérieure à 30 $\mu\text{m}$  correspondant à une surface supérieure à 400 $\mu\text{m}^2$  (Fig 1B, 1C; Figure 2). La fraction 6 contient des grandes et des petites cellules ressemblant principalement aux plasmatocytes (Fig 1C). Ces deux fractions présentent un profil protéique caractéristique (Fig 1E) différent de l'hémolymphe totale et sont toutes deux enrichies en marqueur Atila / L1 (Fig 1F).



**Figure 1 : Purification des lamellocytes par gradient de densité.** A-C, images en microscopie confocale des hémocytes présents dans l'hémolymphe de départ (A) et dans les couches 4 (B) et 6 (B) du gradient de percoll (marquage du cytosquelette d'actine en vert par la phalloïdine). D) distribution des surfaces des hémocytes dans l'hémolymphe (orange) et dans la fraction 4 (gris) montrant l'enrichissement en cellules de grande taille. E-F) SDS-PAGE 12,5 % des différentes fractions du gradient (1-sommet, 7-fond) et de

l'hémolymph total (He) colorée à l'argent (E) ou d'un western blot révélé avec l'anticorps polyclonal anti Atila/L1. Les fractions 4 et 6 sont enrichies en lamellocytes.

Pour s'assurer que les cellules enrichies de la fraction 4 sont en effet des lamellocytes, nous les avons immuno-marquées avec des anticorps monoclonaux contre Atila/L1 et myosphéroïde. Dans l'hémolymph, seuls les lamellocytes (cellules de taille  $> 30 \mu\text{m}$ ) sont marqués par les deux anticorps (Figure 2), ce marquage a été retrouvé sur presque toutes les cellules de la fraction 4 indiquant qu'il s'agit principalement de lamellocytes.

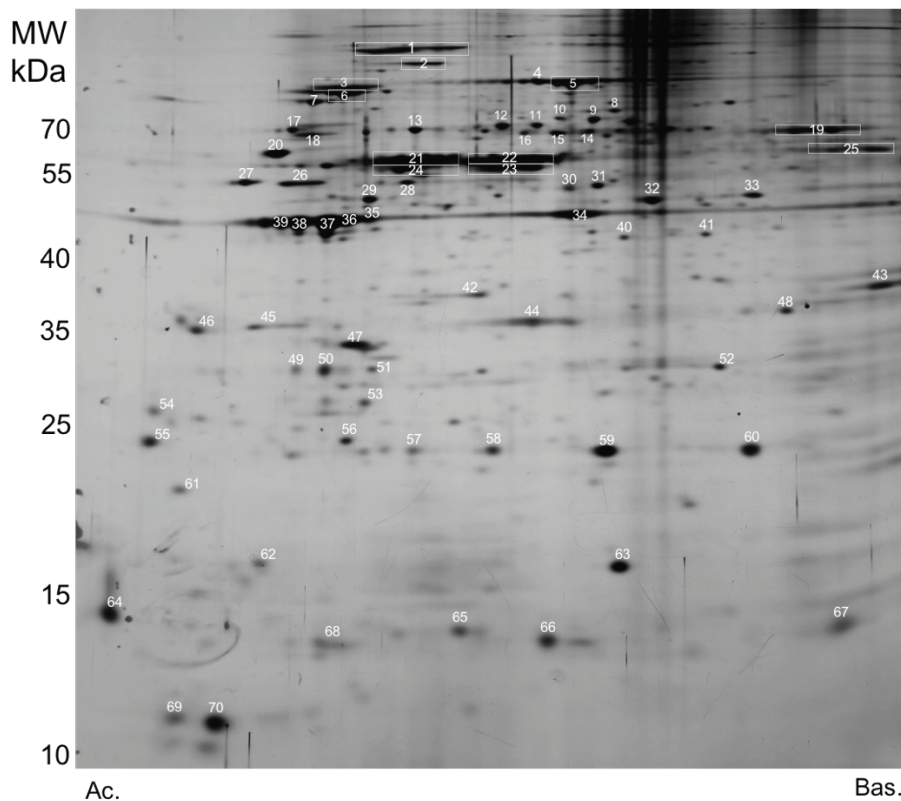


**Figure 2 : Identification des lamellocytes purifiés sur gradient de densité.** Images en microscopie confocale des hémocytes présents dans l'hémolymph (images du haut) et dans la couche 4 après marquage (bas) avec les anticorps monoclonaux Atila /L1 [226] ou mysosphéroïde (Mys). En bleu, les noyaux marqués au DAPI. Dans l'hémolymph, de nombreuses cellules ne sont pas marquées par les anticorps (noyaux seuls en bleu) alors que quasiment toutes le sont dans la fraction 4.

## Analyse protéomique des protéines majeures des lamellocytes

Puisque la fraction 4 était fortement enrichie en lamellocytes, nous l'avons utilisée directement pour effectuer la séparation en 2D des protéines cellulaires solubilisées (Figure 3). Plusieurs centaines de taches protéiques ont été observées et nous avons choisi les 70 plus intenses pour l'identification. Par spectrométrie de masse, plus de 500 protéines ont été identifiées en utilisant la base de données *D. melanogaster* NCBI (voir les Table I et Table S1) indiquant que dans certains cas, plus d'une protéine était présente, en particulier dans les hauts poids moléculaires où le pouvoir

résolutif du gel est moindre. Ce grand nombre d'identifications est aussi rendu possible par la sensibilité de la spectrométrie de masse à piège ionique qui détecte de très faibles quantités de protéines comprenant les produits de dégradation des protéines les plus intenses.



**Figure 3 : Gel bidimensionnel des protéines extraites des lamellocytes.** Les protéines sont séparées suivant leur point isoélectrique (Ac, côté acide ; Bas, côté basique de l'IEF), puis par SDS-PAGE 12,5%. Les spots majeurs (1 à 70) ont été découpés et analysés par spectrométrie de masse. Gel coloré à l'argent.

L'identification de la protéine la plus abondante pour chacun de ces 70 spots et certaines de leurs caractéristiques et fonctions sont données dans la Table I. Il est à noter qu'aucune protéine majeure de l'hémolymphe telle que les protéines sériques larvaires (LSP) [345,346] n'a été trouvée en grande quantité dans cette étude, suggérant que notre procédure élimine bien ces protéines. Dans certains cas, la même protéine a été identifiée dans plusieurs spots proches (ou train de spots) indiquant que différentes isoformes, certainement dues à des modifications post-traductionnelles ou à la protéolyse, sont présentes. Presque toutes les protéines majeures présentent le poids moléculaire théorique attendu sur le gel.

La protéine décrite comme spécifique aux lamellocytes dans cette première liste est la prophenoloxdase 3 (PPO3) (spots 4, 5 et 30, ce dernier pouvant contenir un produit de dégradation). Comme attendu pour une protéomique cellulaire, les spots les plus intenses sont les

composants du cytosquelette, actine et tubuline et leurs protéines associées, des protéines impliquées dans le trafic des vésicules et des protéines, des chaperonnes, des protéines de signalisation et du métabolisme (Table I). Plusieurs protéines impliquées dans la protection cellulaire contre les dommages oxydatifs et participant également aux cascades de signalisation et à la détoxification cellulaire sont également parmi les plus intenses. Nous avons également identifié certains composants mitochondriaux.

**Table I: Protéines majeures identifiées dans chacun des spots d'électrophorèse 2D. Caractéristiques et fonctions.**

Spot	Protein name	Gene symbol	Highlights on functions	Theor MW
1	Glycoprotein 93	<i>Gp93</i>	To cope with macromolecular damage during heat shock and stress, heat shock proteins maintain proteostasis by refolding or degrading denatured proteins and preventing aggregations. Gp93, a member of HSP90 family, is a resident ER luminal chaperone required for the functional expression of protein domains that display adhesion activity such as integrins or involved in immune response such as Toll-like receptors (TLRs). (1,2)	90182
2	Heat shock protein 83	<i>Hsp83</i>	Hsp83 a member of HSP90 family, is the <i>Drosophila</i> homologue of Hsp90. The rescued by hyperthermia of the proper localization of the beta-integrin Myospheroid after parasitization in Rac1 mutants lamellocytes involved the heat shock protein Hsp83. (3)	81814
3	Heat shock 70-kDa protein cognate 3 (GRP78) (BIP)	<i>Hsc70-3</i>	Hsc70-3 is one of the six <i>Drosophila melanogaster</i> Hsp70. This protein is a key indicator of ER stress. It binds to the endoplasmic reticulum (ER) stress-regulated transmembrane transcription factor ATF6 and the dissociation during ER stress allows ATF6 to be transported to the Golgi (4). Reversible AMPylation regulates the function of Hsc70-3, deAMPylation during an ER stress response allows its activation as chaperone (5).	72190
4	Phénoloxidase 3 ; DoxA3 ; PPO3	<i>PPO3</i>	PPO is activated sequentially by serine proteases upon solubilization in the haemolymph. PO catalyses the oxidation of mono- and diphenols to ortho-quinones, which subsequently polymerize into melanin. The <i>Drosophila</i> genome encodes three PPOs; DoxA1 (PPO1) and CG8193 (PPO2), which are expressed on crystal cells, and DoxA3 (CG42460 or PPO3) expressed mainly on lamellocytes (6).	79264
5	Phénoloxidase 3 ; DoxA3 ; PPO3	<i>PPO3</i>		79264
6	Heat shock protein 70 kDa cognate 4; Hsc70-4; Hsc4	<i>Hsc70-4</i>	The 70 kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) catalyzes in vitro and in vivo the uncoating of clathrin-coated vesicles, the final step of receptor-mediated endocytosis. Hsc70-4 is one of the most abundant synaptic proteins. It has both and exclusive regulated chaperone activity and a membrane deforming activity involved in endosomal microautophagy (7). It is also involved in Ca <sup>2+</sup> dependent exocytosis (8).	71087
7	V-type proton ATPase catalytic subunit A isoform 2	<i>Vha68-2</i>	V-ATPases are proton pumps which transport H <sup>+</sup> across eukaryotic membranes, play a role in cotransport processes and have been implicated in functions such as ion transport and fluid secretion across plasma membranes. Cells lacking V-ATPase function display impaired acidification of the endosomal compartment and a correlated failure to degrade endocytic cargoes.	68259



8	Flare, isoform A; Actin interacting protein 1 (AIP1)	<i>flr</i>	flare (AIP1) is a protein promoting cofilin-mediated F-actin disassembly.	66509
9	Chaperonin containing TCP1 subunit 6; T-cp1zeta	<i>CCT6</i>	CCTs form a chaperonin complex involved in folding of many cytoskeletal components and cell cycle regulators and are involved in the folding of large proteins and proteins with WD repeats (9).	58210
10	Chaperonin containing TCP1 subunit 6; T-cp1zeta	<i>CCT6</i>		58210
11	Chaperonin containing TCP1 subunit 1; T-cp1alpha	<i>CCT1</i>		59519
12	Chaperonin containing TCP1 subunit 5; T-cp1epsilon	<i>CCT5</i>		59241
13	Chaperonin containing TCP1 subunit 2; T-cp1beta	<i>CCT2</i>		58027
14	Stress induced phosphoprotein 1; Hsp70/Hsp90 organizing protein; HOP	<i>Stip1</i>	Overexpression of stress-induced phosphoprotein 1 (STIP1) is a co-chaperone of heat shock protein (HSP) 70/HSP90. The N-terminal fragment of STIP1 interacts with the N-terminus of JAK2, whereas the C-terminal domain mediates the interaction with HSP90 and STAT3. The interaction stabilizes the JAK2 protein (10).	55663
15	Chaperonin containing TCP1 subunit 7; T-cp1eta	<i>CCT7</i>		59349
16	Chaperonin containing TCP1 subunit 7; T-cp1eta	<i>CCT7</i>		59349
17	Heat shock protein 60A	<i>Hsp60A</i>	Hsp60A is a mitochondrial chaperone.	60758
18	Chaperonin containing TCP1 subunit 8 ; T- cp1theta	<i>CCT8</i>		59396
19	Glutamate dehydrogenase	<i>Gdh</i>	Glutamate dehydrogenase (GDH) is the main enzyme for glutamate metabolism that catalyzes the reversible oxidative deamination of L-glutamate to $\alpha$ -keto-glutarate using NAD <sup>+</sup> and/or NADP <sup>+</sup> as coenzymes. Since insect hemolymph contains extremely high levels of glutamate, GDH is speculated to function as a regulator of insect amino acid metabolism (11), GDH is localized mainly in the mitochondria but is also found in the cytoplasm (12).	60941
20	Protein disulfide isomerase	<i>Pdi</i>	Protein disulfide isomerase (PDI) is a member of the thioredoxin superfamily of redox proteins with three catalytic activities: thiol-disulfide oxidoreductase, disulfide isomerase and redox-dependent chaperone. As a chaperone, PDI resides normally in the lumen of the ER but is been also detected at the cell surface, the cytosol and as circulating secreted enzyme (ref).	55746
21	$\beta$ -Tubulin at 60D; Tubulin-beta-3	<i><math>\beta</math>Tub60D</i>	The drosophila genome possesses 5 $\alpha$ - and 4 $\beta$ -tubulin genes, each encoding a specific isoform. $\alpha$ - and 4 $\beta$ -tubulin forms heterodimers that polymerized into microtubules. Tubulins are expressed in a specific tissue and temporal pattern. Microarray study indicated that <i>beta-Tubulin at 60D</i> is highly expressed in Hop <sup>Tum-1</sup> hemocytes (13).	50745
22	$\alpha$ -Tubulin at 85E; Tubulin alpha-2 chain	<i><math>\alpha</math>Tub85E</i>	In adult flies the Tubulin alpha-2 chain gene is expressed only in males, where it may be testes-specific.	49935
23	$\alpha$ -Tubulin at 85E; Tubulin alpha-2 chain	<i><math>\alpha</math>Tub85E</i>		49935
24	$\beta$ -Tubulin at 56D, isoform B	<i><math>\beta</math>Tub56D</i>		50115
25	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit precursor; bellwether	<i>blw</i>	Mitochondrial ATP synthase synthesizes ATP from ADP and inorganic phosphate using the energy provided by the proton electrochemical gradient across the inner mitochondrial membrane.	59384
26	Calreticulin	<i>Calr</i>	Calreticulin is a lectin-type calcium-binding chaperone, promoting folding, assembly and quality control in the ER.	46779

27	ATP synthase beta subunit	<i>ATPsynβ</i>	A subunit of mitochondrial ATP synthase. Glutathionylation of the ATP synthase β subunit is essential for its activity (14).	53487
28	GDP dissociation inhibitor, isoform A	<i>Gdi</i>	Rab GDP dissociation inhibitor is a down-regulator of Rab-GTPases such as Rab11 involved in the exocytic transport of lipids, receptors and transporters. Gdi binds to GDP-Rabs allowing the transfer of these essential proteins for membrane trafficking from donor to acceptor membranes or to form a cytoplasmic pool (15)..	49871
29	Eukaryotic translation initiation factor 4A	<i>eIF-4A</i>	In eukaryotes, translation initiation is facilitated by multiple protein factors collectively called eIFs (for eukaryotic translation initiation factors). The complex consisting of the eIF4 group factors including the mRNA cap-binding eIF4e protein, large scaffolding protein eIF4G and RNA helicase eIF4A is assisted by the eIF4B co-factor to unwind local secondary structures and create a ribosome site on mRNA. eIF4A is required for cell survival during starvation.	45750
30	Prophenoloxidase 3	<i>PPO3</i>		79264
31	Enolase	<i>Eno</i>	Enolase catalyzes the conversion of 2-phosphoglycerate to phosphoenolpyruvate during both glycolysis and gluconeogenesis and is an important enzyme in various biological processes.	54276
32	Capulet, isoform A	<i>capt</i>	Drosophila homologue of the cyclase-associated proteins (CAPs); may have a conserved role in linking signal transduction to reorganization of the actin cytoskeleton.	45576
33	Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	<i>eEF1γ</i>	Eukaryotic Elongation Factor 1 (eEF1) complex is responsible for aminoacyl-tRNA transfer on the ribosome. The primary role attributed to eEF1γ in translation elongation is as a structural scaffold for eEF1β. The N terminal domain of eEF1γ is also structurally similar to the theta class of Glutathione S-transferases (GST) but attempts to detect its activity have been largely unsuccessful (16).	48953
34	Actin 5C, isoform A	<i>Act5C</i>	The actin cytoskeleton provides structural support for cells and mechanical forces to drive membrane protrusion, cell migration and vesicle trafficking. Many different signaling pathways contribute to the reorganization of specific actin structures. There are six actins genes in Drosophila, given rise to multiple isoforms. Actin 5C is a cytoplasmic actin expressed mainly in undifferentiated cells (17).	41795
35	Actin 42A	<i>Act42A</i>	Actin 42A is a cytoplasmic actin expressed mainly in undifferentiated cells (17).	41797
36	Actin 42A	<i>Act42A</i>		41797
37	Actin 42A	<i>Act42A</i>		41797
38	Actin 5C, isoform A	<i>Act5C</i>		41795
39	Actin 5C, isoform A	<i>Act5C</i>		41795
40	Alcohol dehydrogenase	<i>Adh</i>	Alcohol dehydrogenase (ADH) is a key enzyme involved in the oxidation of ethanol to acetaldehyde, but seems also to catalyze the conversion of this highly toxic product into acetate (ref). This enzyme has been largely studied in drosophila since it is believed that increases in its catalytic activity has contributed to the fly ethanol tolerance and adaptation to its ethanol-rich ecological niche a view that was, however, recently challenged (18).	40364
41	Twinfilin	<i>twf</i>	twinfilin (twf) encodes a protein that sequesters actin monomers and promotes actin turnover in multiple cellular processes.	39046
42	Stubarista; P40; laminin receptor	<i>sta</i>	Ribosomal protein S2 (RPS2)	30209
43	60S acidic ribosomal protein P0; Ribosomal protein LP0	<i>RpLP0</i>	A structural component of ribosome	34181

44	Eb1; Calponin-like	<i>Eb1</i>	The +TIP end-binding protein 1 (EB1) accumulates at the growing plus ends of microtubule. EB1 controls microtubule plus-end tracking, dynamics at microtubule plus ends, microtubule and $\alpha/\beta$ -tubulin binding, and microtubule polymerization. Some of these activities are regulated by binding with the cyclin-dependent kinase 5 Regulatory Subunit Associated Protein 2 (CDK5RAP2) (19).	32555
45	Annexin IX; Annexin B9	<i>AnxB9</i>	Annexin IX is a drosophila member of a family of soluble, hydrophilic proteins that bind to negatively charged phospholipids in a Ca <sup>2+</sup> -dependent manner. These proteins are implicated in the regulation of phagocytosis, cell signaling, and membrane-associated cytoskeleton.	36017
46	Annexin IX; Annexin B9	<i>AnxB9</i>		36017
47	14-3-3epsilon	<i>14-3-3ε</i>	The drosophila 14-3-3epsilon protein has a critical role in cellular metabolism (20) and in concert with the 14-3-3zeta isoform is also a regulator of multiple signaling pathways, for example the Ras/Mapk signaling. 14-3-3 proteins also control the Tctp-Rheb GTPase interaction involved in tissue growth via modulation of the Tor signaling pathway (21).	29780
48	Receptor of activated protein kinase C 1	<i>Rack1</i>	RACK1, a member of the WD-repeat family of proteins that shares homology to the $\beta$ subunit of G-proteins (G $\beta$ ), is a key mediator of various pathways and cellular function. It has a role in shuttling proteins around the cell, anchoring proteins at particular locations and in stabilizing protein activity. It interacts with the ribosomal machinery, with several cell surface receptors and with proteins in the nucleus (22).	35695
49	Actin 42A	<i>Act42A</i>		41797
50	Actin 42A	<i>Act42A</i>		41797
51	Lethal(2)37Cc, isoform B; Prohibitin like	<i>l(2)37Cc</i>	lethal(2)37Cc is a member of the prohibitin family. Prohibitin is a lipid raft-associated integral membrane protein. lethal(2)37Cc appears to be the orthologue of the human Phb1 and is vital for normal development (23). Prohibitins seems mainly localized in the mitochondrial membrane and have potential roles such as a tumor suppressor, an anti-proliferative protein, a regulator of cell-cycle progression and in apoptosis. Prohibitins have also been consistently identified in association with cell membranes in various cell types and have a role in membrane signaling that involves their post-translational modification at various sites. Prohibitins were identified as a membrane-associated protein in different mammalian immune cells and play a role in inflammation (24).	30365
52	Voltage dependent anion-selective channel; porin	<i>porin</i>	Voltage-dependent anion channel (VDAC) has been suggested to be a mediator of mitochondrial-dependent cell death induced by Ca <sup>2+</sup> overload, oxidative stress and Bax-Bid activation. Porin is a housekeeping gene transcribed in every fly developmental stage, its loss - resulted in locomotive defects and male sterility link to mitochondrial morphological defects (REF).	30531
53	Actin 5C, isoform A	<i>Act5C</i>		41795
54	GH22994p; Calcyphosin-like protein	<i>CG10126</i>	GH22994p is a protein of unknown function with a EF-hand domain and a Ca <sup>++</sup> binding site suggesting function related to calcium signaling response. Calcyphosine- calcium binding and regulated by cyclic AMP through phosphorylation protein- was first isolated from dog thyroid. It is a target of both the cyclic AMP and the Ca(+2)-phosphatidylinositol cascades (25).	24379
55	Rab11	<i>rab11</i>	Rab11 is a small GTPase that, by cycling from an active to an inactive state, controls key events in vesicular transport and the exocytic and recycling pathway. Rab11 regulation and compartmentalization function through its interaction with phosphoinositides.	24230

56	Rho protein GDP-dissociation inhibitor	<i>RhoGDI</i>	RhoGDI is a down-regulator of Rho family GTPases including Rhoa, Rhoc, Rac1, Rac2 and Cdc42 that regulate many aspects of intracellular actin dynamics and cell migration. RhoGDI prevents nucleotide exchange and membrane association of Rho-GTPases, thus maintaining them as a stable inactive cytoplasmic pool that can be rapidly translocated to membranes in response to specific signals (26).	23204
57	Thioredoxin peroxidase 1; Peroxiredoxin	<i>Jafrac1</i>	Thioredoxin peroxidase 1 is a thiol-specific cytoplasmic peroxidase that catalyzes the reduction of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides and participates also in cadherin-mediated cell adhesion (27).	21724
58	Glutathione S transferase D1	<i>GstD1</i>	Glutathione S transferase D1 (GST) is a cytosolic enzyme involved in the conjugation of glutathione with a wide range of endogenous compounds and xenobiotic alkylating agents. The S-Glutathionylation is an important cell mechanism to maintain the reduced/oxidized glutathione ratio at the optimal level but also for oxidation of proteins cysteine residues for their normal functioning and their ability to participate in signal transduction cascades (28).	23851
59	Glutathione S transferase D1	<i>GstD1</i>		23851
60	Glutathione S transferase D1	<i>GstD1</i>		23851
61	Translationally controlled tumor protein	<i>Tctp</i>	Tctp is a family of evolutionarily conserved proteins involved in a number of fundamental processes, including cell proliferation, apoptosis and DNA damage control. In <i>Drosophila</i> , Tctp is required for organ growth by promoting Rheb function for Tor signalling as a guanine nucleotide exchange factor.	19625
62	Eukaryotic translation elongation factor 5	<i>eIF-5A</i>	eIF-5A is a mRNA-binding protein involved in translation elongation of proteins particularly with consecutive prolines. It is involved in mRNA turnover and probably in a pathway involved in stress response and maintenance of cell wall integrity. Its regulates cytoskeleton-dependent processes through translation of formins and functions as a regulator of apoptosis (29).	17580
63	Cofilin/actin depolymerizing factor homolog; twinstar	<i>tsr</i>	Cofilin is a ubiquitous actin-binding factor required for the reorganization of actin filament. Its dephosphorylation enables its actin severing and depolymerizing activity	17142
64	Calmodulin, isoform A	<i>cam</i>	Calmodulin (CAM) participates in a variety of intracellular transduction processes by modulating signaling molecules in response to calcium changes A <i>Drosophila</i> NO synthase activity is Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent and NO mediates an early step of the signal transduction pathway, inducing the innate immune response upon natural infection with gram-negative bacteria.	16800
65	Ribosomal protein S12	<i>RpS12</i>	A structural component of ribosome.	16571
66	Unknown (product of CG14610)	<i>CG14610</i>	<i>CG14610</i> expression increases in <i>D. melanogaster</i> after parasitisation by the <i>Asobara tabida</i> wasp (30)	17084
67	Abnormal wing discs, isoform C	<i>awd</i>	Abnormal wing discs ( <i>awd</i> ) belongs to a family of genes implicated in metastasis suppression, metabolic homeostasis and epithelial morphogenesis. <i>awd</i> is necessary for Rab5 function and is essential for Notch signaling via its endocytic role (31).	17159
68	Actin 42A	<i>Act42A</i>		41797
69	Profilin; Protein chickadee	<i>chic</i>	Profilin is a small actin binding protein that at high concentrations prevents the polymerization of actin, whereas it enhances it at low concentrations (32). It is involved in endocytic uptake, actin filament recycling and cell migration during development. Profilin is transcriptionally upregulated in cells proximal to larval epidermal wound (32).	13715
70	Profilin; Protein chickadee	<i>chic</i>		13715

## Références citées dans la table :

1. Maynard JC, Pham T, Zheng T, Jockheck-Clark A, Rankin HB, Newgard CB, et al. Gp93, the Drosophila GRP94 ortholog, is required for gut epithelial homeostasis and nutrient assimilation-coupled growth control. *Dev. Biol.*; 2010 339(2):295–306.
2. Morales C, Li Z. Drosophila canopy-b is a cochaperone of glycoprotein-93. *J. Biol. Chem.* y; 2017 ;:jbc.M116.755538–22.
3. Xavier MJ, Williams MJ. The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in Drosophila immunosurveillance cells. *PLoS ONE.* 2011;6(5): e19504.
4. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002 3(1):99–111.
5. Ham H, Woolery AR, Tracy C, Stenesen D, Krämer H, Orth K. Unfolded Protein Response-regulated Drosophila Fic (dFic) Protein Reversibly AMPylates BiP Chaperone during Endoplasmic Reticulum Homeostasis. *J Biol Chem.* 2014 289(52):36059–69.
6. Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. Drosophila innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. *BMC Biol.* 2015 29:1–16.
7. Uytterhoeven V, Lauwers E, Maes I, Miskiewicz K, Melo MN, Swerts J, et al. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron*; 2015 88(4):735–48.
8. Bronk P, Wenniger JJ, Dawson-Scully K, Guo X, Hong S, Atwood HL, et al. Drosophila Hsc70-4 Is Critical for Neurotransmitter Exocytosis In Vivo. *Neuron* 2001 30(2):475–88.
9. Brackley KI, Grantham J. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress and Chaperones.* Springer Netherlands; 2008 14(1):23–31.
10. Tsai C-L, Chao A, Jung S-M, Tsai C-N, Lin C-Y, Chen S-H, et al. Stress-induced phosphoprotein-1 maintains the stability of JAK2 in cancer cells. *Oncotarget* 2016 7:50548–63. doi:10.18632/oncotarget.10500.
11. Bond PA, Sang JH. Glutamate dehydrogenase of Drosophila larvae. *J Insect Physiol.* 1968 14(3):341–59.
12. Tiwari AK, Panda P, Purohit JS. Evaluation of sub-cellular distribution of glutamate dehydrogenase (GDH) in Drosophila melanogaster larvae. *Acta Histochem.* 2014 116(2):297–303.
13. Irving P, Ubeda J-M, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, et al. New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol.* 2005 7(3):335–50.
14. Kim K, Kim S-H, Kim J, Kim H, Yim J. Glutathione S-Transferase Omega 1 Activity Is Sufficient to Suppress Neurodegeneration in a Drosophila Model of Parkinson Disease. *J Biol Chem.* 2012 287(9):6628–41.
15. Ricard, C.S., Jakubowski, J.M., Verbsky, J.W., Barbieri, M.A., Lewis, W.M., Fernandez, G.E., Vogel, M., Tsou, C., Prasad, V., Stahl, P.D., Waksman, G., Cheney, C.M. (2001). Drosophila rab GDI mutants disrupt development but have normal Rab membrane extraction. *Genesis* 2001 31(1):17-29.
16. Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *WIREs RNA.* 2012 3(4):543–55.
17. Fyrberg EA, Mahaffey JW, Bond BJ, Davidson N. Transcripts of the six Drosophila actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* 1983 33(1):115–23.
18. Siddiq MA, Loehlin DW, Montooth KL, Thornton JW. Experimental test and refutation of a classic case of molecular adaptation in Drosophila melanogaster. *Nat Ecol Evol.* 2017 1:1–6.
19. Fong K-W, Au FKC, Jia Y, Yang S, Zhou L, Qi RZ. Microtubule plus-end tracking of end-binding protein 1 (EB1) is regulated by CDK5 regulatory subunit-associated protein 2. *J. Biol. Chem.* 2017 292(18):7675–87.
20. Ng YS, Sorvina A, Bader CA, Weiland F, Lopez AF, Hoffmann P, et al. Proteome Analysis of Drosophila Mutants Identifies a Regulatory Role for 14-3-3ε in Metabolic Pathways. *J Proteome Res.* 2017 16(5):1976–87.
21. Le TP, Vuong LT, Kim A-R, Hsu Y-C, Choi K-W. 14-3-3 proteins regulate Tctp-Rheb interaction for organ growth in Drosophila. *Nat. Commun.*; 2016 7:1–10.
22. Adams DR, Ron D, Kiely PA. RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun. Signal.* 2011 9(1):22.
23. Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J Cell Mol Med.* 2006 10(2):353–63.
24. Ande SR, Nguyen KH, Nyomba BLG, Mishra S. Prohibitin in Adipose and Immune Functions. *Trends Endocrinol Metab.* 2016 27(8):531–41.
25. Park J, Kim Y, Choi S, Koh H, Lee S-H, Kim J-M, et al. Drosophila Porin/VDAC affects mitochondrial morphology. *PLoS ONE* 2010 5: e13151. doi:10.1371/journal.pone.0013151.
26. Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 12(8):493–504.
27. DeGennaro M, Hurd TR, Siekhaus DE, Biteau B, Jasper H, Lehmann R. Peroxiredoxin Stabilization of DE-Cadherin Promotes Primordial Germ Cell Adhesion. *Dev Cell.* 2011 20(2):233–43.
28. Tu CPD, Akgül B. Drosophila Glutathione S-Transferases. In: *Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases.* Elsevier; 2005. pp. 204–26. (Methods in Enzymology; vol. 401).
29. Muñoz-Soriano V, Domingo-Muelas A, Li T, Gamero E, Bizy A, Fariñas I, et al. Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. *Sci Rep* 2017 7:9580. doi:10.1038/s41598-017-10057-y.
30. Salazar-Jaramillo L., Jalvingh K.M., de Haan A., Kraaijeveld K., Buermans H., Wertheim B. Inter- and intra-species variation in genome-wide gene expression of Drosophila in response to parasitoid wasp attack. *2017 BMC Genomics* 18: 331.
31. Ignesti M, Barraco M, Nallamotheu G, Woolworth JA, Duchi S, Gargiulo G, et al. Notch signaling during development requires the function of awd, the Drosophila homolog of human metastasis suppressor gene Nm23. *BMC Biol.* 2014 12(1):1–18.
32. Verheyen EM, Cooley L. Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during Drosophila development. *Development.* 1994 120(4):717–28.

Bien que cette liste fournisse déjà un certain nombre d’informations, nous avons analysé l’ensemble des 514 protéines identifiées dans les 70 spots. Les protéines ont été classées d’après

le score calculé par le logiciel Mascot (cf mat. et meth.) qui donne une idée approximative de l'abondance de chaque protéine parmi cet ensemble.

Les différents composants du cytosquelette (tels que les isoformes d'actine et de tubuline) et les chaperonnes se retrouvent dans les dix meilleurs résultats (Table II), PPO3 a le deuxième score confirmant sa grande quantité dans ces cellules. Une seconde identification de PPO3 correspond à un ADNc mixte de la séquence PPO3 et PPO2 (Figure S1). Cet ADNc a été obtenu par clonage et la séquence déposée dans la banque de données [347] n'a pas de gène correspondant dans le génome de *D. melanogaster*. Elle présente des parties homologues à PPO3 et PPO2 suggérant qu'il résulte d'un mélange entre les ARNm de ces deux protéines. Certains des peptides identifiés correspondent spécifiquement à la séquence de PPO2 (Figure S1) indiquant la possible présence de cette protéine dans les lamellocytes bien qu'en quantité inférieure à PPO3. La troisième PO, PPO1 a également été identifiée mais avec un score très faible indiquant une très faible quantité. Comme Hop<sup>Tum-1</sup> ne produit pas ou peu de cellules à cristaux [234] contenant normalement PPO1 et PPO2, ce résultat ne provient sans doute pas d'une contamination par ces cellules.

**Table II. Les vingt protéines les plus abondantes parmi les 514 identifiées en 1D.**

Rank	Protein Name	Gene
1	Actin at 42A	<i>Act42A</i>
2	PPO3	<i>PPO3</i>
3	Actin	<i>Act79B</i>
4	Actin-87E	<i>Act87E</i>
5	Beta-Tubulin at 60D, isoform B	<i>betaTub60D</i>
6	Beta-Tubulin at 56D, isoform B	<i>betaTub56D</i>
7	Tubulin alpha-2 chain	<i>alphaTub85E</i>
8	Heat shock protein cognate 70	<i>Hsc70-4</i>
9	Heat shock protein cognate 72	<i>Hsc70-3</i>
10	Tubulin alpha-1 chain	<i>alphaTub84B</i>
11	Beta-2 tubulin	<i>betaTub85D</i>
12	Nuclear lamin C protein	<i>LamC</i>
13	BetaTub97EF	<i>betaTub97EF</i>
14	Filamin A	<i>cher</i>
15	Protein disulfide isomerase	<i>Pdi</i>
16	Hsp 82	<i>Hsp83</i>
17	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit precursor	<i>blw</i>
18	T-cp1zeta	<i>CCT6</i>
19	ATP synthase, beta subunit, isoform C	<i>ATPsynbeta</i>
20	Annexin IX	<i>AnxB9</i>

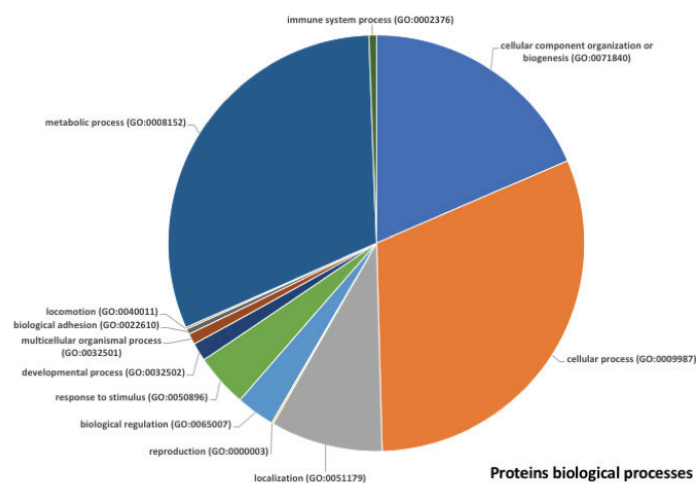
Parmi les marqueurs lamellocytaires, ces données confirment la présence de l'intégrine beta-PS myosphéroïde (mys) et identifient deux alpha intégrines : alphaPS4 (*ItgaPS4*) et alpha-PS5



(*ItgaPS5*) toutes deux surexprimées dans les lamellocytes [234]. Ces intégrines alpha pourraient former des hétérodimères avec myosphéroïde.

Dans cette liste, il y a aussi quatre interactants connus de myosphéroïde. Rhea, la taline de *D. melanogaster* [234] et la vinculine [348], Crk (une molécule adaptatrice [349]) et la chaîne lourde de la myosine II non musculaire Zipper [348]. Rhea (*rhea*) et Vinc (*Vinc*) sont toutes les deux essentielles pour relier de façon stable les intégrines liées à la matrice extracellulaire au cytosquelette [350]. La protéine adaptatrice Crk (*Crk*) intègre des signaux provenant d'une grande variété de sources incluant les facteurs de croissance, les molécules extracellulaires, les pathogènes bactériens et les cellules apoptotiques et agit via les voies tyrosine kinases sur l'adhésion cellulaire, l'étalement et la migration. Cette protéine joue un rôle dans la migration des hémocytes durant l'embryogenèse [349,351]. Le quatrième est Zipper (*zip*) impliquée dans de multiples fonctions, y compris la prolifération cellulaire, la migration et l'adhésion. La fonction de clustering de Zipper dépend de la signalisation du récepteur de l'EGF et la voie de la kinase c-Jun N-terminale (JNK) est essentielle pour sa participation aux changements de forme des cellules épithéliales pendant la fermeture des blessures cuticulaires [352–354]. Les flotillines 1 et 2 ont aussi été identifiées dans cette analyse ainsi que la clathrine.

A partir des gènes correspondants à l'ensemble des protéines, une première analyse a été faite par termes de gène ontologie (GO) sur le serveur Panther (<http://pantherdb.org>). En ce qui concerne les fonctions de ces protéines, la majorité à une activité catalytique ou de liaison, viennent ensuite des protéines avec des fonctions structurales, de transport ou de récepteur. Pour les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées (Figure 4), la majorité des protéines participent au métabolisme, aux fonctions cellulaires et à l'organisation des composants cellulaires et la biogénèse.



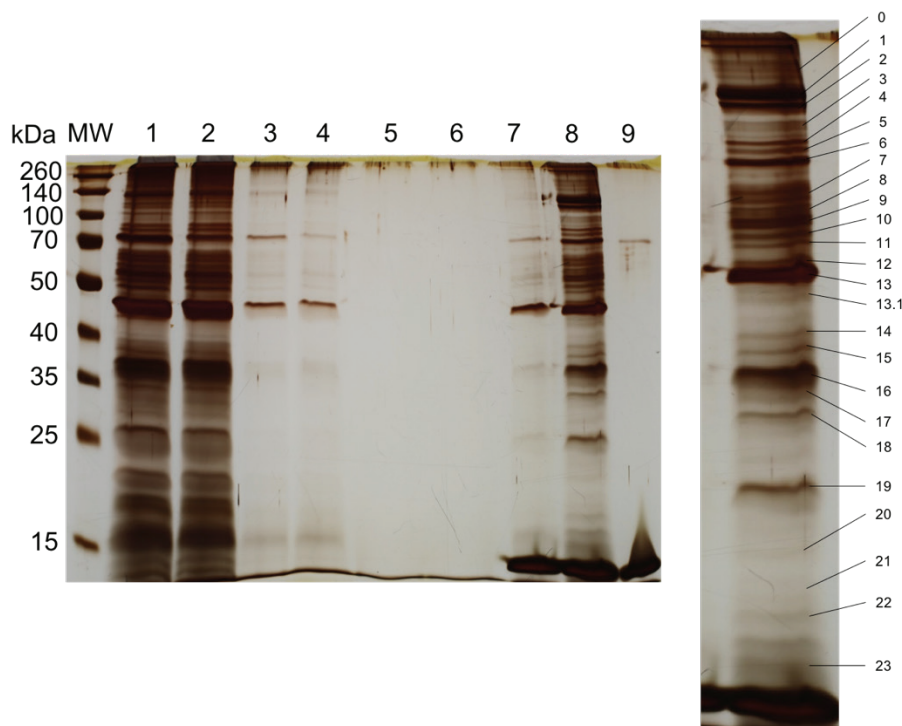
**Figure 4 : Diagramme montrant la distribution des protéines par processus biologiques**



## Analyse protéomique des protéines de membranes

Bien que certaines des protéines trouvées dans l'analyse 2D soient des protéines membranaires intégrales (ex : intégrines) ou des protéines se liant à des protéines membranaires, la méthode de solubilisation directe utilisée (Chaps et SDS) et la séparation IEF ne fonctionnent pas bien pour ce type de protéines. J'ai donc développé une approche pour purifier les protéines membranaires de surface des lamellocytes en utilisant un composé couplant non-perméant (sulfo-NHS-SS-PEO4-biotine) et purifié les protéines marquées par affinité sur billes d'avidine (voir mat. et méth.).

La purification a permis la séparation d'un sous-ensemble des protéines cellulaires totales et peu de protéines ne sont liées de façon non spécifique sur l'avidine (Figure 5). A partir de la bande SDS-PAGE, nous avons découpé 25 bandes qui ont été traitées à la trypsine et analysées par spectrométrie de masse.



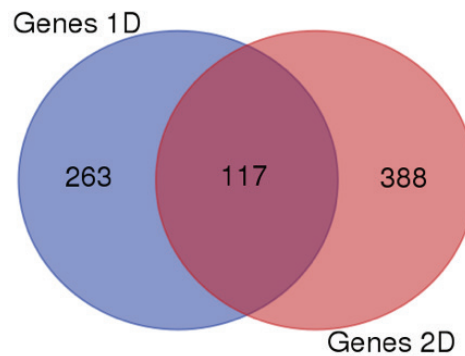
**Figure 5 : Purification des protéines membranaires par affinité.** SDS-PAGE 12,5 % des différentes étapes de purification et de contrôle de l'extraction et de la purification. Un extrait cellulaire témoin (non marqué, pistes impaires) ou marqué (pistes paires) est incubé avec les billes magnétiques d'avidine et les surnageants contenant les protéines non-retenues sont montrés à la piste 1 et 2, respectivement. Piste 3 et 4, le surnageant du premier lavage correspondant, piste 5 et 6 du lavage 10 x IR, piste 7 et 8 des protéines décrochées des billes par traitement au  $\beta$ -mercaptoethanol. En 9, les billes seules traitées identiquement à 7 et 8. Les bandes de la piste 8 ont été découpées pour l'analyse en spectrométrie de masse (à droite bande découpées numérotées).

A partir de ces 25 bandes, 380 protéines ont été identifiées (Table S2). Les vingt les plus abondantes sont listées dans la Table III avec leur rôle/fonction et leur localisation cellulaire putative ou démontrée. On retrouve parmi ces protéines des protéines du cytosquelette qui pourraient aussi être associées à la membrane ou à des composés membranaires extraits (par exemple les deux isoformes d'actines qui sont impliquées dans l'endocytose et la phagocytose), PPO3 apparaît en troisième position confirmant qu'elle est très présente dans ces cellules et pourrait être associée au niveau des membranes. Trois intégrines sont parmi les dix premières dont myospheroïde et les alpha-intégrines PS4 et PS5 trouvées précédemment. Quelques enzymes du métabolisme sont aussi en quantité notable et, de façon plus surprenante, un certain nombre de protéines associées aux membranes mitochondriales.

**Table III : Les 20 protéines les plus abondantes dans l'analyse totale des protéines purifiées par avidine.** En rouge, les protéines de membrane plasmique, en vert, les protéines mitochondriales.

Score	Gene Name	Protein Name	Role / Localisation
3132	Act87E	Actin-87E	Endocytosis / Cytoskeleton
2533	Act88F	Actin, Indirect Flight Muscle	Phagocytosis / Cytoskeleton
<b>1344</b>	<b>PPO3</b>	<b>Prophenoloxidase 3</b>	<b>Immunity / Cytoplasm, Secreted</b>
<b>1202</b>	<b>Itgaps4</b>	<b>Integrin Alpha-PS4</b>	<b>Membrane / Cell-Cell Adhesion</b>
870	Pdi	Protein Disulfide-Isomerase	Protein Folding /Endoplasmic Reticulum
<b>742</b>	<b>Mys</b>	<b>Integrin beta-PS / Myospheroid</b>	<b>Cell-Cell Adhesion / Plasma Membrane</b>
709	Atub84b	Tubulin Alpha-1 Chain	Microtubules / Cytoskeleton
698	Atub85e	Tubulin Alpha-2 Chain	Microtubules / Cytoskeleton
<b>693</b>	<b>Itgaps5</b>	<b>Integrin Alpha-PS5</b>	<b>Cell-Cell Adhesion / Plasma Membrane</b>
644	Blw	ATP Synthase Subunit Alpha, Mitochondrial	ATP Production / Mitochondrial Membrane
636	Cher	Filamin-A	Actin Microfilaments Organization / Cytoskeleton
607	Porin	Voltage-Dependent Anion-Selective Channel	Anion Channel / Mitochondrial Membrane
530	Hsc70-4	Heat Shock 70 Kda Protein Cognate 4	Chaperone, Stress Response / Cytoplasmic Fibers
521	Rtn1	Reticulon-Like Protein	Endoplasmic Reticulum organization / ER Membrane
498	Gapdh2	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 2	Pyruvate Metabolism / Cytoplasm
467	Fim	F119014p1 / Fimbrin	Actin Binding / Cytoskeleton
459	Atpsyn $\beta$	ATP Synthase Subunit Beta, Mitochondrial	ATP Production / Mitochondrial Membrane
446	UQCR-C2	AT02348p / Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 2	Metalloendopeptidase / Mitochondria
432	Hsc70-3	Heat Shock 70-Kda Protein Cognate 3	Chaperone, Stress Response / Cytoplasm
426	Btub60d	Tubulin Beta-3 Chain	Microtubules Organization / Cytoskeleton

Lorsque l'on compare les protéines identifiées par l'approche bidimensionnelle et celles obtenues par purification, seules 117 protéines sont communes, 263 étant spécifiques de l'approche purification et 388 de l'approche totale (voir Table S3 pour la distribution). Cela conforte l'idée que l'approche par purification donne accès à un sous ensemble de protéines (Figure 6).



**Figure 6 : Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines communes et spécifiques entre les deux approches protéomiques.** La correspondance a été faite en utilisant le nom du gène codant. La liste des gènes codants pour les protéines communes et spécifiques est donnée à la Table S1. Parmi les protéines identifiées en protéomique, certaines n'ont pas de gène correspondant dans Flybase, mais on peut trouver soit un cDNA déposé soit une séquence déjà identifiée en protéomique dans les bases de données. Ceci explique la non correspondance entre le nombre de gènes et de protéines.

Afin de confirmer que les protéines identifiées après purification étaient enrichies en protéines de membrane, j'ai regardé pour chacune d'elle la localisation soit démontrée soit prédite dans la base Uniprot (<http://www.uniprot.org>) et les commentaires sur Flybase (Table IV).

63 des 380 protéines (16%) sont prédites dans la membrane plasmique, 8 sont liées aux membranes intracellulaires ou vésiculaires, 1 liée à la matrice extracellulaire (MMP1) et 2 sécrétées (idgf4 et idgf5) et donc passent par la membrane ou des vésicules de sécrétion. Alternativement, ces protéines sont localisées dans l'hémolymphe et peuvent agir en stabilisant la liaison des peptides de type insuline au récepteur pour stimuler la prolifération et donc être retrouvées sur la membrane [355]. Au total, il y a 74 protéines (19,5%) associées avec la membrane plasmique.

Une autre indication que nous avons sélectivement purifié des protéines de la membrane plasmique est l'enrichissement de la Na/K-ATPase avec un haut score, des intégrines, de transporteurs et de protéases membranaires, de récepteurs ainsi que de protéines à ancre GPI.

**Table IV : Protéines associées aux membranes ou sécrétées.** Surligné en gris celles déjà connues ou ayant un rôle direct dans l'immunité, en bleu Ly6 protéines.

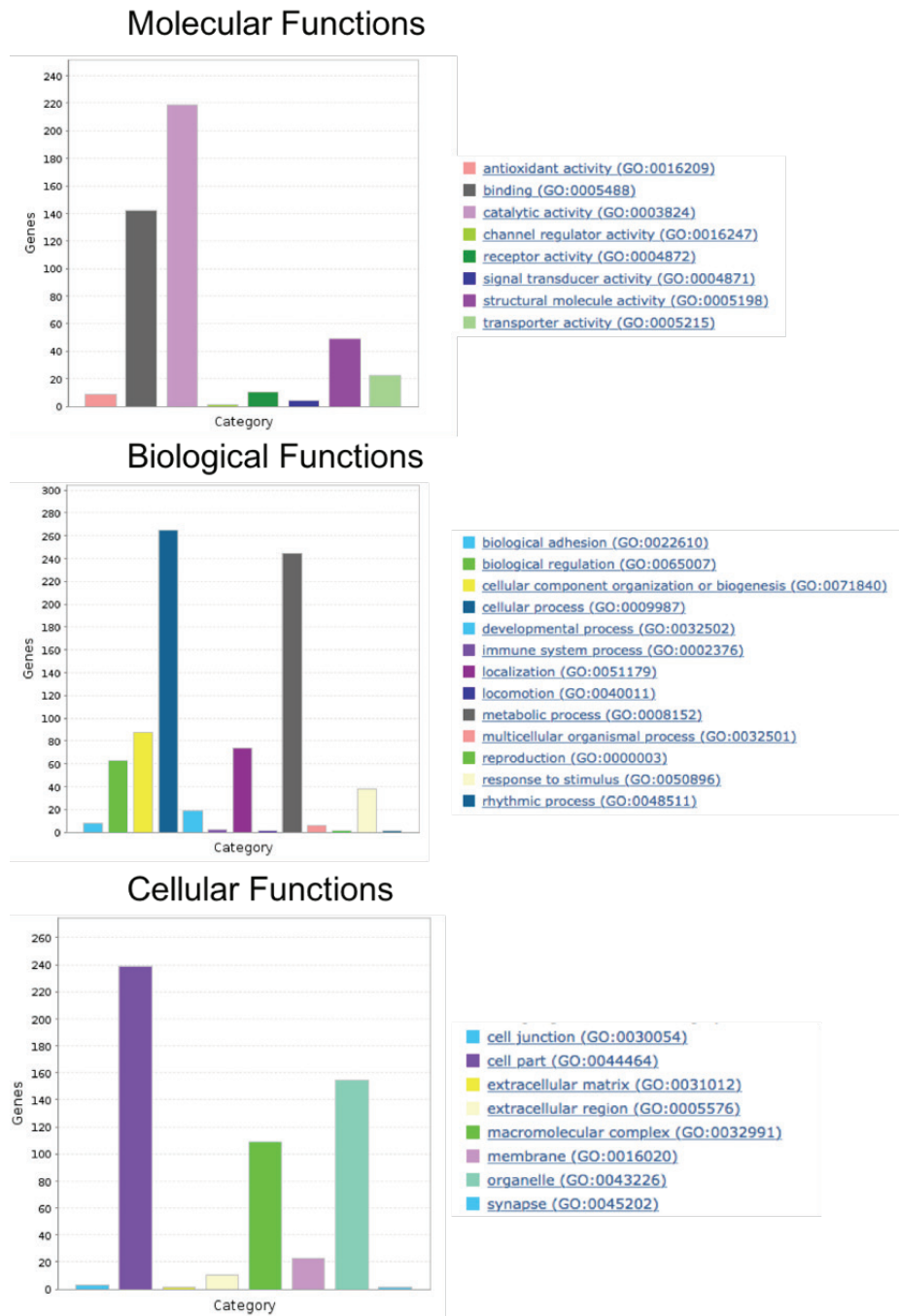
Score	Protein	Gene ID	Localization
654	integrin alphaPS4 subunit	<i>ItgaPS4</i>	PM
500	myospheroid protein	<i>mys</i>	PM
315	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha;	<i>Atpa</i>	PM
187	GH09052p (glucose transmembrane transporter activity)	<i>CG1208</i>	PM
159	neuroglian	<i>Nrg</i>	PM
136	rush hour, isoform A	<i>rush</i>	PM/endosomes
131	Integrin alpha-PS1	<i>mew</i>	PM
121	dipeptidyl aminopeptidase III, isoform B	<i>DppIII</i>	PM
87	scavenger receptor protein CI precursor	<i>Sr-CI</i>	PM
80	gliotactin, isoform A	<i>Gli</i>	PM
77	alpha-adaptin (AP-2 complex subunit alpha)	<i>AP-2α</i>	PM/coated vesicles
77	AT18611p (GNBPlike4)	<i>CG30148</i>	PM
75	V-type proton ATPase subunit a	<i>Vha100-2</i>	PM
74	Vinculin	<i>Vinc</i>	PM
69	uncharacterized protein Dmel CG13887, isoform B	<i>CG13887</i>	ER
68	synaptobrevin, isoform A	<i>Syb</i>	PM
67	integrin alphaPS5 subunit	<i>ItgaPS5</i>	PM
62	matrix metalloproteinase 1	<i>Mmp1</i>	Extracellular matrix
62	serine palmitoyltransferase subunit I, isoform C	<i>Spt-I</i>	PM
61	integrin alphaPS4 subunit	<i>ItgaPS4</i>	PM
60	contactin	<i>Cont</i>	PM
60	rhea (talin)	<i>rhea</i>	PM/Integrin binding
59	GH21853p	<i>Bsg</i>	PM
59	CG5554, isoform A	<i>CG5554</i>	Endomembrane system
59	CG9336, isoform A (Ly6 family, GPI)	<i>CG9336</i>	PM
59	ADAM metalloprotease	<i>Meltrin</i>	PM/extracellular
55	FI10950p	<i>atilla</i>	PM
55	Chitinase-like protein Idgf5	<i>Idgf5</i>	secreted
55	Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein LAP	<i>lap</i>	Clathrin coated vesicles/Golgi
54	Gram-negative bacteria binding protein 3	<i>GNBP3</i>	PM/Secreted
50	CD98 heavy chain, isoform A	<i>CD98hc</i>	PM
48	arfaptin	<i>Arfip</i>	Trans Golgi network
48	uncharacterized protein Dmel CG32638	<i>CG32638</i>	PM
46	coat protein (coatomer) delta, isoform B	<i>δCOP</i>	Golgi non-clathrin-coated vesicles
42	ALG-2 interacting protein X	<i>ALiX</i>	PM/Endosomes
42	Extended synaptotagmin-like protein 2	<i>Esy12</i>	PM
39	CG4829, isoform A (GGT)	<i>CG4829</i>	PM
39	Vesicle-associated membrane protein 7, isoform A	<i>Vamp7</i>	Endosomes/lysosomes
38	uncharacterized protein Dmel CG13117, isoform A	<i>CG13117</i>	PM (annexin binding)
36	G protein alpha o subunit	<i>Gao</i>	PM
36	parvin, isoform A	<i>parvin</i>	PM/integrin binding
36	prip, isoform A	<i>Prip</i>	PM/aquaporin
35	nervana 1 (Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1)	<i>nrv1</i>	PM
34	nicastrin	<i>Nct</i>	PM
33	Fasciclin III	<i>Fas3</i>	PM
32	annexin IX, partial	<i>AnxB9</i>	PM/endosomes
32	RH03540p (Ly6 family)	<i>CG15347</i>	PM
32	fermitin 1, isoform A	<i>Fit1</i>	PM
31	Protein odr-4 homolog	<i>CG10616</i>	PM
31	drip, isoform B (Aquaporin)	<i>Drip</i>	PM
31	integrin beta subunit; Integrin betanu subunit	<i>Itgβn</i>	PM
31	V-type proton ATPase subunit a	<i>Vha100-1</i>	PM
30	G protein alpha q subunit	<i>Gaq</i>	PM
30	lipophorin receptor 2, isoform B	<i>LpR2</i>	PM
29	LDL receptor protein 1, isoform F	<i>LRP1</i>	PM/cytosol
26	major facilitator superfamily transporter 3	<i>MFS3</i>	PM/cytosol

26	Protein ROP	<i>Rop</i>	PM
25	Chitinase-like protein <i>Idgf4</i>	<i>Idgf4</i>	secreted
24	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain, isoform B	<i>Asap</i>	PM
24	filamin A	<i>Cher</i>	PM
24	similar to semaphorin-I	<i>Sema1a</i>	PM
24	syntaxin 13, isoform A	<i>Syx13</i>	PM
23	midline fasciclin precursor	<i>mfas</i>	PM/secreted
21	CG1105 (Arrestin-domain)	<i>CG1105</i>	PM
21	synaptotagmin 1, isoform G	<i>Syt1</i>	PM/vesicles
20	uncharacterized protein Dmel_CG30110	<i>CG30110</i>	PM
20	presenilin	<i>Psn</i>	PM/endosomes, Golgi, ER
18	CG1515, partial	<i>Ykt6</i>	Endosomes/golgi
16	ankyrin 2, isoform M	<i>Ank2</i>	PM
16	odorant receptor 59b	<i>Or59b</i>	PM
15	ionotropic receptor 76a, isoform A	<i>Ir76a</i>	PM
15	Kuzbanian-like, isoform A	<i>Kul</i>	PM
15	Vacuolar protein sorting 16A	<i>Vps16A</i>	Lysosomes/endosomes
15	coatomer protein gamma subunit	<i>γCOP</i>	Golgi/ER/PM

## Analyse globale des GO

A partir de l'ensemble des gènes uniques codants pour les protéines identifiées par les deux approches (Table S4), j'ai effectué une analyse des GO sur les fonctions moléculaires, biologiques et cellulaires des protéines (Figure 7).

Les fonctions moléculaires les plus représentées sont les fonctions enzymatiques (catalytique) et les fonctions de liaison (binding). La majorité des protéines interviennent dans les processus cellulaires généraux et dans le métabolisme, ainsi que dans des fonctions cellulaires de base. Environ 70 sont étiquetées avec le GO immunité pour leur fonction biologique.



**Figure 7. Fonction de l'ensemble des protéines identifiées.** A partir de la liste de gènes uniques correspondant à l'ensemble des protéines des deux analyses, les fonctions par termes de gène ontologie (GO) ont été obtenues sur le serveur Panther (<http://pantherdb.org>).

## Discussion

L'ensemble des résultats fournit une masse de données importante sur la physiologie des lamellocytes qui reste encore à analyser dans le détail.

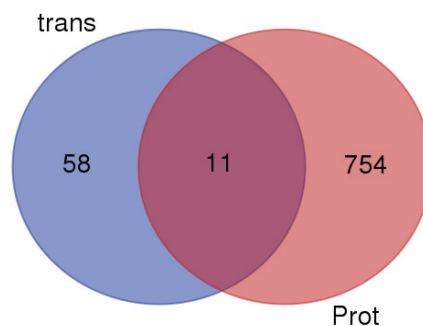
La méthode de purification des lamellocytes mise au point fonctionne et permet d'enrichir en cellules de ce type à partir de la souche Hop<sup>Tum-1</sup>. J'ai effectué plusieurs essais après stimulation par parasitisme avec les souches *D. melanogaster* YR et une souche mutante GFP pour les lamellocytes ainsi qu'avec *D. sukukii*. Je n'ai pas réussi à purifier les lamellocytes avec ces souches de *D. melanogaster* soit parce que leur nombre reste insuffisant soit parce qu'il y avait une agglomération des cellules empêchant la séparation. De plus, les cellules semblent résister moins bien aux différentes étapes de purification. J'ai obtenu une purification d'un type d'hémocytes pour *D. sukukii* (voir Figure S2). Ces cellules font de la phagocytose et ne sont donc pas des lamellocytes mais par manque de temps je n'ai pas pu les caractériser plus avant. Il est connu que la dilution de départ (nb de cellules), le type de gradient, le milieu (osmolarité) et la vitesse de centrifugation affectent largement le résultat de la purification et la viabilité des cellules recueillies. De plus, l'utilisation de souches où il faut induire la présence de lamellocytes pose un problème car, même avec la souche *L. bouvardi* ISy qui n'a pas d'effets visible sur la morphologie de ces cellules, nous avons vu que des vénosomes entraînent et pourraient interférer avec leur fonction. Au final, il semble donc que la méthode ne fonctionne correctement que pour les lamellocytes de la souche Hop<sup>Tum-1</sup>, certainement grâce au nombre naturellement élevé de ces cellules mais peut-être aussi parce ses lamellocytes sont plus résistants. Il aurait fallu pouvoir investir plus de temps pour la mettre au point sur les autres souches. J'ai donc utilisé uniquement cette souche pour le travail de caractérisation des protéines, sachant les limitations dues à la présence de la mutation qui affecte l'expression basale de certains gènes des lamellocytes [234]. Cependant, les résultats précédents ont montré que le comportement physiologique et cellulaire de la souche Hop<sup>Tum-1</sup> vis à vis du parasitisme et pour l'entrée des vénosomes est proche de celui de la souche YR.

A partir des lamellocytes enrichis, j'ai effectué deux analyses protéomiques, une de leurs protéines majeures et une à partir de protéines de membrane extraites et purifiées par affinité. Au total, plus de 764 protéines différentes ont été identifiées par ces deux études et 20% des protéines purifiées sont décrites comme membranaires dont certaines sont des marqueurs de la membrane plasmique (ex Na/K-ATPase). Je ne décrirais évidemment pas dans le détail l'ensemble de ces protéines mais je vais souligner quelques résultats intéressants.



Dans leur publication qui analyse le transcriptome des cellules hémocytaires de différentes souches mutantes dont ceux de la souche Hop<sup>Tum-1</sup>, Irving et al., [234] rapportent que dans l'ensemble des souches étudiées, 2517 gènes sont surexprimés au moins deux fois dans les hémocytes par rapport à la larve totale et 406 pour ceux d'Hop<sup>Tum-1</sup>.

La liste de ces gènes n'étant pas/plus accessible via internet, je n'ai pas pu faire de comparaison avec notre liste de protéines. J'ai utilisé une liste partielle de gènes des hémocytes de hop<sup>Tum-1</sup> (68 gènes) qui cible principalement les gènes en relation avec l'immunité dans les Tables 1 et 2 de cette publication (Table S5) pour la comparer avec notre liste de gènes uniques (Figure 8).



**Figure 8. Diagramme de Venn de la comparaison transcriptomique et protéomique.** Trans, gène provenant de la transcriptomique des hémocytes ; Prot, gènes codants pour les protéines identifiées dans notre étude.

Les 11 gènes communs sont les deux prophénoloxydases PPO3, PPO1 (on peut y rajouter PPO2 qui est absente dans notre liste de gènes), les intégrines alphaPS1 (*mew* ; *multiple edematous wings*), alpha-PS4 (*ItgaPS4*), alpha-PS5 (*ItgaPS5*), l'intégrine betanu (*Itgbn* aussi appelée  $\beta v$ ) et beta-PS (*mys*). Il y aurait donc trois des cinq sous-unités alpha et les deux sous-unités beta présentes dans le génome de *D. melanogaster* [356] qui sont exprimées dans les lamellocytes.

Deux protéines sont associées à la membrane : la vinculine (*Vinc*) impliquée dans la fixation des microfilaments d'actine à la membrane plasmique et viking (*vkg*) une sous-unité du collagène IV, un composant majeur des membranes basales.

Une Thioester-containing protein, TEP4, est retrouvée dans les deux analyses. Les TEP forment une superfamille de protéines effectrices sécrétées liée au système immunitaire, présente chez les nématodes, les arthropodes et les vertébrés [357]. Chez les mammifères, les membres de la famille TEP sont des facteurs du complément (C3, C5, C4) et des  $\alpha$ -2-macroglobulines, molécules qui ont des fonctions immunitaires importantes dans la cascade du complément ou comme inhibiteurs de la protéase plasmatique [357]. Chez les insectes, les TEP participent à la réponse immunitaire et il

a été montré chez le moustique que TEP1 participe à l'opsonisation et favorise la phagocytose des bactéries par les plasmatoctes [358]. Le génome de *D. melanogaster* code pour six protéines TEP qui ont été associées à la phagocytose et il a été montré récemment que les TEP1 à 4 sont impliquées dans la défense contre les bactéries Gram-positives et les champignons entomopathogènes, notamment en favorisant l'activation de la voie Toll [359]. Cette étude montre aussi que ces TEP pourraient être impliquées dans la défense contre les parasitoïdes mais sans en déterminer le mécanisme.

La dernière protéine commune est le récepteur éboueur de Classe C SR (scavenger receptor) dSR-CI (Sr-CI). dSR-CI, est un de multiples récepteurs de reconnaissance de patron (PRRs) capable de reconnaître à la fois les bactéries Gram-moins et Gram-plus, mais pas la levure [360,361]. dSR-CI présente aussi une affinité de liaison élevée pour les lipoprotéines de basse densité [362]. Il y a quatre membres de la famille Classe C SR chez la drosophile, le dSR-CI, le CII, le CIII et le CIV. SR-CI et CII sont des récepteurs liés à la membrane tandis que CIII et CIV qui n'ont pas de domaines transmembranaires et cytoplasmiques devraient être sécrétés [363]. CIII et CIV sont exprimés à de faibles niveaux dans les cellules S2 [332] et ne semblent pas jouer de rôle direct dans la phagocytose des bactéries mais étant donné leur homologie avec SR-CI il pourraient participer à l'immunocompétence antibactérienne [360,363]. Il est à noter que notre analyse des protéines de membranes indique aussi la présence de dSR-CIV. De façon intéressante, après l'injection du venin de certains parasitoïdes de lépidoptères, une diminution de l'expression des récepteurs de ce type est obtenue [364,365].

Normalement, ce sont les plasmatoctes qui portent le récepteur SR-CI à leur surface. Bien que j'aie travaillé sur une fraction enrichie de lamellocytes, celle-ci contenait aussi des plasmatoctes en plus faible nombre. Il est donc certain que des protéines identifiées peuvent provenir des plasmatoctes. Pour l'analyse présentée, nous avons gardé toutes les protéines et la fonction phagocytaire apparaît enrichie ( $p$  valeur  $5.10^5$  par rapport à la distribution génomique (Panther GO)), cependant la majorité des protéines retrouvées sont aussi impliquées dans les trafics membranaires (ex : endosomes) ce qui ne permet pas de conclure sur leur origine. La taille des plasmatoctes étant beaucoup plus petite et leur nombre plus faible que ceux des lamellocytes, on peut supposer que leur apport en protéines sera plus faible et que ces protéines n'auront pas des scores très élevés. SR-CI par exemple a un score de 87 ce qui est assez élevé et ne semble pas correspondre à une contamination. De plus, dans notre analyse nous n'avons pas trouvé d'autres récepteurs impliqués dans la phagocytose caractéristiques des plasmatoctes [366] comme

Nimrod-C1 (*NimC1*) ou autres membres de la famille Nimrod, Draper et Eater (*eater*) [367] ou encore Croquemort (*crq*) [368] ou Dscam [181], ni de protéine sécrétée par les plasmatoctes comme l'hémolectine. Les protéines SR-CI et SR-CIV semblent donc provenir des lamellocytes et si des protéines provenant des plasmatoctes sont présentes dans l'analyse, elles doivent être minoritaires.

Dans la liste transcriptomique des gènes immunitaires, il y a deux Gram Negative Binding Proteins, GGBP-like3 et GGBP2. Dans notre liste de protéines associées aux membranes, il y en a aussi deux, GGBP3 et une GGBP-Like (CG30148). GGBP3 est nécessaire pour l'activation de la voie Toll en réponse à des infections fongiques chez la drosophile [366,369] et elle peut être soit associée aux membranes soit libre dans l'hémolymphe. Il n'y a pas d'information disponible sur GGBP-4-Like.

Parmi les protéines de membrane avec un haut score, on trouve aussi la protéine Neuroglian (L1-type Cell Adhesion Molecules (CAM) Neuroglian (*Nrg*)), un membre de la superfamille des immunoglobulines. Neuroglian est critique pour la croissance et la stabilité des synapses et sa fonction dans l'organisation du cytosquelette synaptique est conservé des mouches aux humains [370]. Les voies de signalisation L1-cam dans ces processus cellulaires impliquent à la fois une signalisation locale sur le cytosquelette et une altération de la transcription [370]. L'homologue mammalien de Neuroglian, L1-Cam est aussi nécessaire pour les interactions plaquettes-plaquettes [371]. Neuroglian est important pour l'encapsulation de l'œuf de *L. bouhardi* ISy. Dans les drosophiles dont *Nrg* était éteint par RNAi dans les hémocytes, les œufs de parasitoïdes n'ont pas été encapsulés, aucun lamellocyte n'étant observé à leur surface 48h après oviposition, alors que les plasmatoctes sont présents et forment la première couche de la capsule comme chez les témoins [220].

La protéine Atilla/L1 est aussi retrouvée dans les protéines de membranes, comme un certain nombre de protéines à ancre GPI. Parmi ces protéines, celle codée par *CG9336* est classée dans la sous-famille des Ly6 et *CG15347* fait partie de la superfamille [229]. La sous-famille Ly6 chez la drosophile est composée de deux groupes chromosomiques comprenant neuf gènes (Cluster III et V décrit dans Hijazi et al. [330]). Le groupe III contient trois gènes contigus de Ly6, *CG6583*, *crok* et *atilla* et a une taille de 6,5 kb tandis que Cluster V est un plus grand cluster (32 kb) avec six gènes : *CG31675*, *twit*, *CG9336*, *CG9338*, *CG31675* et *CG14401*. *CG9336* semble résulter d'une duplication récente et l'utilisation d'un mutant exprimant la protéine correspondante

marquée montre son expression dans les cellules gliales, la trachée, le cœur et la glande lymphatique en formation au niveau embryonnaire [229]. Pour *CG15347*, il n'y a pas d'information disponible. La présence de deux autres LY6 homologues d'Atilla/L1 sur la membrane des lamellocytes suggère une possible redondance de fonction, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet lors de son élimination.

Globalement, nous avons trouvé qu'une grande partie des protéines sont associées au cytosquelette : protéines de structure (actines, tubulines) ou associées à sa plasticité et sa stabilité (twinstar (cofilin/ADF), twinfilin, cheerio, flare etc). De nombreuses protéines sont aussi impliquées dans le trafic vésiculaire ainsi que dans l'interaction entre les vésicules et le cytosquelette (ex : les différentes Rabs, GDP dissociation inhibitor, Rack1, ArfGAP, Vamp, V-ATPases etc.), leur transport (kinesine, myosine etc.), l'endocytose (clatrine, flotillines, adaptin, annexins etc.). De même des protéines liant le cytosquelette à la membrane sont en grand nombre (alix, ankyrin, etc) et beaucoup sont aussi impliquées dans la relation à la matrice extracellulaire et dans la formation des jonctions serrées (Intégrines, Neuroglian, gliotactin, contactin, etc.). Des protéines de signalisation sont aussi en quantité (kinases, phosphatases etc.). Tout ceci est en accord avec les fonctions des plasmotocytes en tant que cellules immunitaires de surveillance qui doivent pouvoir se déplacer, adhérer à des substrats et se déformer et qui forment des jonctions serrées au niveau de la capsule entourant l'œuf.

Ces cellules synthétisent et produisent aussi de nouveaux composants comme le montre la présence de chaperonnes classiques (Hsp, Pdi, calreticulin etc.) mais aussi d'un complexe chaperonne dédié, TCP-1 (CCT) (également connu sous le nom de TRiC (TCP-1 ring complex)). Les huit composants du complexe sont retrouvés (CCT1 à CCT8) [372,373]. Seul un nombre relativement faible de protéines dépendent de CCT pour leur biogenèse, en particulier les protéines cytosquelettiques  $\alpha$ - et  $\beta$ -actines et  $\gamma$ -tubulines. Ce complexe participe à la biosynthèse et au repliement de la protéine AML1-ETO l'oncoprotéine de fusion la plus commune dans leucémie myéloïde aiguë humaine [374].

Enfin, de très nombreuses autres fonctions suggérées par l'identité des protéines n'ont pas encore été approfondies, par exemple le système de réponse au stress oxydant incluant le transport de fer ou le métabolisme du Glutathion. Au niveau du métabolisme, il y a de nombreuses voies présentes en lien avec l'utilisation des nutriments attribués à la différenciation des lamellocytes après parasitisme [375]. Ce changement métabolique systémique est médié par l'adénosine extracellulaire libérée par les cellules immunitaires. Les lamellocytes contiennent le facteur de

croissance apparenté à l'adénosine désaminase A (Adgf-A), une désaminase qui régule le taux d'adénosine extracellulaire en convertissant l'adénosine en inosine. Cette activité est importante pour la régulation du métabolisme systémique, en particulier pendant le stress et l'infection [375]. De nombreuses protéines n'ont pas de nom assigné ni de fonction précise décrite. Cependant leur structure ou leur homologie de séquence avec des protéines connues peuvent nous renseigner sur un rôle potentiel. D'autres ont été décrites dans les cribles transcriptomiques et reliées à des fonctions cellulaires. Il faut maintenant assembler ces données.

Au cours de l'étude précédente, nous avons étudié les lamellocytes à l'aide d'anticorps. Nous avons aussi testé ces anticorps en western blot sur les lamellocytes purifiés dont un anti-PPO3 produit au laboratoire ou des anticorps commerciaux contre des protéines présentant de fortes homologies avec des protéines trouvées dans notre étude (G-beta, dipeptidylpeptidase). La Table S6 donne le résultat de ce travail et la Figure S3 montre les blots et les immunolocalisations pour G-beta et dipeptidylpeptidase. Le développement de ce type d'outils pourra servir par la suite à rechercher l'existence de sous classes de lamellocytes.

En conclusion, il reste beaucoup de travail afin d'extraire et ordonner l'ensemble des informations présentes dans ces résultats afin de les rendre publiables. Ce travail ouvrira, je l'espère, un certain nombre de pistes pour mieux comprendre le fonctionnement des lamellocytes au cours de l'encapsulation. Plusieurs critiques peuvent être faites comme le fait de ne pas avoir choisi un seuil pour analyser les protéines mais cela est difficile *à priori* et des protéines même avec un faible score peuvent se révéler importantes. Le choix de l'approche technique pour la purification des membranes peut aussi être critiqué car elle n'a pas permis notamment de purifier les flotillines mais ceci sera discuté dans la conclusion générale.

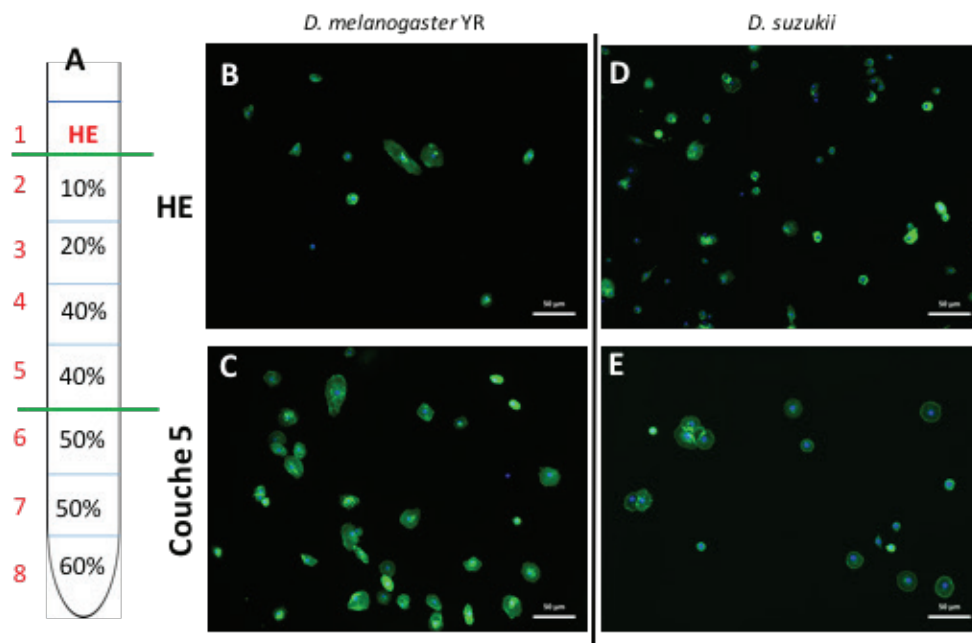
## Informations Supplémentaires : Figure S1-S3

Figure S1 : Peptides identifiés correspondants à PPO2 sur la séquence GenBank: BAB43866.1/NCBI gi|13774118 (Score: 1984).

Les peptides en vert sont identiques avec la séquence de PPO2 et ceux en bleu avec PPO3.

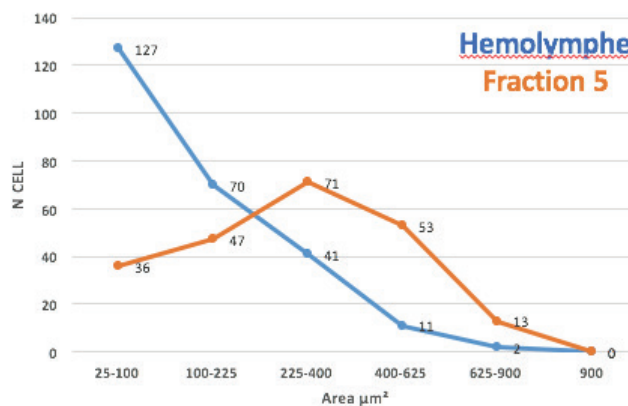
Nom déposé : prophenol oxidase A3, partial [Drosophila melanogaster]

1	<u>MSEEQNQEMD</u>	EFLRPNNFFM	DKGKRVTVFD	VPDSFLTDRY	RPISNEVQSR
51	VGDKVEQRVP	VREISIPDLR	IPMSLGRDEQ	FSLFLPKHRR	IAGRLIDIFM
101	NMRSVDDLQS	VAVYARDRVN	PVLFNYALSV	ALLHRPDTQG	LGSPSFSQTF
151	PDRFIDSQVI	RKMREESFVV	QPGSRMPITI	PRDYTASDL	PEHRLWYFRE
201	DLGINLHHWH	WHLVYPIEAP	DRSIVDKDRR	GELFYMHQQ	IIARYNAERL
251	SNHMARVQPF	NNLDEPIAEG	YFPKMDSLVA	SRAYPPRFDN	TRLSDVDRPN
301	NQLRVGIDDM	KRWRERIYEA	IHQGYVLDTN	NEKIVLDDAK	GIDILGNIIE
351	ASDLTPNSTL	YGDFHNMGHI	LIAYSHDPTN	KHLEYAGVMG	DASTAMRDP
401	FYKWHYSYDR	IFQEHKSRLP	AYTENQLNYP	GVSIAGIQVD	TNGGRPNNLT
451	TFWQQSDVDM	SRGFDFLPRG	NVFARFTHLQ	HLPFTYTISL	NNDGAQRFQ
501	YVRIFMAPKN	DERGQPLMR	DQRSMMIELD	KFVTSLNPGP	NTIRRRSTES
551	SVTIPFERTF	RNLNANRPA	GTPEELEFNF	CGCGWPNHML	VPKGLPEGLQ
601	CVLFIMVSNY	ENDRIDQQLV	GRCSDAASYS	GVRDRLYPDR	QSMGFPPDRL
651	PRSGVDRLVG	AFGNMAKTDG			

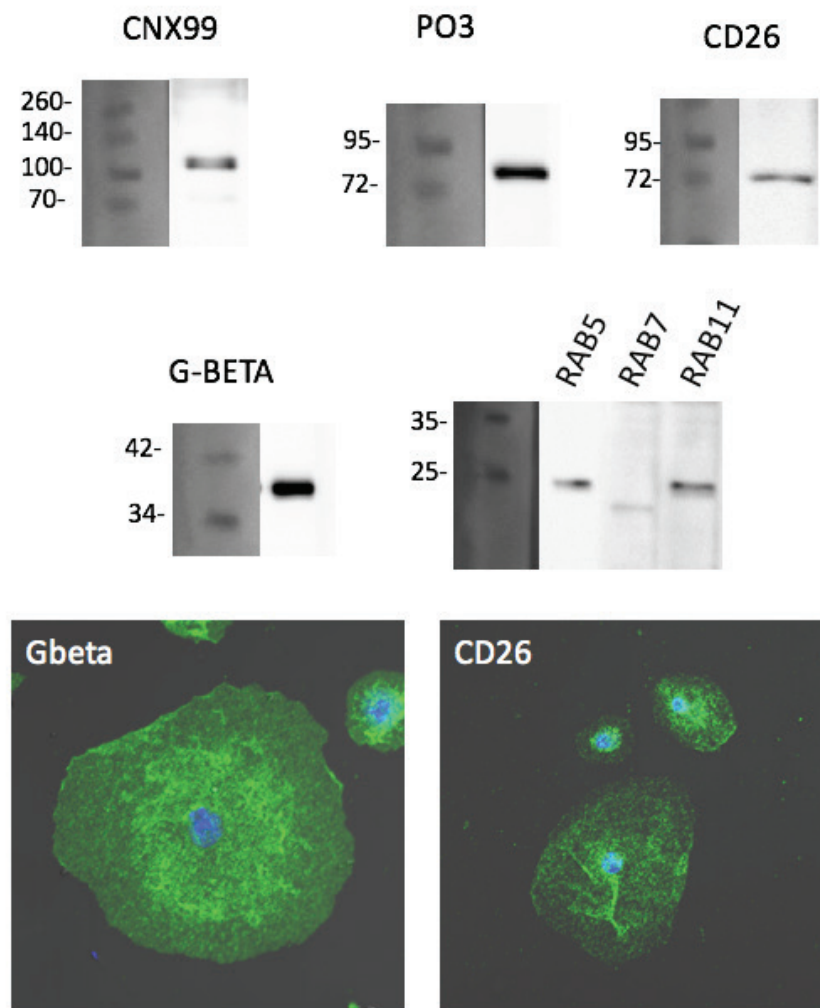


**Figure S2. Purification des hémocytes de *D. melanogaster* YR et *D. sukuii*.**

L'hémolymphe obtenue après dissection de 160 larves L3 parasitées par *L. boulardi* ISy pour *D. melanogaster* YR et *L. heterotoma* pour *D. sukuii* a été séparée sur gradient de percoll (A). Hémocytes avant purification (B, D) et dans la couche 5 en contenant le plus après centrifugation (C, E). Pour *D. melanogaster* YR, il reste de nombreuses petites cellules et peu de lamellocytes. Pour *D. sukuii*, un type d'hémocytes particulier est enrichi dans cette fraction (voir ci-dessous l'augmentation de la distribution de surface des cellules dans le gradient). Ce type ressemble aux podocytes décrits par Kacsoh et al. [303] chez cette espèce. Ces cellules sont phagocytaires et ne ressemblent pas aux lamellocytes qui sont en faible quantité, même 48h après parasitisme. (Actine marquée à la phalloïdine et noyau au DAPI)







**Figure S3. Exemple de résultats des tests des différents anticorps sur lamellocytes purifiés.**

En haut : western blots à partir des lamellocytes purifiés révélés avec les différents anticorps. En bas, immunolocalisation avec les anticorps contre Gbeta et CD26 (en vert). Bleu, noyau coloré au DAPI.

## Informations Supplémentaires : Table S1-S5

**Table S1 : Liste des gènes codants pour les protéines identifiées par l'analyse 2D. Classés par ordre alphabétique.**

<i>Aats-ala</i>	<i>AcCoAS</i>	<i>Act42A</i>	<i>Act79B</i>	<i>Act87E</i>	<i>Adgf-A</i>
<i>Adh</i>	<i>Adk2</i>	<i>AdSL</i>	<i>AdSS</i>	<i>Aldh</i>	<i>alpha-Spec</i>
<i>alphaCOP</i>	<i>alphaTub84B</i>	<i>alphaTub85E</i>	<i>Amun</i>	<i>AnxB10</i>	<i>AnxB11</i>
<i>AnxB9</i>	<i>AOX3</i>	<i>ArfGAP1</i>	<i>arm</i>	<i>Arp1</i>	<i>Arpc2</i>
<i>aru</i>	<i>ave</i>	<i>awd</i>	<i>Axn</i>	<i>betaCOP</i>	<i>betaggt-I</i>
<i>betaTub56D</i>	<i>betaTub60D</i>	<i>betaTub85D</i>	<i>betaTub97EF</i>	<i>blw</i>	<i>bon</i>
<i>bt</i>	<i>bur</i>	<i>CaBP1</i>	<i>CadN</i>	<i>Cam</i>	<i>CAP</i>
<i>Cap-H2</i>	<i>capt</i>	<i>Cat</i>	<i>CCT1</i>	<i>CCT2</i>	<i>Cct3</i>
<i>Ccz1</i>	<i>CD98hc</i>	<i>Cdc37</i>	<i>cert</i>	<i>CG10005</i>	<i>CG10103</i>
<i>CG10119</i>	<i>CG10126</i>	<i>CG10372</i>	<i>CG10376</i>	<i>CG10425</i>	<i>CG10467</i>
<i>CG10576</i>	<i>CG10602</i>	<i>CG10616</i>	<i>CG10721</i>	<i>CG10802</i>	<i>CG10837</i>
<i>CG10887</i>	<i>CG11030</i>	<i>CG11154</i>	<i>CG11284</i>	<i>CG11369</i>	<i>CG11654</i>
<i>CG11771</i>	<i>CG12007</i>	<i>CG12065</i>	<i>CG1208</i>	<i>CG12082</i>	<i>CG12264</i>
<i>CG12413</i>	<i>CG12547</i>	<i>CG12672</i>	<i>CG13032</i>	<i>CG13090</i>	<i>CG13117</i>
<i>CG1316</i>	<i>CG1354</i>	<i>CG1389</i>	<i>CG1416</i>	<i>CG14207</i>	<i>CG1440</i>
<i>CG1444</i>	<i>CG14610</i>	<i>CG14625</i>	<i>CG14840</i>	<i>CG14995</i>	<i>CG1516</i>
<i>CG1532</i>	<i>CG15347</i>	<i>CG1598</i>	<i>CG1637</i>	<i>CG1640</i>	<i>CG16771</i>
<i>CG16827</i>	<i>CG17209</i>	<i>CG17337</i>	<i>CG1749</i>	<i>CG17544</i>	<i>CG17870</i>
<i>CG17896</i>	<i>CG18213</i>	<i>CG18266</i>	<i>CG18507</i>	<i>CG18585</i>	<i>CG1907</i>
<i>CG2050</i>	<i>CG2246</i>	<i>CG2556</i>	<i>CG2681</i>	<i>CG2720</i>	<i>CG2918</i>
<i>CG31075</i>	<i>CG31087</i>	<i>CG31098</i>	<i>CG31196</i>	<i>CG31347</i>	<i>CG3186</i>
<i>CG32026</i>	<i>CG32396</i>	<i>CG3339</i>	<i>CG33486</i>	<i>CG33957</i>	<i>CG34316</i>
<i>CG3725</i>	<i>CG3731</i>	<i>CG3808</i>	<i>CG3821</i>	<i>CG3937</i>	<i>CG40006</i>
<i>CG4035</i>	<i>CG4199</i>	<i>CG42324</i>	<i>CG42675</i>	<i>CG42865</i>	<i>CG4429</i>
<i>CG4532</i>	<i>CG4747</i>	<i>CG4840</i>	<i>CG4938</i>	<i>CG4953</i>	<i>CG5014</i>
<i>CG5028</i>	<i>CG5112</i>	<i>CG5168</i>	<i>CG5188</i>	<i>CG5261</i>	<i>CG5346</i>
<i>CG5353</i>	<i>CG5355</i>	<i>CG5372</i>	<i>CG5384</i>	<i>CG5399</i>	<i>CG5432</i>
<i>CG5455</i>	<i>CG5525</i>	<i>CG5554</i>	<i>CG5590</i>	<i>CG5613</i>	<i>CG5642</i>
<i>CG5704</i>	<i>CG5721</i>	<i>CG5776</i>	<i>CG5844</i>	<i>CG5854</i>	<i>CG5913</i>
<i>CG6028</i>	<i>CG6030</i>	<i>CG6058</i>	<i>CG6335</i>	<i>CG6453</i>	<i>CG6509</i>
<i>CG6512</i>	<i>CG6607</i>	<i>CG6664</i>	<i>CG6724</i>	<i>CG6726</i>	<i>CG6778</i>
<i>CG6835</i>	<i>CG6888</i>	<i>CG6950</i>	<i>CG7058</i>	<i>CG7337</i>	<i>CG7430</i>
<i>CG7611</i>	<i>CG7878</i>	<i>CG7997</i>	<i>CG8036</i>	<i>CG8108</i>	<i>CG8177</i>
<i>CG8209</i>	<i>CG8231</i>	<i>CG8235</i>	<i>CG8257</i>	<i>CG8258</i>	<i>CG8269</i>
<i>CG8312</i>	<i>CG8351</i>	<i>CG8365</i>	<i>CG8439</i>	<i>CG8636</i>	<i>CG8735</i>
<i>CG8839</i>	<i>CG8945</i>	<i>CG9391</i>	<i>CG9429</i>	<i>CG9452</i>	<i>CG9581</i>
<i>CG9677</i>	<i>CG9746</i>	<i>CG9911</i>	<i>CG9953</i>	<i>CG9987</i>	<i>Chc</i>
<i>cher</i>	<i>chic</i>	<i>Cip4-RB</i>	<i>ck</i>	<i>Cklalpha</i>	<i>Clc</i>
<i>Clic</i>	<i>cmpy</i>	<i>corn</i>	<i>coro</i>	<i>Cp1</i>	<i>cpa</i>
<i>cpb</i>	<i>Cpr</i>	<i>Crk</i>	<i>CSN3</i>	<i>CSN4</i>	<i>CtBP</i>
<i>Cyp6t3</i>	<i>Cyp9f2</i>	<i>DAAM</i>	<i>dec-1</i>	<i>dgt1</i>	<i>Dhap-at</i>
<i>DhpD</i>	<i>Dp1</i>	<i>Droj2</i>	<i>dronngo</i>	<i>Eb1</i>	<i>ECsIT</i>
<i>edl</i>	<i>eEF1delta</i>	<i>Ef1alpha100E</i>	<i>Ef1gamma</i>	<i>EF2</i>	<i>Egm</i>
<i>eIF-2alpha</i>	<i>eIF-4a</i>	<i>Eip75B</i>	<i>EndoA</i>	<i>Eno</i>	<i>eRF1</i>
<i>ERp60</i>	<i>Evi5</i>	<i>Faa</i>	<i>FANCI</i>	<i>Fib</i>	<i>Fim</i>
<i>Fit1</i>	<i>FKBP59</i>	<i>Flo1</i>	<i>Flo2</i>	<i>flr</i>	<i>fry</i>
<i>Galt</i>	<i>Gapdh1</i>	<i>Gapdh2</i>	<i>Gdh</i>	<i>Gdi</i>	<i>Gel</i>
<i>Gfat2</i>	<i>GILT3</i>	<i>Gint3</i>	<i>glob2</i>	<i>Glycogenin</i>	<i>Gmer</i>
<i>Got1</i>	<i>Gp93</i>	<i>grsm</i>	<i>GstD1</i>	<i>GstD9</i>	<i>Gtp-bp</i>
<i>Gyc88E</i>	<i>HDAC3</i>	<i>HDC02928</i>	<i>HDC08777</i>	<i>HDC12021</i>	<i>HDC13314</i>
<i>Hel25E</i>	<i>His1</i>	<i>His2Av</i>	<i>His2B</i>	<i>His4</i>	<i>Hmgs</i>
<i>Hrb27C</i>	<i>Hsc70-3</i>	<i>Hsc70-4</i>	<i>Hsc70-5</i>	<i>Hsc70Cb</i>	<i>Hsp60</i>
<i>Hsp83</i>	<i>hts</i>	<i>lbf1</i>	<i>ldgf5</i>	<i>ldh</i>	<i>Jafrac1</i>
<i>kdn</i>	<i>Khc</i>	<i>Klc</i>	<i>Klp10A</i>	<i>Klp98A</i>	<i>krz</i>
<i>l(2)37Cc</i>	<i>Lam</i>	<i>lap</i>	<i>Lectin-24A</i>	<i>Letm1</i>	<i>lost</i>
<i>Lsp1gamma</i>	<i>Map205</i>	<i>Mcr</i>	<i>Mdh2</i>	<i>Men</i>	<i>Men-b</i>
<i>MESK2</i>	<i>Mfe2</i>	<i>micropia\polypotein</i>	<i>Moe</i>	<i>mRNA-cap</i>	<i>mRpL18</i>
<i>mthl4</i>	<i>mute</i>	<i>Myo28B1</i>	<i>mys</i>	<i>Nacalpa</i>	<i>Nap1</i>
<i>Nc73EF</i>	<i>ND75</i>	<i>Neto</i>	<i>nkd</i>	<i>Nmt</i>	<i>NUCB1</i>
<i>nudC</i>	<i>Nup107</i>	<i>Or67b</i>	<i>OstStt3</i>	<i>p47</i>	<i>par-6</i>
<i>parvin</i>	<i>Past1</i>	<i>Pax</i>	<i>Pdi</i>	<i>pgant3</i>	<i>Pgd</i>
<i>Pgk</i>	<i>Phb2</i>	<i>pins</i>	<i>piwi</i>	<i>Pka-R1</i>	<i>Plod</i>
<i>Pmm45A</i>	<i>Pmp70</i>	<i>porin</i>	<i>Pp1-87B</i>	<i>Pp2A-29B</i>	<i>PP2C1</i>

<i>PPO1</i>	<i>PPO3</i>	<i>PpV</i>	<i>Prosalph6</i>	<i>prtp</i>	<i>ps</i>
<i>Ptp61F</i>	<i>Ptp69D</i>	<i>pUf68</i>	<i>Pur-alpha</i>	<i>put</i>	<i>PyK</i>
<i>Rab1</i>	<i>Rab11</i>	<i>Rack1</i>	<i>Ran-like</i>	<i>regucalcin</i>	<i>rept</i>
<i>rhea</i>	<i>RhoGDI</i>	<i>RN-tre</i>	<i>Rop</i>	<i>Rpb5</i>	<i>RpL15</i>
<i>RpL23</i>	<i>RpL23a</i>	<i>RpL3</i>	<i>RpL31</i>	<i>RpL34b</i>	<i>RpL36</i>
<i>RpL4</i>	<i>RpL5</i>	<i>RpL6</i>	<i>RpLP0</i>	<i>RpLP1</i>	<i>Rpn10</i>
<i>Rpn11</i>	<i>Rpn13</i>	<i>Rpn3</i>	<i>Rpn5</i>	<i>Rpn7</i>	<i>RpS12</i>
<i>RpS16</i>	<i>RpS2</i>	<i>RpS23</i>	<i>RpS25</i>	<i>RpS26</i>	<i>RpS3</i>
<i>RpS3A</i>	<i>RpS4</i>	<i>RpS6</i>	<i>Rpt2</i>	<i>Rpt5</i>	<i>RtGEF</i>
<i>Rtn1</i>	<i>RYa-R</i>	<i>Sam-S</i>	<i>ScpX</i>	<i>Scsalph</i>	<i>sds22</i>
<i>Sec31</i>	<i>Sec61alpha</i>	<i>sesB</i>	<i>Sh3beta</i>	<i>shep</i>	<i>shot</i>
<i>Sirt4</i>	<i>SkpA</i>	<i>Slimp</i>	<i>slpr</i>	<i>Snr1</i>	<i>Snx1</i>
<i>Snx6</i>	<i>SpdS</i>	<i>spg</i>	<i>Sply</i>	<i>Spn38F</i>	<i>Spn88Ea</i>
<i>Spt-I</i>	<i>sqd</i>	<i>Sr-CIV</i>	<i>Src42A</i>	<i>Srp68</i>	<i>sta</i>
<i>stai</i>	<i>STIM</i>	<i>stwl</i>	<i>Sucb</i>	<i>sw</i>	<i>Swip-1</i>
<i>tacc</i>	<i>Tango7</i>	<i>Tctp</i>	<i>TER94</i>	<i>TfilFbeta</i>	<i>Tg</i>
<i>Tm1</i>	<i>Traf-like</i>	<i>trc</i>	<i>Treh</i>	<i>trp</i>	<i>Trxr-1</i>
<i>TSG101</i>	<i>tsr</i>	<i>Tudor-SN</i>	<i>twf</i>	<i>tws</i>	<i>Uba3</i>
<i>Ubi-p63E</i>	<i>Ugt86Da</i>	<i>Vha26</i>	<i>Vha44</i>	<i>Vha55</i>	<i>Vha68-2</i>
<i>VhaSFD</i>	<i>vial</i>	<i>vib</i>	<i>Vinc</i>	<i>vkg</i>	<i>Vps20</i>
<i>Vps60</i>	<i>wash</i>	<i>wuho</i>	<i>yata</i>	<i>yuri</i>	<i>Zfrp8</i>
<i>zip</i>					

**Table S2 : Liste des gènes codants pour les protéines identifiées par l'analyse 1D. Classés par ordre alphabétique.**

14-3-3ε	14-3-3ζ	AANATL2	Act42A	Act5C	Act87E
Adgf-A	Adk1	Adk2	Ahcy	AlaRS	Ald
Aldh	Aldh-III	ALiX	Ank2	AnxB10	AnxB11
AnxB9	AnxB9	AP-2α	aralar1	Arf79F	Arfp
Art1	Asap	atilla	ATPsynD	ATPsynβ	ATPsynβ
ATPsyny	ATPsynδ	Atpα	ave	blw	Bsg
byn	CalpA	Calr	CaMKI	capt	Cat
CCT1	CCT2	CCT3	CCT4	CCT5	CCT6
CCT7	CCT8	CD98hc	CG10050	CG10184	CG10217
CG10576	CG10602	CG10616	CG1105	CG11208	CG1129
CG11504	CG11857	CG11876	CG12065	CG1208	CG1208
CG12975	CG13117	CG13185	CG13337	CG13842	CG13887
CG1416	CG1440	CG14610	CG14629	CG1532	CG15347
CG1572	CG1635	CG1640	CG1648	CG1665	CG17294
CG17337	CG17387	CG17544	CG17896	CG2186	CG2277
CG2767	CG2852	CG2918	CG30110	CG30122	CG30148
CG3117	CG31195	CG31198	CG32473	CG32638	CG33054
CG33303	CG34041	CG42394	CG43755	CG4829	CG5028
CG5044	CG5110	CG5112	CG5214	CG5355	CG5390
CG5554	CG5674	CG5854	CG6028	CG6179	CG6404
CG6523	CG7430	CG7461	CG7834	CG8032	CG8036
CG8525	CG8891	CG9149	CG9331	CG9336	CG9384
CG9391	CG9452	CG9674	CG9917	Chd64	cher
chic	cl	Cont	COX4	cpb	Cse1
CtBP	Cyp1	Cyp6d4	DhpD	Dip-B	Dip-C
DppIII	Drip	Eb1	eEF1α1	eEF1y	eIF3f1
eIF4A	Eip55E	Eip93F	Eno	ERp60	Esyt2
Fas3	Fdh	Fer1HCH	Fim	Fit1	flr
Gapdh1	Gapdh2	GCS2α	Gdh	Gdi	Gie
GILT1	Gli	Glo1	glob1	GluProRS	GNBP3
Gos28	Got1	Got2	Gp93	Grasp65	GstD3
GstD9	GstE12	GstE6	GstS1	Gao	Gaq
Hcs	hebe	Hmgs	Hsc70-3	Hsc70-4	Hsc70-5
Hsc70Cb	Hsp60A	Hsp83	ldgf4	ldgf5	ldh
ifc	ImpL3	iPLA2-VIA	lr76a	lrp-1A	ltgaPS4
ltgaPS5	ltgbn	ltp-r83A	Karyβ3	kdn	Kul
I(1)G0156	I(1)G0255	I(2)37Cc	LamC	lap	lost
LpR2	LRP1	Lsp1β	Lsp1y	Mdh2	MED4
Meltrin	Men-b	mew	mfas	Mfe2	MFS3
Mitofilin	Mmp1	mnb	Mpcp2	Mtch	Mtpa
mus304	Myo31DF	Myo61F	Myo95E	mys	Naca
Nc73EF	Nct	ND-75	Nlp	Nph	Nrg
nrv1	NTPase	nudC	Nurf-38	Oat	Or59b
Ost48	OstΔ	P1T	Parg	parvin	PCB
Pdi	Pgk	Pglym78	Phb2	Pkcδ	Plp
Pmm45A	porin	Pp1-87B	Pp2A-29B	PPO1	PPO3
primo-1	Prip	Prosa4	Prosa7	Prosβ5	Prx3
Psn	Rab1	Rab10	Rab11	Rab2	Rab35
Rab5	Rab7	Rala	Ran	Rap1	Rap1
Ras64B	Ras85D	REG	rhea	RhoGDI	rin
Root	Rop	RpL12	RpL30	RpL31	RpL40
RpLP1	RpLP2	Rpn13	Rpn7	RpS14a	RpS25
RpS3A	Rtnl1	rush	scamp	schlank	scu
sel	Sema1a	sesB	Sgt	Shmt2	SLIRP1
Snx6	Spase22-23	Spn43Ab	Spn55B	Spt-I	Sr-CI
sra	stau	Stip1	stwl	Su(r)	Sucb
Swip-1	Syb	Syt1	Syx13	tau	Tctp
Tep4	TFAM	Tm1	Tppll	Treh	Trxr-1
Tsf2	Tspo	tsr	Tudor-SN	Uba1	Ubi-p63E
Uev1A	Unc-89	UQCR-C1	UQCR-C2	Usp8	VaiRS
Vamp7	Vha100-1	Vha100-2	Vha26	Vha36-1	Vha44
Vha55	Vha68-2	Vinc	vir	Vps16A	wal
Wbp2	yip2	Ykt6	α-Est7	αTub84B	αTub85E
βggt-I	βTub60D	γCOP	γTub23C	δCOP	

**Table S3 : Liste des gènes communs et spécifiques.** Liste des gènes codants pour les protéines identifiées à la fois par l'analyse 1D et 2D et des gènes spécifiques de chaque analyse ayant servi pour le diagramme de Venn (Figure 5).

Names	total	elements
Genes 1D Genes 2D	117	CG1532 cher PPO3 Act87E Swip-1 cpb Vha68-2 Rab1 Pkg CG12065 CG17896 CG10576 parvin Treh CG8036 Hsc70-5 stwl Pdi AnxB10 CG5554 Pp2A-29B ERp60 CG7430 Men-b sesB Mdh2 Vha26 Vinc Eno Vha44 blw Tm1 mys CG2918 Ubi-p63E Rpn13 Pmm45A CG5355 RpLP1 CG9452 capt RpL31 Fit1 CCT2 Hsp83 CtBP Vha55 Gdh CG1208 ave Mfe2 nudC Spt-I GstD9 CG5854 Idgf5 CG1440 Tudor-SN RhoGDI Eb1 Hsc70-4 Gp93 Got1 Gdi fir RpS25 Act42A CG6028 Rtnl1 Adgf-A l(2)37Cc porin CG17544 CG5112 Gapdh1 chic Trxr-1 CCT1 CG15347 CG10602 Hsc70Cb RpS3A Fim CG5028 Snx6 CG10616 CG14610 Tcpt Rpn7 lost Phb2 AnxB11 Gapdh2 Rab11 Rop CG13117 CD98hc Cat Idh PPO1 Aldh Pp1-87B AnxB9 kdn DhpD Hsc70-3 lap CG1416 Suchb CG1640 Hmgs Adk2 rhea tsr CG9391 CG17337 Nc73EF
Genes 1D	263	mnb l(1)G0255 eIF4A Rab35 GILT1 CG6404 CG2277 CG10050 Rab7 CG5390 Usp8 CG1665 Uev1A l±-Est7 CG31198 Adk1 Dip-B Sgt SLIRP1 Fer1HCH CG11208 wal Mpcp2 Eip55E CG32473 Glo1 MED4 CG2852 REG RpLP2 CG7461 Hcs CG1129 PCB l±Tub23C Hsp60A CG2186 TFAM hebe AlaRS UQCR-C1 Fdh Itgln ImpL3 Prx3 CG13337 Vps16A rin Ras85D primo-1 Ost48 CG1105 LRP1 Root CG17294 Nurf-38 14-3-3jµ Vamp7 Meltrin Gos28 RpS14a Cyp1 AANATL2 RpL30 eIF3f1 CG4829 l±COP P1T Mmp1 CG42394 cl CG5674 mfas Mitofilin Kul sel Drip scu Syx13 Chd64 Tep4 CG8525 CG8891 Myo61F iPLA2-VIA vir Myo31DF Idgf4 Plp l±COP CG9384 CG1572 Nph GstS1 Esys2 CG43755 CG11857 CG10217 nrv1 CCT8 ATPsynl± Parg mus304 Tppll Nacl± GstD3 Sr-Ci Prosl±7 rush Atp± Mtp± Aldh-III CG2767 CCT3 yip2 Ran Rab2 mew Sema1a Cont UQCR-C2 GluProRS CaMKI LpR2 Rab10 l±Tub60D Calr ItgaPS4 Ald CG31195 ValRS Syt1 Irp-1A l(1)G0156 Ykt6 stau sra Oat CG13887 Mtch Gli Gle CG9149 RpL12 CG32638 ifc ItgaPS5 Lsp1± Myo95E ATPsynl± CG30122 CG3117 Tsf2 CCT4 14-3-3l± GNBP3 Got2 eEF1± eEF1± ±1 ATPsynl± byn CG34041 MFS3 Shmt2 l±Tub85E Ank2 AP-2l± Pkc± Tspo CG6179 Ostl± schlank CG11504 CG1648 CalpA Or59b Fas3 Stip1 Ahcy atilla Ras64B CG33054 CG11876 Bsg scamp CG12975 CG6523 Pglym78 CG5110 CG9336 ND-75 Wbp2 Lsp1± CG13842 Prip Arfp CCT5 CG33303 CG30110 Arf79F Uba1 CG1635 Karyl±3 Nct tau Dppll ATPsynD GstE12 Pgg±l Prosl±4 CG5044 CG10184 Dip-C Su(r) COX4 CG14629 aralar1 Spr43Ab l±Tub84B CG8032 Rab5 CG9331 glob1 RpL40 ALiX CG17387 Art1 Rap1 Syb Grasp65 CCT6 Gl±o CG9917 Eip93F Cyp6d4 CG7834 Act5C Spn55B GCS2±± ASAP NTPase Rala Spase22-23 Ir76a GstE6 Unc-89 Vha100-2 Nrg Gl±q Psn Cse1 Vha36-1 CG13185 ltp-r83A Nlp CG9674 Prosl±5 LamC CCT7 Vha100-1 CG5214 CG30148
Genes 2D	388	CG14995 CG8351 CG3339 Past1 CG10005 bur CG42324 Cap-H2 CG5642 Fib CG9429 DAAM CG18507 CG9911 CG12082 Cct3 betaTub85D TflIFbeta Plod corn krz CG5704 CG1637 CG11369 RN-tre betaTub56D CG13032 vib CG5844 His1 RpLP0 zip Map205 CG6888 CG5613 CG4429 Galt alphaCOP Gel CG3821 CG9581 CG10376 CG1316 betaCOP CG7611 Klc CG11654 His2B Axn arm trp CSN3 AcCoAS ScaAlpha Cyp6i3 CG1354 Droj2 CG5384 cpa CG31075 ND75 CG2681 Hrb27C Sec31 CG17209 Prosalpha6 CG1749 aru Chc CG12413 PpV sw STIM CG1516 Rpn3 Sh3beta Cpr Eflalpha100E CG10837 CG6950 CG3186 CG6778 wash CG6453 fry CG6607 Arp1 grsm CG8839 Cdc37 CG5525 CG4953 MESK2 Evi5 EF2 CG2050 RpL34b Vps20 Nap1 CG32396 CG8269 Gmer CG10802 SpdS RpL15 Sr-CIV sta twf PyK AdSL CG18266 ps CG2556 Cip4-RB CG6724 CG5261 Sirt4 CG6058 CG16827 CG12007 bt RpS2 RpL36 CSN4 eRF1 CG6030 pgant3 CG7878 RpL6 CAP eIF-2alpha Hsp60 CG5721 cmpy shot Pmp70 RpS23 EndoA Men CG31347 Adh HDC02928 CG7337 CG8439 NUCB1 Myo28B1 CG8735 TSG101 CG1389 CG7058 FANCI VhaSFD mRNA-cap CG6509 Faa Zfrp8 Spn88Ea CG33486 tacc eEF1delta CG32026 sqd RpL4 CG4938 Pgd CG7997 CG6835 CG12547 Mcr Klp98A Ran-like CG5776 Ugt86Da CG6664 RpS3 Cklalpha CG10372 CG8108 CadN mute Snr1 yata CG10119 rept HDC08777 Nacalpha Uba3 Lam His2Av CG9746 CG42675 Rack1 CG5346 RYa-R alphaTub85E mthl4 lbf1 eIF-4a CG6512 CG34316 Tg PP2C1 tws Sply ArfGAP1 TER94 betaTub60D ScpX Act79B Egm dec-1 CG8235 Srp68 HDAC3 vkg Eip75B put His4 CG3937 Lsp1gamma Gtp-bp CG5399 Clic Amun CG8209 ck Dp1 Tango7 CG8231 RpL5 piwi CG5372 yuri CG40006 drongo RpL3 GstD1 cert CG5188 alphaTub84B Spn38F Gfat2 hts Dhap-at wuho betaggt-l Ptp69D slpr sds22 CG8636 Glycogenin CG4532 Snx1 Cyp9F2 RpS4 Or67b Klp10A CG6726 Nmt CG14625 Traf-like Clic CG10126 Cp1 p47 Rpn11 awd Flo2 CG3808 Lectin-24A CG11284 Rpn10 CG14840 CG14207 CG9677 CG11154 CG10887 stai CG5168 OstStt3 CG3725 Nup107 bon CG8177 CG9953 pUf68 Pka-R1 Flo1 Src42A CG10721 prtp Rpt5 Ccz1 CG13090 CG5455 Gint3 Gyc88E trc edl mRpl18 CG11030 nkd Crk ECSIT CG8257 par-6 CG31087 shep CG3731 CG33957 Eflgamma Aats-ala CG5014 CG31196 AdSS Sec61alpha CG8312 HDC13314 CG17870 Cam CG2720 Letm1 RpS6 Rpb5 alpha-Spec Slimp CG10425 CG1907 FKBP59 RtGEF CG31098 CG10103 micropolia/polyprotein CG5590 pins spg GILT3 CG10467 CG2246 Arpc2 CG8945 coro CG18585 CG11771 CG1598 CG42865 RpL23a RpL23 Pur-alpha Vps60 CG12264 CG16771 CG4840 glob2 CG4199 viaf CG4747 CG5353 CG4035 RpS26 CG5913 SkpA Rpt2 CG8258 CG12672 Sam-S dgt1 CG9987 Hel25E Moe CaBP1 CG6335 Neto regucalcin CG1444 betaTub97EF HDC12021 RpS12 Khc Pax AOX3 Ptp61F CG5432 Rpn5 Jafrac1 RpS16 CG18213 CG8365



**Table S4 : Liste des gènes uniques codants pour les protéines identifiées. Classés par ordre alphabétique.**

14-3-3ε	14-3-3ζ	AANATL2	Aats-ala	AcCoAS	Act42A
Act5C	Act79B	Act87E	Adgf-A	Adh	Adk1
Adk2	AdSL	AdSS	Ahcy	AlaRS	Ald
Aldh	Aldh-III	ALiX	alpha-Spec	alphaCOP	alphaTub84B
alphaTub85E	Amun	Ank2	AnxB10	AnxB11	AnxB9
AOX3	AP-2α	aralar1	Arf79F	ArfGAP1	Arfip
arm	Arp1	Arpc2	Art1	aru	Asap
atilla	ATPsynD	ATPsynβ	ATPsynγ	ATPsynδ	Atpc
ave	awd	Axn	betaCOP	betaggt-I	betaTub56D
betaTub60D	betaTub85D	betaTub97EF	blw	bon	Bsg
bt	bur	byn	CaBP1	CadN	CalpA
Calr	Cam	CaMKI	CAP	Cap-H2	capt
Cat	CCT1	CCT2	CCT3	CCT4	CCT5
CCT6	CCT7	CCT8	Ccz1	CD98hc	Cdc37
cert	CG10005	CG10050	CG10103	CG10119	CG10126
CG10184	CG10217	CG10372	CG10376	CG10425	CG10467
CG10576	CG10602	CG10616	CG10721	CG10802	CG10837
CG10887	CG11030	CG1105	CG11154	CG11208	CG11284
CG1129	CG11369	CG11504	CG11654	CG11771	CG11857
CG11876	CG12007	CG12065	CG1208	CG12082	CG12264
CG12413	CG12547	CG12672	CG12975	CG13032	CG13090
CG13117	CG1316	CG13185	CG13337	CG1354	CG13842
CG13887	CG1389	CG1416	CG14207	CG1440	CG1444
CG14610	CG14625	CG14629	CG14840	CG1516	CG15347
CG1572	CG1598	CG1635	CG1637	CG1640	CG1648
CG1665	CG16771	CG16827	CG17209	CG17294	CG17337
CG17387	CG1749	CG17544	CG17870	CG17896	CG18213
CG18266	CG18507	CG18585	CG1907	CG2050	CG2186
CG2246	CG2277	CG2556	CG2681	CG2720	CG2767
CG2852	CG2918	CG30110	CG30122	CG30148	CG31075
CG31087	CG31098	CG3117	CG31195	CG31196	CG31198
CG31347	CG3186	CG32026	CG32396	CG32473	CG32638
CG33054	CG33303	CG3339	CG33486	CG33957	CG34041
CG34316	CG3725	CG3731	CG3808	CG3821	CG3937
CG40006	CG4035	CG4199	CG42324	CG42394	CG42675
CG42865	CG43755	CG4429	CG4532	CG4747	CG4829
CG4840	CG4938	CG4953	CG5014	CG5028	CG5044
CG5110	CG5112	CG5168	CG5188	CG5214	CG5261
CG5346	CG5353	CG5355	CG5372	CG5384	CG5390
CG5399	CG5432	CG5455	CG5525	CG5554	CG5590
CG5613	CG5642	CG5674	CG5704	CG5721	CG5776
CG5844	CG5854	CG5913	CG6028	CG6030	CG6058
CG6179	CG6335	CG6404	CG6453	CG6509	CG6512
CG6523	CG6607	CG6664	CG6724	CG6726	CG6778
CG6835	CG6888	CG6950	CG7058	CG7337	CG7430
CG7461	CG7611	CG7834	CG7878	CG7997	CG8032
CG8036	CG8108	CG8177	CG8209	CG8231	CG8235
CG8257	CG8258	CG8269	CG8312	CG8351	CG8365
CG8439	CG8525	CG8636	CG8735	CG8839	CG8891
CG8945	CG9149	CG9331	CG9336	CG9384	CG9391
CG9429	CG9452	CG9581	CG9674	CG9677	CG9746
CG9911	CG9917	CG9953	CG9987	Chc	Chd64
cher	chic	Cip4-RB	ck	Cklalpha	cl
Clc	Clic	cmpy	Cont	corn	coro
COX4	Cp1	cpa	cpb	Cpr	Crk
Cse1	CSN3	CSN4	CtBP	Cyp1	Cyp6d4
Cyp6t3	Cyp9f2	DAAM	dec-1	dgt1	Dhap-at
DhpD	Dip-B	Dip-C	Dp1	DppIII	Drip
Droj2	drongo	Eb1	ECSIT	edl	eEF1delta
eEF1α1	eEF1γ	Ef1alpha100E	Ef1gamma	EF2	Egm
eIF-2alpha	eIF-4a	eIF3f1	eIF4A	Eip55E	Eip75B
Eip93F	EndoA	Eno	eRF1	ERp60	Esyt2
Evi5	Faa	FANCI	Fas3	Fdh	Fer1HCH
Fib	Fim	Fit1	FKBP59	Flo1	Flo2
flr	fry	Galt	Gapdh1	Gapdh2	GCS2α
Gdh	Gdi	Gel	Gfat2	Gie	GILT1
GILT3	Gint3	Gli	Glo1	glob1	glob2
GluProRS	Glycogenin	Gmer	GNBP3	Gos28	Got1

Got2	Gp93	Grasp65	grsm	GstD1	GstD3
GstD9	GstE12	GstE6	GstS1	Gtp-bp	Gyc88E
Gao	Gaq	Hcs	HDAC3	HDC02928	HDC08777
HDC12021	HDC13314	hebe	Hel25E	His1	His2Av
His2B	His4	Hmgs	Hrb27C	Hsc70-3	Hsc70-4
Hsc70-5	Hsc70Cb	Hsp60	Hsp60A	Hsp83	hts
lbf1	ldgf4	ldgf5	ldh	ifc	ImpL3
iPLA2-VIA	lr76a	lrp-1A	ltgaPS4	ltgaPS5	ltgbn
ltp-r83A	Jafrac1	Karyβ3	kdn	Khc	Klc
Klp10A	Klp98A	krz	Kul	I(1)G0156	I(1)G0255
I(2)37Cc	Lam	LamC	lap	Lectin-24A	Letm1
lost	LpR2	LRP1	Lsp1β	Lsp1γ	Map205
Mcr	Mdh2	MED4	Meltrin	Men	Men-b
MESK2	mew	mfas	Mfe2	MFS3	micropialpolyprotein
Mitofilin	Mmp1	Moe	Mpcp2	mRNA-cap	mRpL18
Mtch	mthl4	Mtpα	mus304	mute	Myo28B1
Myo31DF	Myo61F	Myo95E	mys	Nacalpa	Nacα
Nap1	Nc73EF	Nct	ND-75	ND75	Neto
nkd	Nlp	Nmt	Nph	Nrg	nrv1
NTPase	NUCB1	nudC	Nup107	Nurf-38	Oat
Or59b	Or67b	Ost48	OstStt3	OstΔ	PVT
p47	par-6	Parg	parvin	Past1	Pax
PCB	Pdi	pgant3	Pgd	Pgk	Pglym78
Phb2	pins	piwi	Pka-R1	Pkcδ	Plod
Plp	Pmm45A	Pmp70	porin	Pp1-87B	Pp2A-29B
PP2C1	PPO1	PPO3	PpV	primo-1	Prip
Prosalph6	Prosa4	Prosa7	Prosβ5	prtp	Prx3
ps	Psn	Ptp61F	Ptp69D	pUf68	Pur-alpha
put	PyK	Rab1	Rab10	Rab11	Rab2
Rab35	Rab5	Rab7	Rack1	Rala	Ran
Ran-like	Rap1	Ras64B	Ras85D	REG	regucalcin
rept	rhea	RhoGDI	rin	RN-tre	Root
Rop	Rpb5	RpL12	RpL15	RpL23	RpL23a
Rpl3	RpL30	RpL31	RpL34b	RpL36	RpL4
RpL40	RpL5	RpL6	RpLP0	RpLP1	RpLP2
Rpn10	Rpn11	Rpn13	Rpn3	Rpn5	Rpn7
RpS12	RpS14a	RpS16	RpS2	RpS23	RpS25
RpS26	RpS3	RpS3A	RpS4	RpS6	Rpt2
Rpt5	RtGEF	Rtn1	rush	RYa-R	Sam-S
scamp	schlank	ScpX	Scsalph	scu	sds22
Sec31	Sec61alpha	sel	Sema1a	sesB	Sgt
Sh3beta	shep	Shmt2	shot	Sirt4	SkpA
Slimp	SLIRP1	slpr	Snr1	Snx1	Snx6
Spase22-23	SpdS	spg	Sply	Spn38F	Spn43Ab
Spn55B	Spn88Ea	Spt-l	sqd	Sr-CI	Sr-CIV
sra	Src42A	Srp68	sta	stai	stau
STIM	Stip1	stwl	Su(r)	Sucb	sw
Swip-1	Syb	Syt1	Syx13	tacc	Tango7
tau	Tctp	Tep4	TER94	TFAM	TfllFbeta
Tg	Tm1	Tppll	Traf-like	trc	Treh
trp	Trxr-1	Tsf2	TSG101	Tspo	tsr
Tudor-SN	twf	tws	Uba1	Uba3	Ubi-p63E
Uev1A	Ugt86Da	Unc-89	UQCR-C1	UQCR-C2	Usp8
ValRS	Vamp7	Vha100-1	Vha100-2	Vha26	Vha36-1
Vha44	Vha55	Vha68-2	VhaSFD	vial	vib
Vinc	vir	vkg	Vps16A	Vps20	Vps60
wal	wash	Wbp2	wuho	yata	yip2
Ykt6	yuri	Zfrp8	zip	α-Est7	αTub84B
αTub85E	βggt-l	βTub60D	γCOP	γTub23C	δCOP



**Table S5 : Liste des gènes principalement impliqués dans la réponse immunitaire provenant des tables 1 and 2 de la publication Irving et al., [234]. Value = valeur normalisée du gène.**

Value	Gene name	Gene ID	Feature/Fonction
0,3	<i>lectin-24Db</i>	<i>lectin-24Db</i>	C-type lectin-like
0,5	<i>PGRP-SA</i>	<i>PGRP-SA</i>	Peptidoglycan recognition protein
0,6	<i>serpin-27A</i>	<i>Spn27A</i>	Serpin
0,6	<i>GNBP-like 4</i>	<i>GNBP-like3</i>	Gram-negative binding protein-like
0,7	<i>tenascin-m</i>	<i>Ten-m</i>	Cell adhesion
0,8	<i>tube</i>	<i>tub</i>	Adapter
0,8	<i>CG18477</i>	<i>CG18477</i>	Serine protease
0,9	<i>CG3505</i>	<i>CG3505</i>	Monophenol monooxygenase activator
0,9	<i>tiggrin</i>	<i>Tig</i>	Haem oxygenase-like, multi-helical
0,9	<i>hemipterous</i>	<i>hep</i>	serine/threonine protein kinase
1	<i>hopscotch</i>	<i>hop</i>	Janus kinase
1	<i>Tak1</i>	<i>Tak1</i>	MAPKKK
1,1	<i>domino</i>	<i>dom</i>	Chromatin remodelling
1,2	<i>drosomycin</i>	<i>Drs</i>	Antimicrobial peptide
1,2	<i>GNBP2</i>	<i>GNBP2</i>	Gram-negative binding protein
1,3	<i>cactus</i>	<i>cact</i>	Inhibitor
1,4	<i>CG9733</i>	<i>CG9733</i>	Monophenol monooxygenase activator
1,4	<i>lamininB1</i>	<i>LanB1</i>	Laminin EGF domain
1,6	<i>Toll</i>	<i>Tl</i>	Transmembrane receptor
1,6	<i>amalgam</i>	<i>Ama</i>	Immunoglobulin subtype 2
1,6	<i>CG6124</i>	<i>CG6124</i>	
1,7	<i>croquemort</i>	<i>crq</i>	Macrophage receptor
1,7	<i>CG33115</i>	<i>CG33115</i>	
1,8	<i>CG18478</i>	<i>CG18478</i>	Serine protease
2	<i>PGRP-LA</i>	<i>PGRP-LA</i>	Peptidoglycan recognition protein
2	<i>kayak</i>	<i>kay</i>	transcription factors Fos
2,1	<i>Pvr</i>	<i>Pvr</i>	VEGF receptor-like
2,2	<i>MyD88</i>	<i>MyD88</i>	Adapter
2,2	<i>glutactin</i>	<i>Glt</i>	Secreted cholinesterase/carboxylesterase-like proteins
2,3	<i>pelle</i>	<i>pil</i>	Protein serine/threonine kinase
2,3	<i>PGRP-LE</i>	<i>PGRP-LE</i>	Peptidoglycan recognition protein
2,4	<i>hemolectin</i>	<i>Hml</i>	Lectin
2,4	<i>turandot F</i>	<i>TotF</i>	Unknown
2,4	<i>basket</i>	<i>bsk</i>	serine/threonine-protein kinase, JNK
2,6	<i>Stat92E</i>	<i>Stat92E</i>	Transcription factor
2,6	<i>relish</i>	<i>Rel</i>	Rel transcription factor
2,6	<i>CG6639</i>	<i>CG6639</i>	Serine protease
2,7	<i>fat-spondin</i>	<i>fat-spondin</i>	Serine-type endopeptidase inhibitor
2,7	<i>CG1762</i>	<i>Itgbn</i>	Integrin betanu subunit
2,8	<i>lamininA</i>	<i>LanA</i>	Lectin
2,9	<i>peroxidasin</i>	<i>Pxn</i>	Extracellular matrix
3	<i>Melanization Protease 1</i>	<i>MP1</i>	Monophenol monooxygenase activator ( <i>CG1102</i> )
3	<i>lamininB2</i>	<i>LanB2</i>	extracellular matrix
3,4	<i>puckered</i>	<i>puc</i>	serine/threonine protein phosphatase
4,1	<i>spätzle</i>	<i>spz</i>	Toll receptor ligand
4,1	<i>lectin-28C</i>	<i>lectin-28C</i>	Lectin
4,4	<i>mew</i>	<i>mew</i>	Integrine $\alpha$ PS1
4,4	<i>misshapen</i>	<i>msn</i>	Sterile 20 MAP kinase kinase kinase
4,5	<i>viking</i>	<i>vkg</i>	Collagen IV alpha2 chain
5,1	<i>collagen type IV</i>	<i>Col4a1</i>	Collagen type IV $\alpha$ 1 chain
5,2	<i>serpent</i>	<i>srp</i>	GATA factor
5,9	<i>teplI</i>	<i>teplI</i>	Thioester containing protein
6	<i>Jra</i>	<i>Jra</i>	Jun-related antigen
6,1	<i>Integrin alphaPS5 subunit</i>	<i>ItgaPS5</i>	Integrin alphaPS5 subunit
6,3	<i>CG9372</i>	<i>CG9372</i>	Serine protease
6,9	<i>Prophenoloxidase 1</i>	<i>PPO1</i>	Monophenol monooxygenase ( <i>CG5779</i> )

<b>7,2</b>	<i>CG4259</i>	<i>CG4259</i>	Serine protease
<b>8,1</b>	<i>BM-40-SPARC</i>	<i>SPARC</i>	extracellular matrix binding
<b>9,1</b>	<i>tepl</i>	<i>Tep1</i>	Thioester containing protein
<b>13</b>	<i>galectin</i>	<i>galectin</i>	Lectin
<b>13,5</b>	<i>dSr-CI</i>	<i>Sr-CI</i>	Scavenger receptor
<b>14,7</b>	<i>vinculin</i>	<i>Vinc</i>	Actin binding
<b>16</b>	<i>teplV</i>	<i>Tep4</i>	Thioester containing protein
<b>17,5</b>	<i>lachesin</i>	<i>Lac</i>	Immunoglobulin subtype 2
<b>18,8</b>	<i>Prophenoloxidase 2</i>	<i>PPO2</i>	Monophenol monooxygenase ( <i>CG8193</i> )
<b>18,8</b>	<i>turandot M</i>	<i>TotM</i>	Unknown
<b>23,4</b>	<i>Integrin alphaPS4 subunit</i>	<i>ItgaPS4</i>	Integrin alphaPS4 subunit
<b>31,2</b>	<i>Prophenoloxidase 3</i>	<i>PPO3</i>	Monophenol monooxygenase ( <i>Dox-A3</i> )
<b>31,9</b>	<i>myospheroid</i>	<i>Mys</i>	$\beta$ subunit integrin

**Table S6 : Résultats des tests des différents anticorps sur les lamellocytes purifiés.** L'absence de réaction peut être due à une non reconnaissance du ou des épitopes dans la condition testée. ? : non testé.

<b>Techniques Anticorps</b>	<b>WB avec les lamellocytes purifiés</b>	<b>Immunofluorescence avec les lamellocytes</b>
Rab 7	+	+
Rab 11	+	+
Calnexin 99	+	+
Flotilline-1	-	+
Attila/L1 (monoclonal)	-	+
Attila/L1 (polyclonal)	+	?
Myospheroid	-	+
Rac-1	-	+
Lamp-1	-	+
Rab 5	+	+
Clathrin	-	+
G-beta	+	+
CD26	+	+
PO3	+	-

# **Partie 6**

## **Discussion Générale et Perspectives**

## Biogénèse des vénosomes

Au vu de mes résultats et de ceux de la littérature, il apparaît que les vénosomes sont un nouveau type de vésicules qui résultent d'une sécrétion de matériel par les cellules particulières de la glande à venin. Le matériel sécrété subit un processus de maturation pour former une matrice dense aux électrons qui semble être initiée au niveau du canal des cellules de la glande et est retrouvée tout au long de sa lumière et du canal connecteur pour aboutir dans le réservoir à des vésicules membranées individualisées. Les vésicules matures présentent une morphologie différente suivant les groupes d'espèces au sein des Leptopilina (en forme étoilée avec des spikes chez *L. heterotoma* et *L. victoriae* ; de forme arrondie et contenant des nanovesicules chez *L. boulardi*). Les facteurs retrouvés dans les vésicules sont sécrétés tout le long de la glande ce qui exclut un « emballage » et une sélection des facteurs à emballer de façon zonale. Chez *L. boulardi*, ces deux processus semblent avoir lieu dans le canal connecteur reliant la glande au réservoir dans lequel on trouve des vésicules matures. Enfin, la faible quantité de matrice chez ISy est associée à une faible quantité de vénosomes.

Toutes les cellules semblent capables de libérer plusieurs types vésicules dans le milieu extracellulaire, que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques [376–378]. Parmi leurs caractéristiques communes, ces vésicules sont globalement rondes, délimitées par une membrane comparable à la membrane plasmique et elles contiennent des protéines solubles et du matériel génétique (ARN, ADN) (Figure 41) (Exocarta. <http://www.exocarta.org>) [379–381]. Ces vésicules ne sont pas homogènes, elles se différencient par leur taille, leurs caractéristiques physicochimiques, leur composition en lipides et en protéines et selon le mécanisme de biogénèse (Tableau III) [382]. Le terme de microparticules qui englobe tous les types de vésicules est souvent utilisé pour les décrire surtout leur origine n'a pas été précisément caractérisée.

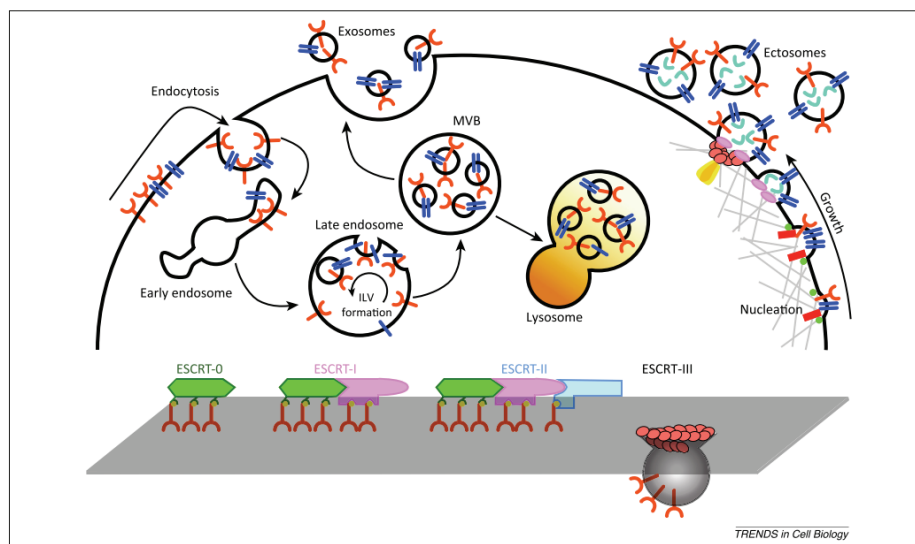
Les exosomes, les plus étudiés, représentent un type spécifique de vésicules issues de la voie endosomale (Figure 41). Au niveau des endosomes tardifs ou corps multivésiculaires (multivesicular bodies, MVB), la membrane des endosomes subit une invagination vers l'intérieur qui s'individualise et forme une ou plusieurs vésicules (vésicules intraluminales). Les MVB peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique et libérer dans le milieu extracellulaire les vésicules intraluminales qui sont alors appelées exosomes. La biogénèse, le transport et la libération des exosomes font intervenir le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) [383]. Les exosomes ont une forme concave avec une taille comprise entre

20 et 100 nm en microscopie électronique et ils contiennent des protéines et lipides spécifiques de leur voie de biogenèse. Outre les exosomes, la biogenèse d'autres vésicules extracellulaires a été décrite (Figure 41). Ces microvésicules constituent des groupes très variés de vésicules, de 50 à 1000 nm, qui sont directement issues du bourgeonnement de la membrane plasmique (Tableau III).

**Tableau III: Liste des caractéristiques principales des différents types de vésicules issues de cellules.**

nm, nanomètres. ND, non déterminé. TSG101, tumour susceptibility gene 101. CR1, complement component receptor 1. TNFR1, tumour necrosis factor receptor 1 [382].

Feature*	Exosomes	Microvesicles	Ectosomes	Membrane particles	Exosome-like vesicles	Apoptotic vesicles
Size	50–100 nm	100–1,000 nm	50–200 nm	50–80 nm	20–50 nm	50–500 nm
Density in sucrose	1.13–1.19 g/ml	ND	ND	1.04–1.07 g/ml	1.1 g/ml	1.16–1.28 g/ml
Appearance by electron microscopy <sup>†</sup>	Cup shape	Irregular shape and electron-dense	Bilamellar round structures	Round	Irregular shape	Heterogeneous
Sedimentation	100,000 g	10,000 g	160,000–200,000 g	100,000–200,000 g	175,000 g	1,200g, 10,000 g or 100,000 g
Lipid composition	Enriched in cholesterol, sphingomyelin and ceramide; contain lipid rafts; expose phosphatidylserine	Expose phosphatidylserine	Enriched in cholesterol and diacylglycerol; expose phosphatidylserine	ND	Do not contain lipid rafts	ND
Main protein markers	Tetraspanins (CD63, CD9), Alix and TSG101	Integrins, selectins and CD40 ligand	CR1 and proteolytic enzymes; no CD63	CD133; no CD63	TNFR1	Histones
Intracellular origin	Internal compartments (endosomes)	Plasma membrane	Plasma membrane	Plasma membrane	Internal compartments?	ND

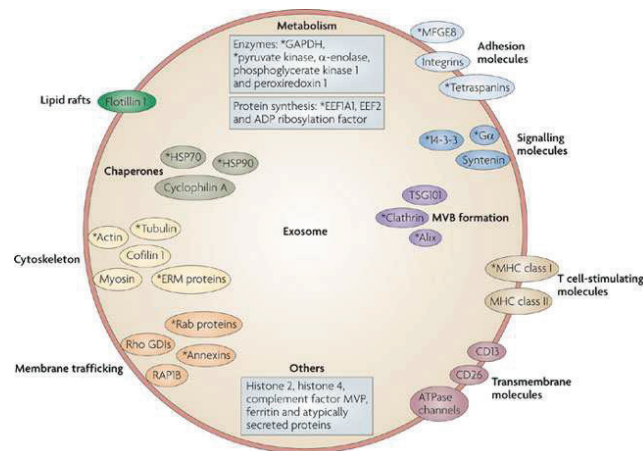


**Figure 41: Représentation schématique des voies de sécrétion des différents types de vésicules depuis la membrane plasmique, ou issues de compartiments endocytaires [383].**

La biogenèse des exosomes et leur trafic intracellulaire sont représentés sur la gauche. Les protéines transmembranaires (en rouge) sont endocytées et cédées aux endosomes précoces. Une fois triés aux endosomes tardifs, le complexe requis pour le transport (ESCRT)-0 recrute des protéines ubiquitinées, tandis que ESCRT-I et -II interviennent dans le bourgeonnement des vésicules intraluminales (ILV). Le corps multivésiculaire (MVB) peut soit suivre une voie de dégradation en fusionnant avec les lysosomes (orange), soit libérer les ILV comme exosomes dans l'espace extracellulaire par une étape d'exocytose. Un résumé du cycle ESCRT pour les exosomes est montré en bas.

L'assemblage des ectosomes est illustré sur la droite. Au cours de la nucléation au niveau de la membrane plasmique, les protéines transmembranaires (bleues) sont regroupées dans des domaines membranaires discrets qui favorisent le bourgeonnement de la membrane. Les tétraspanines et d'autres protéines abondantes peuvent jouer un rôle en favorisant le tri des autres composants. Les ancres lipidiques (myristoylation, palmitoylation) des protéines (vertes) accumulent des protéines dans la lumière et contribuent à la courbure de la membrane. Les mécanismes supplémentaires de formation des ectosomes comprennent les scramblases activées par le  $\text{Ca}^{2+}$  (rectangles rouges), qui randomisent la distribution des lipides entre les deux faces de la membrane plasmique. Le cytosquelette (gris clair) devient plus lâche, alors que les protéines cytosoliques et les molécules d'ARN (bleu clair) sont intégrées aux ectosomes. Le recrutement de la protéine TSG101 (tumeur susceptibility gene 101), membre du complexe ESCRT-I, intervient dans la mobilisation de la membrane plasmique par l'ESCRT-III (sous-unité du saumon), ce qui favorise l'assemblage en spirale. L'ATPase spécifique VPS4 (orange) intervient dans le démontage de la spirale.

Depuis quinze ans, un gros effort a été fourni pour la caractérisation biochimique des exosomes et des vésicules. L'analyse des exosomes issus de différents types cellulaires et de différents liquides biologiques a mis en évidence la présence de nombreuses protéines liées aux voies de sécrétion endosomales, mais aussi dépendante du type cellulaire considéré (Figure 42). La majorité contient des tétraspanines qui vont jouer un rôle important dans leur transfert vers d'autres cellules soit adjacentes soit après avoir transité via un fluide biologique [384]. Le contenu de ces vésicules va agir sur ces cellules réceptrices via les protéines, les microARN et les ARNm transportés [385,386].



**Figure 42: Représentation schématique de la composition typique d'un exosome.**

Sont listées les protéines identifiées dans > 30% des études, celles identifiées dans > 50% sont indiquées avec un astérisque. EEF, eukaryotic translation elongation factor ; ERM, ezrin, radixin and moesin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase-activating protein; HSP, heat shock protein; MFGE8, milk fat globule EGF factor 8 protein; MVB, corps multivésiculaire (multivesicular body); MVP, major vault protein; RAP1B, RAS related protein 1B; Rho GDI, Rho GDP dissociation inhibitor; TSG101, tumeur susceptibility gene 101. Basé sur les données de quinze études protéomiques sur des exosomes isolés de cellules en culture et liquides biologiques [387,388].

Les exosomes et les autres types de vésicules semblent impliqués dans la signalisation intercellulaire mais sont aussi détournées pour transporter des virus, bactéries et facteurs de virulences soit au sein d'un même organisme soit entre organismes différents [389–392].



Bien qu'il puisse y avoir certaines similitudes entre les vénosomes et les exosomes /microvésicules en particulier au niveau de leur fonction, il y a aussi de grandes dissemblances au niveau de leur biogénèse et de leur contenu. A ce jour, bien qu'il n'y ait pas d'étude poussée sur le sujet, il ne semble pas que les vénosomes transportent du matériel génétique provenant de la guêpe (comme dans le cas des PDV), mais on ne sait pas si des ARNm ou des miARN sont présents. Par contre, l'étude récente de Heavner et al., [290] indique que chez *L. heterotoma*, certaines protéines des voies de sécrétions cellulaires sont présentes dans les vénosomes mais sans information quantitative. L'équipe a observé qu'aucune des protéines majeures des vénosomes de *L. bouleardi* et *L. heterotoma* ne sont des protéines des voies de sécrétion (résultats non publiés). Il n'y a pas non plus de tetraspanines qui semble être un marqueur des exosomes. L'absence de protéines virales renforce aussi l'idée que les vénosomes ne proviennent pas d'une machinerie virale, en accord avec le fait qu'aucun ARNm de type viral n'a été trouvé dans les analyses transcriptomiques des glandes à venin de ces espèces. L'existence d'un virus intégré de type PDV pourrait bientôt être définitivement tranché avec l'analyse du génome de *L. bouleardi* qui est en cours d'annotation.

Bien que tout laisse à penser que les vénosomes sont un nouveau type de vésicules, il reste encore beaucoup à faire pour le démontrer catégoriquement. En particulier, une étude plus poussée en microscopie électronique le long du canal connecteur reste indispensable pour mieux comprendre le processus d'assemblage des vésicules ainsi que sa localisation précise, zone particulière (jonction au réservoir) ou zone plus étendue. Cette connaissance permettra d'envisager une étude transcriptomique différentielle sur ce canal (ou la zone particulière) entre les souches ISm et ISy qui produisent des quantités très différentes de vésicules et ce afin de déterminer s'il existe un mécanisme particulier de sécrétion de membrane. Enfin, une analyse protéomique/lipidomique de la membrane des vénosomes permettra aussi de rechercher des marqueurs de la zone de sécrétion de ces membranes et de mieux comprendre son interaction avec les lamellocytes.

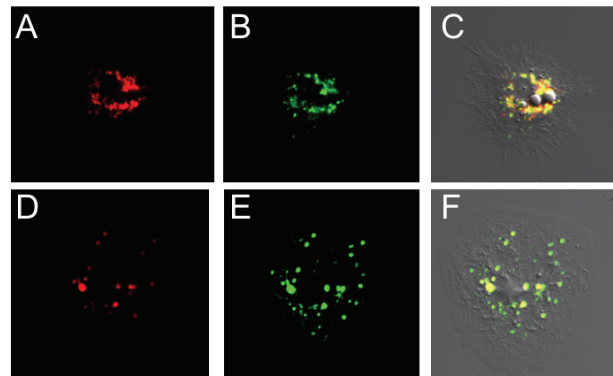
Les différentes approches décrites, comme par exemple la clarification, permettront aussi de déterminer si les vénosomes ne ciblent que les hémocytes circulants et des compartiments sessiles ou également les hémocytes en formation dans la glande lymphatique et s'ils agissent aussi sur d'autres tissus larvaires.

## Endocytoses des vénosomes

Dans les deux premières études, j'ai établi clairement que les vénosomes sont des véhicules de transport qui entrent dans les lamellocytes et y libèrent des facteurs de virulence. La présence et l'accumulation des vénosomes/facteurs de virulence dans ces cellules se traduit par un changement de forme de celles-ci qui les empêcheraient de former la capsule autour de l'œuf. Cette entrée des vénosomes est plus efficace chez les espèces où le parasitisme réussit et chez lesquelles on observe un effet sur la morphologie dans les lamellocytes. Il y a donc une corrélation entre l'entrée/quantité des vénosomes/facteurs de virulence, le changement de forme des lamellocytes et la réussite parasitaire. Il est à noter que même dans les espèces où le parasitisme réussit, tous les lamellocytes ne contiennent pas de LbGAP suggérant soit qu'ils sont dans un état de maturation différent (lamelloblastes, prolamellocytes ?) soit qu'il existe différents types de lamellocytes potentiellement associés à des fonctions distinctes (peut-être efficaces contre d'autres parasites tels que les nématodes [393,394]).

Cette étude qui a été réalisée sur un nombre limité d'espèces hôtes pourrait être étendue à d'autres espèces. Il serait aussi intéressant de la reproduire en utilisant les vénosomes de *L. heterotoma* qui est plus généraliste et montre un fort succès parasitaire chez toutes les espèces testées. J'ai pu au cours de mon travail purifier et marquer de façon fluorescente ses vénosomes et observer qu'après microinjection ils entraient dans les lamellocytes chez *D. melanogaster* (résultats non montrés), mais par manque de temps je n'ai pas pu entreprendre une étude plus complète.

J'ai aussi démontré que l'entrée des vénosomes chez *D. melanogaster* se fait par un mécanisme impliquant une voie Flotilline-radeaux lipidiques dépendante. Je n'ai pas recherché par immunolocalisation la flotilline sur les membranes des lamellocytes des autres espèces testées, mais il est fort probable qu'elle soit présente et qu'une voie d'endocytose flotilline/radeaux lipidiques dépendante existe aussi. Par contre, j'ai au cours d'expériences préliminaires pu observer qu'une partie de l'entrée des vénosomes semble se faire par macropinocytose chez *D. simulans* et *D. yakuba* (Figure 43).



**Figure 43: Colocalisation dextran/vénosomes chez *D. simulans* et *D. yakuba* 18h après injection.**

Images confocales de colocalisation des vénosomes et du dextran. A-C : *D. simulans*. D-F : *D. yakuba*. A-D : vénosomes en rouge ; B-E, dextran en vert ; C-F, colocalisation en jaune.

Il sera donc important d'établir si l'entrée des vénosomes se fait effectivement par un mécanisme différent dans ces espèces afin de pouvoir déterminer si chez *D. melanogaster* l'entrée et l'action des vénosomes est voie-dépendante ou passe par un récepteur différent. Les études avec les vénosomes de *L. heterotoma* seraient également intéressantes pour y répondre. Si les deux types de vénosomes sont endocytés par la même voie Flotilline-dépendante, on peut imaginer des expériences de compétition en marquant les vénosomes des deux espèces de guêpes avec des fluorochromes différents pour identifier si leur entrée pourraient être associée à un même récepteur. Ce type d'expérience bénéficieraient de la mise au point d'un système *in vitro* pour travailler avec les lamellocytes directement sans avoir à passer par la microinjection, par exemple en utilisant des lamellocytes purifiés. Ce système permettrait aussi de tester les différents inhibiteurs de l'endocytose pour confirmer mon travail. Des expériences supplémentaires pourraient aussi être faites sur des lamellocytes mutants flotillines (mutation dans le fond génétique Hop<sup>Tum-1</sup>) ou après inactivation de l'expression du gène flotilline via des ARN interférents.

L'action des facteurs transportés reste encore inconnue. Il n'y a pas de colocalisation claire de LbGAP avec Rac1 mais cela ne prouve pas qu'il n'y ait pas d'interaction *in vivo* car celle-ci n'est que transitoire. Rac2 est aussi une cible mais nous n'avons pas pu tester sa co-immunolocalisation avec LbGAP car nous n'avons pas trouvé d'anticorps disponible. L'utilisation de drosophiles porteuses d'une mutation des RacGTPases stabilisant l'interaction avec les RhoGAPs, dans le site actif des RacGTPase (comme le laboratoire l'a déjà utilisé pour les analyses en double hybride) pourrait permettre de répondre, en exprimant cette protéine au niveau des lamellocytes de façon inductible.

Une autre approche possible serait d'utiliser la technique de ARNi mise au point par le laboratoire chez les guêpes endoparasitoïdes *Leptopilina* [395]. L'extinction d'un ou plusieurs facteurs redondants comme dans le cas des RhoGAPs de *L. boulardi* est en cours dans l'équipe. Pouvoir étudier l'effet de cette extinction à la fois sur le parasitisme, la biogénèse des vénosomes et leur entrée, et enfin leur effet sur les lamellocytes s'annonce très intéressant.

## Protéomique des lamellocytes

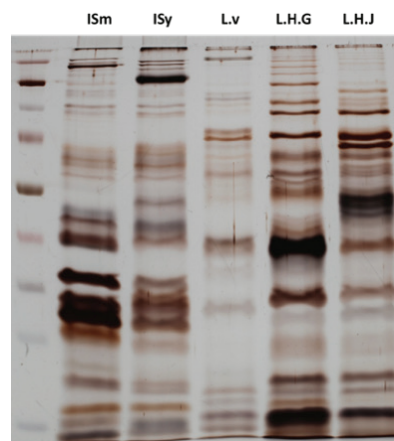
La mise au point d'une technique d'enrichissement des lamellocytes ouvre de nombreuses perspectives. Nous l'avons utilisée pour réaliser une caractérisation protéomique de ces cellules qui vient renforcer et compléter les résultats de transcriptomique existants et les connaissances sur certaines protéines obtenues via l'utilisation de cribles de mutants et les données d'expression de protéines étiquetées de façon fluorescente. Ces résultats en cours d'analyse devraient permettre de développer de nouveaux outils pour ces cellules et de tester le rôle de nouvelles voies de signalisation dans la réponse à l'encapsulation. La protéomique des membranes nous indique déjà un certain nombre de nouveaux composés qui n'avait pas été décrits et pourraient jouer un rôle important. Ils pourront peut-être aussi servir de marqueurs pour mieux comprendre l'origine des lamellocytes qui participent à la capsule (sessiles vs glande lymphatique) ou qui sont ciblés par les vénosomes. La présence de PPO3 en grande quantité mais aussi de PPO2 dans ces cellules confirme leur rôle dans la mélanisation de la capsule [233]. La PPO3 est restreinte au groupe *melanogaster* ce qui suggère que la production de PPO par les lamellocytes est apparue comme un mécanisme de défense récent contre les guêpes parasitoïdes [233]. L'ensemble des protéines reliées aux intégrines et à la formation de jonctions serrées semble aussi très intéressant à analyser. La présence d'un grand nombre de composés impliqués dans l'endocytose est en accord avec les mécanismes observés par immunochimie, et ceux impliqués dans l'exocytose laissent supposer que ces cellules sont sécrétrices. En utilisant les cellules enrichies et des techniques de marquage métabolique, il sera possible d'accéder à la composition de ces sécrétions.

La méthode de purification sera également utilisée pour comparer les lamellocytes de larves témoins et Hop<sup>Tum-1</sup> parasitées afin de déterminer s'il existe des différences au niveau de la phosphorylation des protéines et si elles sont similaires dans un cas de parasitisme par *L. boulardi* et *L. heterotoma*. Cela permettra peut-être de comprendre les mécanismes du changement de forme des lamellocytes et de l'apoptose induite par *L. heterotoma*.

Au niveau du choix de la méthode de purification des protéines de membrane, nous avons pris une approche directe qui a montré son efficacité pour un certain nombre de types cellulaires. Cependant, elle semble avoir des limites, puisqu'en particulier bien que nous ayons retrouvé des protéines à ancre GPI, nous n'avons pas retrouvé les flotillines alors qu'elles sont présentes dans l'analyse globale des cellules par 2D. Cette absence peut s'expliquer par la méthode d'extraction (Beta-octylglucopyranoside) qui n'est peut-être pas capable de solubiliser les radeaux lipidiques contenant la flotilline, chaque domaine raft ayant des propriétés physico-chimiques particulières [396]. D'autres détergeants pourraient être mieux appropriés, comme le Triton X100, couplé à une méthode de flottaison sur gradient qui a déjà largement été utilisée pour purifier les domaines rafts [397]. Je n'ai pas eu le temps durant la fin de ma thèse d'effectuer cette expérience, mais si le récepteur des vénosomes est localisé comme il semblerait dans ces domaines, il faudra les purifier et les analyser pour l'identifier.

## Derniers mots ...

Le travail présenté dans cette thèse, très fondamental, s'intègre dans les recherches menées par l'équipe sur les interactions hôte-parasitoïdes et leur évolution. Il montre le rôle principal que joue le venin dans cette interaction en permettant ou non à une espèce de réussir sur un hôte particulier. Il montre aussi que les différents composants du venin ne sont pas tous équivalents pour cette réussite et que les mécanismes sélectionnés vont certainement dépendre de nombreux facteurs comme l'isolement géographique, la présence des espèces hôtes dans l'environnement et leur densité, la compétition avec d'autres parasitoïdes et d'autres conditions qui nous échappent encore. L'exemple de la différence d'évolution au niveau du venin entre *L. boulandi* ISy et ISm est frappante. La première s'appuie pour sa réussite sur un facteur soluble, la serpine, et semble avoir perdue (ou être en train de perdre) la capacité à fabriquer des vénosomes alors que ISm s'appuie principalement sur les vénosomes pour réussir le parasitisme et ne semble pas avoir besoin de la serpine qu'elle fabrique pourtant en grande quantité. *L. heterotoma* et *L. victoriae* utilisent également les vénosomes comme facteur de réussite parasitaire. Les facteurs de virulence chez ces espèces n'ont pas encore été identifiés mais là, aussi, des différences d'efficacité ont été montrées. Le gel ci-dessous (Figure 44) donne une idée de la variabilité de la composition protéique des vénosomes entre espèces et souches chez quelques Leptopilina et montrent que des différences existent aussi dans l'espèce *L. heterotoma* de façon surprenante.



**Figure 44: Comparaison électrophorétique des venins de quelques *Leptopilina*.**

Les vénosomes purifiés sont séparés par SDS-PAGE et le gel coloré à l'argent. *L. boulandi* ISm, ISy ; L.v, *L. victoriae* ; *L. heterotoma* L.H.G (Gotheron France) et L.H.J (Japon).

A l'avenir, l'utilisation des méthodes mises au point dans ma thèse permettra de mieux comprendre les mécanismes de la spécificité de l'interaction de ces vésicules avec leur(s) cible(s) en fonction des espèces hôtes.

Cette thèse, bien qu'à plus long terme, ouvre aussi sur des aspects appliqués.

Les citoyens s'inquiètent de plus en plus de la qualité et de l'innocuité des aliments qu'ils consomment ainsi que de l'impact des activités humaines sur la dégradation des milieux naturels, la perte de la biodiversité et les changements climatiques. Ces conditions créent une forte demande pour la mise au point de nouvelles stratégies de protection des cultures respectueuses de l'environnement et sans risques pour la santé humaine. Cependant les activités humaines posent aussi un problème comme le transport et l'introduction de ravageurs exotiques - *D. suzukii* en est un bon exemple - qui une fois installés causent d'important dégâts conduisant à l'augmentation de l'usage de pesticides. Parmi les solutions possibles pour remplacer partiellement ou en totalité les pesticides chimiques, la lutte biologique, combinée avec la mise en place de nouvelles pratiques agraires, pourrait devenir une composante des systèmes de production de demain. Elle s'appuie en grande partie sur l'utilisation d'auxiliaires, dont les parasitoïdes. L'emploi des parasitoïdes reste cependant en grande partie limité par notre manque de connaissance de leur diversité, de leur spécificité, de leur mode d'action mais aussi de leur variabilité dans les populations naturelles.

La compréhension de la réussite ou de l'échec du parasitisme a donc une implication importante pour l'utilisation de parasitoïdes en la lutte biologique. On a vu dans ce travail que des souches d'une même espèce peuvent parasiter un hôte avec succès ou non et que cela peut être relié à la composition de leur venin. La caractérisation du venin et la connaissance de ses mécanismes d'action pourrait ainsi devenir un critère important dans l'avenir pour identifier l'espèce ou la souche de parasitoïde la mieux adaptée à un ravageur donné. Cette caractérisation pourra aussi permettre de différencier des souches d'une même espèce en absence de critères morphologiques ou de différences claires de séquence des marqueurs classiques.

Un paramètre important en lutte biologique et qui la distingue favorablement de l'utilisation de composés chimiques est la spécificité d'hôte. Il est ainsi essentiel que les auxiliaires relâchés sur le terrain n'impactent pas les communautés d'insectes présentes en dehors des espèces ciblées mais également qu'ils restent performants sur le ravageur ciblé après leur maintien et leur production en masse en conditions artificielles parfois sur un hôte différent. Ma thèse montre qu'en sus des mécanismes de spécificité comportementaux et de ceux associés à la spécificité entre facteurs de virulence et leur cible, un niveau cellulaire peut entrer en jeu mettant en œuvre une interaction de type vésicule-récepteur. Ce nouveau « verrou » de spécificité viendrait renforcer le lien entre un parasitoïde et ses hôtes comparés au non-hôtes.



Enfin, les venins des parasitoïdes restent aussi une pharmacopée inexploitée qui pourrait devenir une source potentielle de nouveaux bioinsecticides en ciblant des mécanismes physiologiques importants chez les ravageurs et pourquoi pas, de médicaments qui pourraient déboucher sur des utilisations en clinique humaine, par exemple dans le cadre de l'immunité.

## References

---

1. Dobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W. Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105: 11482–11489. doi:10.1073/pnas.0803232105
2. Van Valen L. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*. 1973. pp. 1–30. doi:10.1038/344864a0
3. Eggleton P, Gaston KJ. “Pmasitoid” species and assemblages : convenient deJiniabns or misleading compromises ? *Oikos*. 1990;59: 417–421.
4. Eggleton P, Belshaw R. Insect Parasitoids: An Evolutionary Overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1992;337: 1–20. doi:10.1098/rstb.1992.0079
5. Stireman JO. Community ecology of the “other” parasitoids. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc; 2016;14: 87–93. doi:10.1016/j.cois.2016.02.002
6. Godfray HCJ. *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Chichester: Princeton University Press; 1994.
7. Godfray HCJ, Shimada M. Parasitoids: a model system to answer questions in behavioral, evolutionary and population ecology. *Researches on Population Ecology*. 1999;41: 3–10. doi:10.1007/PL00011980
8. Grissell EE. Hymenopteran biodiversity: some alien notions. *Am Entomol*. 1999;45: 235–244.
9. Peters RS, Krogmann L, Mayer C, Donath A, Gunkel S, Meusemann K, et al. Evolutionary History of the Hymenoptera. *Current Biology*. Elsevier Ltd.; 2017;27: 1013–1018. doi:10.1016/j.cub.2017.01.027
10. Quicke D. *The Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology*. 2015. doi:10.1002/9781118907085
11. Godfray HCJ. Four decades of parasitoid science. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2016;159: 135–146. doi:10.1111/eea.12413
12. Quicke DLJ. *Parasitic wasps*. London: Chapman & Hall Ltd; 1997.
13. Lemaitre B, Hoffmann J. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. 2007;25: 697–743. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615
14. Hoffmann JA, Reichhart J-M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*. 2002;3: 121–126. doi:10.1038/ni0202-121
15. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: A model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 2002;5: 102–110. doi:10.1016/S1369-5274(02)00294-1
16. Wang L, Kounatidis I, Ligoxygakis P. *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014;3. doi:10.3389/fcimb.2013.00113
17. Arefin B, Kunc M, Krautz R, Theopold U. The Immune Phenotype of Three *Drosophila* Leukemia Models. *Genes Genomes Genetics*. 2017; 2139–2149. doi:10.1534/g3.117.039487
18. Michel P, Solignac M. Molecular Phylogeny of *Drosophila* Based on Ribosomal RNA Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 1993; 525–543.
19. Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, et al. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*. 2007;450: 203–218. doi:10.1038/nature06341
20. Van Der Linde K, Houle D, Spicer GS, Stepan SJ. A supermatrix-based molecular phylogeny of the family Drosophilidae. *Genetics Research*. 2010;92: 25. doi:10.1017/S001667231000008X
21. Markow TA, O’Grady PM. *Drosophila : a guide to species identification and use* [Internet]. Academic Press; 2005. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124730526>
22. Carson HL. *The ecology of Drosophila breeding sites* [Internet]. University of Hawaii Foundation Lyon Arboretum Fund; 1971. Available: <https://books.google.fr/books?id=5YwoAQAAMAAJ>
23. Okada T. Bleeding Sap Preference of the *Drosophilid* Flies. *Japanese journal of applied entomology and zoology*. 1962;6: 216–229. doi:10.1303/jjaez.6.216
24. Markow TA. The secret lives of *Drosophila* flies. *eLife*. 2015;4: 1–9. doi:10.7554/eLife.06793
25. Atallah J, Teixeira L, Salazar R, Zaragoza G, Kopp A. The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;281: 20132840–20132840. doi:10.1098/rspb.2013.2840

26. Asplen MK, Anfora G, Biondi A, Choi DS, Chu D, Daane KM, et al. Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science*. 2015;88: 469–494. doi:10.1007/s10340-015-0681-z
27. Lachaise D, Cariou M-L, David JR, Lemeunier F, Tsacas L, Ashburner M. Historical Biogeography of the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. *Evolutionary Biology*. Boston, MA: Springer US; 1988. pp. 159–225. doi:10.1007/978-1-4613-0931-4\_4
28. David JR, Capy P. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends in Genetics*. 1988;4: 106–111. doi:10.1016/0168-9525(88)90098-4
29. Roberts DB. *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Applicata*. 2006;121: 93–103. doi:10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x
30. Jennings BH. *Drosophila*-a versatile model in biology & medicine. *Materials Today*. Elsevier Ltd; 2011;14: 190–195. doi:10.1016/S1369-7021(11)70113-4
31. Keebaugh ES, Schlenke TA. Insights from natural host-parasite interactions: The *Drosophila* model. *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd; 2014;42: 111–123. doi:10.1016/j.dci.2013.06.001
32. Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti F. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 2011;7: S1. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S1
33. Eberl G. Immunity by equilibrium. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2016;16: 524–532. doi:10.1038/nri.2016.75
34. Buchmann K. Evolution of innate immunity: Clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*. 2014;5: 1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00459
35. Manuscript A. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev*. 2013;249: 158–175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.PAMPs
36. Rizki MT, Rizki RM. Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1959;5: 235–240. doi:10.1083/jcb.5.2.235
37. Rizki TM. The circulatory system and associated cells and tissues. *The Genetics and Biology of Drosophila*. 1978. pp. 397–452.
38. Brehelin M, Zachary D, Hoffmann JA. A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell and Tissue Research*. 1978;195: 45–57. doi:10.1007/BF00233676
39. Brehelin M. Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell Tissue Res*. 1982;221: 607–615.
40. Fauvarque M-O, Williams MJ. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *Journal of cell science*. 2011;124: 1373–1382. doi:10.1242/jcs.064592
41. Gandhe AS, John SH, Nagaraju J. Nodular, A Novel Immune Up-Regulated Protein Mediates Nodulation Response in Insects. *The Journal of Immunology*. 2007;179: 6943–6951. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6943
42. Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6: 302–313. doi:10.1038/nrmicro1870
43. Im D, Na K, Vv G, Na R. Encapsulation and nodulation in insects. *Isj*. 2016;13: 229–246.
44. Rizki TM. Hemocyte Encapsulation of Streptococci in *Drosophila*. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*. 1968;12: 339–343.
45. Carton Y, Poirie M, Nappi AJ. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*. 2008;15: 67–87. doi:10.1111/j.1744-7917.2008.00188.x
46. Anderl I, Vesala L, Ihalainen TO, Vanha-aho LM, Ando I, Ramet M, et al. Transdifferentiation and Proliferation in Two Distinct Hemocyte Lineages in *Drosophila melanogaster* Larvae after Wasp Infection. *PLoS Pathogens*. 2016;12: 1–34. doi:10.1371/journal.ppat.1005746
47. Lebestky T, Jung S, Banerjee U. A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes & Development*. 2003;17: 348–353. doi:10.1101/gad.1052803.348
48. Ribeiro C, Brehelin M. Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*. 2006;52: 417–429. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.01.005
49. Nappi AJ. Defense reactions of *Drosophila euronotus* larvae against the hymenopterous parasite *Pseudeucoila bochei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1970;16: 408–418. doi:10.1016/0022-2011(70)90160-6

50. De Roode JC, Lefevre T. Behavioral immunity in insects. *Insects*. 2012;3: 789–820. doi:10.3390/insects3030789
51. Gross P. Insect Behavioral and Morphological Defenses Against Parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 1993;38: 251–274. doi:10.1146/annurev.ento.38.1.251
52. Hwang RY, Zhong L, Xu Y, Johnson T, Zhang F, Deisseroth K, et al. Nociceptive Neurons Protect *Drosophila* Larvae from Parasitoid Wasps. *Current Biology*. 2007;17: 2105–2116. doi:10.1016/j.cub.2007.11.029
53. Milan NF, Kacsoh BZ, Schlenke TA. Alcohol consumption as self-medication against blood-borne parasites in the fruit fly. *Current Biology*. Elsevier Ltd; 2012;22: 488–493. doi:10.1016/j.cub.2012.01.045
54. Lynch ZR, Schlenke TA, Morran LT, de Roode JC. Ethanol confers differential protection against generalist and Specialist parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 2017;12: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0180182
55. Kacsoh BZ, Lynch ZR, Mortimer NT, Schlenke TA. Fruit Flies Medicate Offspring After Seeing Parasites. *Science*. 2013;339: 947–950. doi:10.1126/science.1229625
56. Bouletreau-Merle J, David JR. Sexually Dimorphic Response to Host Habitat Toxicity in *Drosophila* Parasitic Wasps. *Evolution*. 1981;35: 395–399.
57. Lynch ZR, Schlenke TA, de Roode JC. Evolution of behavioural and cellular defences against parasitoid wasps in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Evolutionary Biology*. 2016;29: 1016–1029. doi:10.1111/jeb.12842
58. Lefevre T, de Roode JC, Kacsoh BZ, Schlenke TA. Defence strategies against a parasitoid wasp in *Drosophila*: fight or flight? *Biology Letters*. 2012;8: 230–233. doi:10.1098/rsbl.2011.0725
59. Ebrahim SAM, Dweck HKM, Stokl J, Hofferberth JE, Trona F, Weniger K, et al. *Drosophila* Avoids Parasitoids by Sensing Their Semiochemicals via a Dedicated Olfactory Circuit. *PLoS Biology*. 2015;13: 1–18. doi:10.1371/journal.pbio.1002318
60. Janssen A, Driessen G, De Haan M, Roodbol N. The Impact of Parasitoids On Natural Populations of Temperate Woodland *Drosophila*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1988;38: 61–73. doi:10.1163/156854288X00049
61. Rouault J. Role des parasites entomophages dans la competition entre especes jumelles de *Drosophiles*: approche experimentale. *C R Acad Sc Paris*. 1979;289: 1–4.
62. Carton Y, Bouletreau M, van Alphen JJM, van Lenteren JC. The *Drosophila* Parasitic Wasps. *The Genetics and Biology of Drosophila*. 1986. pp. 347–394.
63. Mitsui H, Van Achterberg K, Nordlander G, Kimura MT. Geographical distributions and host associations of larval parasitoids of frugivorous *Drosophilidae* in Japan. *Journal of Natural History*. 2007;41: 1731–1738. doi:10.1080/00222930701504797
64. Le Lann C, Visser B, Meriaux M, Moiroux J, van Baaren J, van Alphen JJM, et al. Rising temperature reduces divergence in resource use strategies in coexisting parasitoid species. *Oecologia*. 2014;174: 967–977. doi:10.1007/s00442-013-2810-9
65. Kaiser L, Bartheye C, Kerguelen V, Pham-Delegue MH. Odour conditioning of ovipositor probing in a parasitic wasp. *Ethology Ecology and Evolution*. 1995;7: 245–255. doi:10.1080/08927014.1995.9522954
66. Lof ME, de Gee M, Dicke M, Gort G, Hemerik L. Exploitation of Chemical Signaling by Parasitoids: Impact on Host Population Dynamics. *Journal of Chemical Ecology*. 2013;39: 752–763. doi:10.1007/s10886-013-0298-8
67. Weiss I, Rossler T, Hofferberth J, Brummer M, Ruther J, Stokl J. A nonspecific defensive compound evolves into a competition avoidance cue and a female sex pheromone. *Nature Communications*. 2013;4. doi:10.1038/ncomms3767
68. Ne Goubault M, Krespi L, Boivin G, Poinot D, Nenon J-P, Cortesero AM. Intraspecific Variations in Host Discrimination Behavior in the Pupal Parasitoid *Pachycrepoideus vindemmiae* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae). *Environ Entomol*. 2004;33: 362–369. doi:10.1603/0046-225X-33.2.362
69. Romani R, Isidoro N, Bin F, Vinson SB. Host recognition in the pupal parasitoid *Trichopria drosophilae*: A morpho-functional approach. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2002;105: 119–128. doi:10.1023/A:1022165430122
70. Chen W, He Z, Ji XL, Tang ST, Hu HY. Hyperparasitism in a generalist ectoparasitic pupal parasitoid, *Pachycrepoideus vindemmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), on its own conspecifics: When the lack of resource lead to cannibalism. *PLoS ONE*. 2015;10: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0124305

71. Fleury F, Gibert P, Ris N, Allemand R. Ecology and Life History Evolution of Frugivorous *Drosophila* Parasitoids. *Advances in Parasitology*. 2009;70: 3–44. doi:10.1016/S0065-308X(09)70001-6
72. Carton Y, Kitano H. Changes in the hemocyte population of *Drosophila* [melanogaster] larvae after single and multiple parasitization by *Cothonaspis* (parasitic Cynipidae). *Journal of Invertebrate Pathology (USA)*. 1979.
73. Streams FA. Defense Reactions of *Drosophila* Species (Diptera: Drosophilidae) to the Parasite *Pseudeucoila bochei* (Hymenoptera: Cynipidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 1968;61: 158–164. Available: <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/61.1.158>
74. Streams FA. The relationship between *Drosophila melanogaster* and its parasite *Pseudeucoila bochei* Weld [Internet]. The Congress; 1963. Available: <https://books.google.fr/books?id=bwQ0MQAACAAJ>
75. Schlegel-Oprecht E. Versuche Zur Auslösung Von Mutationen Bei Der Zoophagen Cynipide *Pseudeucoila Bochei* Weld Und Befunde Über Die Stammspezifische Abwehrreaktion Des Wirtes *Drosophila Melanogaster*. *Zeitschrift für Induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*. 1953;85: 245–281. doi:10.1007/BF00309839
76. Meig Z. Beiträh Zur Morphologie Und Biologie Der Cynipide *Pseudeucolia Bochei* Weld, Eines Larvenparasiten Von *Drosophila Melanogaster*. *Acta Zoologica*. 1951;
77. Boche RD. Studies on hymenopteran parasitism of *drosophila*. 1938.
78. Nordlander G. Revision of the genus *Leptopilina* Forster, 1869, with notes on the status of some other genera (Hymenoptera, Cynipoidea: Eucoilidae). *Entomologica Scandinavica*. 1980;11: 428–453. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
79. Allemand R, Lemaitre C, Frey F, Bouletreau M, Vavre F, Nordlander G, et al. Phylogeny of six African *Leptopilina* species. *Ann Soc Entomol*. 2002;38: 319–332.
80. Fellowes MDE, Godfray HCJ. The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity*. 2000;84: 1–8. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00685.x
81. Orr HA, Irving S. The genetics of adaptation: the genetic basis of resistance to wasp parasitism in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*. 1997;51: 1877–1885. doi:10.2307/2411009
82. Dubuffet A, Dupas S, Frey F, Drezen J-M, Poirie M, Carton Y. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. *Heredity*. 2007;98: 21–27. doi:10.1038/sj.hdy.6800893
83. Dupas S, Poirie M, Frey F, Carton Y. Is parasitoid virulence against multiple hosts adaptive or constrained by phylogeny? A study of *Leptopilina* spp. (Hymenoptera: Figitidae)/*Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) interactions. *Annales de la Societe Entomologique de France*. 2013;49: 222–231. doi:10.1080/00379271.2013.815045
84. Dupas S, Carton Y. Two non-linked genes for specific virulence of *Leptopilina boulardi* against *Drosophila melanogaster* and *D. yakuba*. *Evolutionary Ecology*. 1999;13: 211–220. doi:10.1023/A:1006691431658
85. Rizki TM, Rizki RM, Carton Y. *Leptopilina heterotoma* and *L. boulardi*: Strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Parasitology*. 1990;70: 466–475. doi:10.1016/0014-4894(90)90131-U
86. Nappi AJ. Cellular immunity and pathogen strategies in combative interactions involving *Drosophila* hosts and their endoparasitic wasps. *Invertebrate Survival Journal*. 2010;7: 198–210.
87. Poirie M, Carton Y, Dubuffet A. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *Comptes Rendus - Biologies*. Elsevier Masson SAS; 2009;332: 311–320. doi:10.1016/j.crv.2008.09.004
88. Rizki RM, Rizki TM. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81: 6154–6158. doi:10.1073/pnas.81.19.6154
89. Prevost G, Eslin P, Doury G, Moreau SJM, Guillot S. Asobara, braconid parasitoids of *Drosophila* larvae: Unusual strategies to avoid encapsulation without VLPs. *Journal of Insect Physiology*. 2005;51: 171–179. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.10.002
90. Eslin P, Giordanengo P, Fourdrain Y, Prevost G. Avoidance of encapsulation in the absence of VLP by a braconid parasitoid of *Drosophila* larvae: An ultrastructural study. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*. 1996;74: 2193–2198. doi:10.1139/z96-248
91. Rizki RM, Rizki TM. Effects of lammellolysin from a parasitoid wasp on *Drosophila* blood cells in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 1991;257: 236–244.



92. Chiu H, Govind S. Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. *Cell death and differentiation*. 2002;9: 1379–1381. doi:10.1038/sj.cdd.4401134
93. Dubuffet A, Colinet D, Anselme C, Dupas S, Carton Y, Poirie M. Variation of *Leptopilina boulardi* Success in *Drosophila* Hosts. What is Inside the Black Box? *Advances in Parasitology*. 2009;70: 147–188. doi:10.1016/S0065-308X(09)70006-5
94. Gatti JL, Schmitz A, Colinet D, Poirie M. Diversity of Virus-Like Particles in Parasitoids' Venom: Viral or Cellular Origin? *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. 2012; 181–192. doi:10.1016/B978-0-12-384858-1.00015-1
95. Strand MR, Burke GR. Polydnviruses: Nature's Genetic Engineers. *Annu Rev Virol*. 2014;1: 333–54. doi:10.1146/annurev-virology-031413-085451
96. Strand MR, Burke GR. Polydnviruses: From discovery to current insights. *Virology*. 2015. pp. 393–402. doi:10.1016/j.virol.2015.01.018
97. Gauthier J, Drezen J, Herniou EA. The recurrent domestication of viruses: major evolutionary transitions in parasitic wasps. *Parasitology*. 2017; 1–13. doi:10.1017/S0031182017000725
98. Pichon A, Bezier A, Urbach S, Aury J-M, Jouan V, Ravallec M, et al. Recurrent DNA virus domestication leading to different parasite virulence strategies. *Science advances*. 2015;1: e1501150. doi:10.1126/sciadv.1501150
99. Poirie M, Colinet D, Gatti JL. Insights into function and evolution of parasitoid wasp venoms. *Current Opinion in Insect Science*. 2014;6: 52–60. doi:10.1016/j.cois.2014.10.004
100. Colinet D, Deleury E, Anselme C, Cazes D, Poulain J, Azema-Dossat C, et al. Extensive inter- and intraspecific venom variation in closely related parasites targeting the same host: The case of *Leptopilina* parasitoids of *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd; 2013;43: 601–611. doi:10.1016/j.ibmb.2013.03.010
101. Goecks J, Mortimer NT, Mobley J a., Bowersock GJ, Taylor J, Schlenke T a. Integrative Approach Reveals Composition of Endoparasitoid Wasp Venoms. *PLoS ONE*. 2013;8: 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0064125
102. Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen JM, Poirie M. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Developmental and Comparative Immunology*. 2009;33: 681–689. doi:10.1016/j.dci.2008.11.013
103. Dubuffet A, Doury G, Labrousse C, Drezen JM, Carton Y, Poirie M. Variation of success of *Leptopilina boulardi* in *Drosophila yakuba*: The mechanisms explored. *Developmental and Comparative Immunology*. 2008;32: 597–602. doi:10.1016/j.dci.2007.10.009
104. Rizki RM, Rizki TM. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87: 8388–8392. doi:10.1073/pnas.87.21.8388
105. Rizki TM, Rizki RM. Parasitoid-Induced Cellular Immune Deficiency in *Drosophila*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;712: 178–194. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb33572.x
106. Labrousse C, Carton Y, Dubuffet a., Drezen JM, Poirie M. Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*. 2003;49: 513–522. doi:10.1016/S0022-1910(03)00054-4
107. Colinet D, Schmitz A, Cazes D, Gatti JL, Poirie M. The origin of intraspecific variation of virulence in an eukaryotic immune suppressive parasite. *PLoS Pathogens*. 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1001206
108. Chiu H, Morales J, Govind S. Identification and immuno-electron microscopy localization of p40, a protein component of immunosuppressive virus-like particles from *Leptopilina heterotoma*, a virulent parasitoid wasp of *Drosophila*. *Journal of General Virology*. 2006;87: 461–470. doi:10.1099/vir.0.81474-0
109. Labrousse C, Stasiak K, Lesobre J, Grangeia A, Huguet E, Drezen JM, et al. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;35: 93–103. doi:10.1016/j.ibmb.2004.10.004
110. Colinet D, Schmitz A, Depoix D, Crochard D, Poirie M. Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. *PLoS Pathogens*. 2007;3: 2029–2037. doi:10.1371/journal.ppat.0030203
111. Williams MJ, Ando I, Hultmark D. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes to Cells*. 2005;10: 813–823. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00883.x
112. Williams MJ. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *Journal of Cell Science*. 2006;119: 2015–2024. doi:10.1242/jcs.02920

113. Xavier MJ, Williams MJ. The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in *Drosophila* immunosurveillance cells. *PLoS ONE*. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0019504
114. Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. Extracellular vesicles as emerging intercellular communicasomes. *BMB Reports*. 2014;47: 531–539. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.10.164
115. Ricci V, Giannouli M, Romano M, Zarrilli R. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and its pathogenic role. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20: 630–638. doi:10.3748/wjg.v20.i3.630
116. Szempruch AJ, Dennison L, Kieft R, Harrington JM, Hajduk SL. Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2016;14: 669–675. doi:10.1038/nrmicro.2016.110
117. Kopelman AH, Chabora PC. Aspects of the reproductive biology of *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Eucoilidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 1986;79: 808–813.
118. Carton Y, Capy P, Nappi AJ. Genetic variability of host-parasite relationship traits: utilization of isofemale lines in a *Drosophila simulans* parasitic wasp. *Genetics Selection Evolution*. 1989;21: 437–446. doi:10.1186/1297-9686-21-4-437
119. Carton Y, Rouault J KH. Susceptibility of the seven sibling species of subgroup melanogaster infected with a cynipide parasite. *Drosophila Inf Serv*. 1981;364.
120. Carton Y, Kitano H. Evolutionary relationships to parasitism by seven species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1981;16: 227–241. doi:10.1111/j.1095-8312.1981.tb01849.x
121. Dupas S, Boscaro M. Geographic variation and evolution of immunosuppressive genes in a *Drosophila* parasitoid. *Ecography*. 1999;22: 284–291. doi:10.1111/j.1600-0587.1999.tb00504.x
122. Dupas S, Carton Y, Poirie M. Genetic dimension of the coevolution of virulence–resistance in *Drosophila* – parasitoid wasp relationships. *Heredity*. 2003;90: 84–89. doi:10.1038/sj.hdy.6800182
123. Dupas S, Frey F, Carton Y. A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *Journal of Heredity*. 1998;89: 306–311. doi:10.1093/jhered/89.4.306
124. Bouletreau M, Fouillet P. “Variabilité génétique intrapopulation de l’aptitude de *Drosophila melanogaster* à permettre le développement d’un hyménoptère parasite.” *CR Acad Sci*. 1982;295: 775–778.
125. Carton Y, Frey F. Analyse expérimentale de trois niveaux d’interactions entre *Drosophila melanogaster* et le parasite *Leptopilina boulardi* (sympatrie, allopatrie, xénopatrie). *Genet Sel Evol*. 1984;16: 417–430.
126. Carton Y, Bouletreau M. Encapsulation ability of *Drosophila melanogaster*: A genetic analysis. *Developmental and Comparative Immunology*. 1985;9: 211–219. doi:10.1016/0145-305X(85)90112-0
127. Vass E, Nappi A. Fruit Fly Immunity. *Bioscience*. 2001;51: 529–536.
128. Teresa Hita M, Poirié M, Leblanc N, Lemeunier F, Lutcher F, Frey F, et al. Genetic Localization of a *Drosophila melanogaster* Resistance Gene to a Parasitoid Wasp and Physical Mapping of the Region. *Genome research*. 1999.
129. Poirie M, Frey F, Hita M, Huguet E, Lemeunier F, Periquet G, et al. *Drosophila* resistance genes to parasitoids: chromosomal location and linkage analysis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 2000;267: 1417–1421. doi:10.1098/rspb.2000.1158
130. Hita M, Espagne E, Lemeunier F, Pascual L, Carton Y, Periquet G, et al. Mapping candidate genes for *Drosophila melanogaster* resistance to the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. *Genetical research*. 2006;88: 81–91. doi:10.1017/S001667230600841X
131. Yamada T, Okabe M, Hiromi Y. EDL/MAE regulates EGF-mediated induction by antagonizing Ets transcription factor Pointed. *Development*. 2003;130: 4085–4096. doi:10.1242/dev.00624
132. Vet LEM, Alphen JJM Van. A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. 1. A qualitative study on Eucoilinae and Alysiinae. *Oikos*. 1985;44: 478–486. doi:10.2307/3565789
133. Robertson JL, Tsubouchi A, Tracey WD. Larval Defense against Attack from Parasitoid Wasps Requires Nociceptive Neurons. *PLoS ONE*. 2013;8: 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0078704
134. Moreau SJM, Asgari S. Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions. *Toxins*. 2015;7: 2385–2412. doi:10.3390/toxins7072385
135. Robertson JL. *Leptopilina* Parasitoid Wasps, Ion Channels, and Dendritic Morphology in *Drosophila* Nociception Paradigms. Duke University. 2013.
136. Tokusumi Y, Tokusumi T, Schulz RA. The nociception genes *painless* and *Piezo* are required for the cellular immune response of *Drosophila* larvae to wasp parasitization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd; 2017;486: 893–897. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.116



137. Capilla A, Karachentsev D, Patterson RA, Hermann A, Juarez MT, McGinnis W. Toll pathway is required for wound-induced expression of barrier repair genes in the *Drosophila* epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114: E2682–E2688. doi:10.1073/pnas.1613917114
138. Abreu-Blanco MT, Verboon JM, Parkhurst SM. Cell wound repair in *Drosophila* occurs through three distinct phases of membrane and cytoskeletal remodeling. *Journal of Cell Biology*. 2011;193: 455–464. doi:10.1083/jcb.201011018
139. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *Journal of Cell Science*. 2009;122: 3209–3213. doi:10.1242/jcs.031187
140. Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release. *Current Biology*. Elsevier Ltd; 2013;23: 424–429. doi:10.1016/j.cub.2013.01.058
141. Verboon JM, Parkhurst SM. Rho family GTPase functions in *Drosophila* epithelial wound repair. *Small GTPases*. 2015;6: 28–35. doi:10.4161/21541248.2014.982415
142. Krautz R, Arefin B, Theopold U. Damage signals in the insect immune response. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5. doi:10.3389/fpls.2014.00342
143. Galko MJ, Krasnow MA. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biology*. 2004;2. doi:10.1371/journal.pbio.0020239
144. Wood W, Martin P. Macrophage Functions in Tissue Patterning and Disease: New Insights from the Fly. *Developmental Cell*. Elsevier Inc.; 2017;40: 221–233. doi:10.1016/j.devcel.2017.01.001
145. Scherfer C, Karlsson C, Loseva O, Bidla G, Goto A. Isolation and Characterization of Hemolymph Clotting Factors in *Drosophila melanogaster* by a Pullout Method Christoph. *Current Biology*. 2004;14: 25–29.
146. Dushay MS. Insect hemolymph clotting. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66: 2643–2650. doi:10.1007/s00018-009-0036-0
147. Loof TG, Schmidt O, Herwald H, Theopold U. Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: The same side of two coins? *Journal of Innate Immunity*. 2011;3: 34–40. doi:10.1159/000321641
148. Patterson RA, Juarez MT, Hermann A, Sasik R, Hardiman G, McGinnis W. Serine Proteolytic Pathway Activation Reveals an Expanded Ensemble of Wound Response Genes in *Drosophila*. *PLoS ONE*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0061773
149. Wang Z, Wilhelmsson C, Hyrsl P, Loof TG, Dobes P, Klupp M, et al. Pathogen entrapment by transglutaminase - A conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathogens*. 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1000763
150. Karlsson C, Korayem AM, Scherfer C, Loseva O, Dushay MS, Theopold U. Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279: 52033–52041. doi:10.1074/jbc.M408220200
151. Goto A, Kadowaki T, Kitagawa Y. *Drosophila* hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects 1. 2003;264: 582–591. doi:10.1016/j.ydbio.2003.06.001
152. Binggeli O, Neyen C, Poidevin M, Lemaitre B. Prophenoloxidase Activation Is Required for Survival to Microbial Infections in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*. 2014;10. doi:10.1371/journal.ppat.1004067
153. Márkus R, Kurucz É, Rus F, Andó I. Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters*. 2005;101: 108–111. doi:10.1016/j.imlet.2005.03.021
154. Ruschioni S, Van Loon JJA, Smid HM, Van Lenteren JC. Insects can count: Sensory basis of host discrimination in parasitoid wasps revealed. *PLoS ONE*. 2015;10: 3–7. doi:10.1371/journal.pone.0138045
155. Bakker K, Visser ME, Peulet P. The Ability To Distinguish Between Hosts Containing Different Numbers of Parasitoid Eggs By the Solitary Parasitoid *Leptopilina Heterotoma* (Thomson) (Hym., Cynip.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1990;40: 514–520. doi:10.1163/156854290X00064
156. Ahmed T, Zhang TT, He KL, Bai SX, Wang ZY. Sense organs on the ovipositor of *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae): Cheir probable role in stinging, oviposition and host selection process. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. The Authors; 2013;16: 343–348. doi:10.1016/j.aspen.2013.04.015
157. Buffington ML. The occurrence and phylogenetic implications of the ovipositor clip within the Figitidae (Insecta: Hymenoptera: Cynipoidea). *Journal of Natural History*. 2007;41: 2267–2282. doi:10.1080/00222930701579732

158. De la Filia AG, Bain SA, Ross L. Haplodiploidy and the reproductive ecology of Arthropods. *Current Opinion in Insect Science*. 2015;9: 36–43. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.018>
159. Mabilia-Moundoungou ADN, Doury G, Eslin P, Cherqui A, Prévost G. Deadly venom of *Asobara japonica* parasitoid needs ovarian antidote to regulate host physiology. *Journal of Insect Physiology*. 2010;56: 35–41. doi:[10.1016/j.jinsphys.2009.09.001](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.09.001)
160. Nakhleh J, El Moussawi L, Osta MA. The Melanization Response in Insect Immunity [Internet]. 1st ed. *Advances in Insect Physiology*. Elsevier Ltd.; 2017. doi:[10.1016/bs.aiip.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.11.002)
161. Jiang H, Vilcinskas A, Kanost M. Immunity in Lepidopteran Insects. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010. doi:[10.1007/978-1-4419-8059-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10)
162. Grigorian M, Hartenstein V. Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Development Genes and Evolution*. 2013;223: 103–115. doi:[10.1007/s00427-012-0428-2](https://doi.org/10.1007/s00427-012-0428-2)
163. Price CD, Ratcliffe NA. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1974;147: 537–549. doi:[10.1007/BF00307254](https://doi.org/10.1007/BF00307254)
164. Perez DG, Fontanetti CS. Hemocytical responses to environmental stress in invertebrates: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2011;177: 437–447. doi:[10.1007/s10661-010-1645-7](https://doi.org/10.1007/s10661-010-1645-7)
165. Strand MR. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. *Insect Immunology*. 2008;32: 25–47.
166. Choma MA, Suter MJ, Vakoc BJ, Bouma BE, Tearney GJ. Physiological homology between *Drosophila melanogaster* and vertebrate cardiovascular systems. *Disease Models & Mechanisms*. 2011;4: 411–420. doi:[10.1242/dmm.005231](https://doi.org/10.1242/dmm.005231)
167. Ghosh S, Singh A, Mandal S, Mandal L. Active Hematopoietic Hubs in *Drosophila* Adults Generate Hemocytes and Contribute to Immune Response. *Developmental Cell*. The Authors; 2015;33: 478–488. doi:[10.1016/j.devcel.2015.03.014](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.014)
168. Ramond E, Meister M, Lemaitre B. From Embryo to Adult: Hematopoiesis along the *Drosophila* Life Cycle. *Developmental Cell*. Elsevier Inc.; 2015;33: 367–368. doi:[10.1016/j.devcel.2015.05.002](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.05.002)
169. Leitão AB, Sucena É. *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *eLife*. 2015;2015: 1–38. doi:[10.7554/eLife.06166](https://doi.org/10.7554/eLife.06166)
170. Evans CJ, Liu T, Banerjee U. *Drosophila* hematopoiesis: Markers and methods for molecular genetic analysis. *Methods*. Elsevier Inc.; 2014;68: 242–251. doi:[10.1016/j.ymeth.2014.02.038](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.038)
171. Morin-Poulard I, Vincent A, Crozatier M. The *Drosophila* JAK-STAT pathway in blood cell formation and immunity. *Jak-Stat*. 2013;2: e25700. doi:[10.4161/jkst.25700](https://doi.org/10.4161/jkst.25700)
172. Makhijani K, Brückner K. Of blood cells and the nervous system: hematopoiesis in the *Drosophila* larva. *Fly*. 2012;6: 254–260. doi:[10.4161/fly.22267](https://doi.org/10.4161/fly.22267)
173. Crozatier M, Vincent A. *Drosophila*: a model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. *Disease Models & Mechanisms*. 2011;4: 439–445. doi:[10.1242/dmm.007351](https://doi.org/10.1242/dmm.007351)
174. Krzemien J, Crozatier M, Vincent A. Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *International Journal of Developmental Biology*. 2010;54: 1117–1125. doi:[10.1387/ijdb.093053jk](https://doi.org/10.1387/ijdb.093053jk)
175. Gold KS, Brückner K. *Drosophila* as a model for the two myeloid blood cell systems in vertebrates. *Experimental Hematology*. 2014;42: 717–727. doi:[10.1016/j.exphem.2014.06.002](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.06.002)
176. Wood W, Jacinto A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8: 542–551. doi:[10.1038/nrm2202](https://doi.org/10.1038/nrm2202)
177. Holz A. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development*. 2003;130: 4955–4962. doi:[10.1242/dev.00702](https://doi.org/10.1242/dev.00702)
178. Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development*. 1994;120: 1829–1837. doi:[10.1093/dev.120.11.1829](https://doi.org/10.1093/dev.120.11.1829)
179. Spahn P, Huelsmann S, Rehorn KP, Mischke S, Mayer M, Casali A, et al. Multiple regulatory safeguards confine the expression of the GATA factor *serpent* to the hemocyte primordium within the *drosophila* mesoderm. *Developmental Biology*. Elsevier; 2014;386: 272–279. doi:[10.1016/j.ydbio.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.12.012)
180. Waltzer L, Ferjoux G, Bataillé L, Haenlin M. Cooperation between the GATA and RUNX factors *Serpent* and *Lozenge* during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO Journal*. 2003;22: 6516–6525. doi:[10.1093/emboj/cdg622](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg622)
181. Williams MJ. *Drosophila* Hemopoiesis and Cellular Immunity. *The Journal of Immunology*. 2007;178: 4711–4716. doi:[10.4049/jimmunol.178.8.4711](https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4711)

182. Krzemień J, Dubois L, Makki R, Meister M, Vincent A, Crozatier M. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature*. 2007;446: 325–328. doi:10.1038/nature05650
183. Munier AI, Doucet D, Perrodou E, Zachary D, Meister M, Hoffmann JA, et al. PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Reports*. 2002;3: 1195–1200. doi:10.1093/embo-reports/kvf242
184. Lazzaro BP. Adenosine Signaling and the Energetic Costs of Induced Immunity. *PLoS Biology*. 2015;13: 1–6. doi:10.1371/journal.pbio.1002136
185. Krzemien J, Oyallon J, Crozatier M, Vincent A. Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Developmental Biology*. Elsevier Inc.; 2010;346: 310–319. doi:10.1016/j.ydbio.2010.08.003
186. Benmimoun B, Polesello C, Waltzer L, Haenlin M. Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development*. 2012;139: 1713–1717. doi:10.1242/dev.080259
187. Luo H, Hanratty WP, Dearolf CR. An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-1 Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *The EMBO journal*. 1995;14: 1412–20. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=398227&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
188. Gateff E. Tumor-Suppressor Genes, Hematopoietic Malignancies and Other Hematopoietic Disorders of *Drosophila melanogaster*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;712: 260–279. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb33578.x
189. Hanratty WP, Dearolf CR. The *Drosophila* Tumorous lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *MGG Molecular & General Genetics*. 1993;238: 33–37. doi:10.1007/BF00279527
190. Hao Y, Jin LH. Dual role for Jumu in the control of hematopoietic progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *eLife*. 2017;6: 1–27. doi:10.7554/eLife.25094
191. Reimels TA, Pflieger CM. *Drosophila* Rabex-5 restricts Notch activity in hematopoietic cells and maintains hematopoietic homeostasis. *Journal of Cell Science*. 2015;128: 4512–4525. doi:10.1242/jcs.174433
192. Schmid MR, Anderl I, Vesala L, Vanha-aho LM, Deng XJ, Rämets M, et al. Control of *Drosophila* blood cell activation via toll signaling in the fat body. *PLoS ONE*. 2014;9: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0102568
193. Ferguson GB, Martinez-Agosto JA. Yorkie and scalloped signaling regulates notch-dependent lineage specification during *drosophila* hematopoiesis. *Current Biology*. Elsevier Ltd; 2014;24: 2665–2672. doi:10.1016/j.cub.2014.09.081
194. Valanne S, Wang J-H, Ramet M. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. 2011;186: 649–656. doi:10.4049/jimmunol.1002302
195. Asha H, Nagy I, Kovacs G, Stetson D, Ando I, Dearolf CR. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*. 2003;163: 203–215. doi:10.1038/ng0693-195
196. Bretscher AJ, Honti V, Binggeli O, Burri O, Poidevin M, Kurucz E, et al. The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biology Open*. 2015;4: 355–363. doi:10.1242/bio.201410595
197. Honti V, Csordás G, Kurucz É, Márkus R, Andó I. The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: Hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd; 2014;42: 47–56. doi:10.1016/j.dci.2013.06.005
198. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental biology*. 2001;230: 243–257. doi:10.1006/dbio.2000.0123
199. Makhijani K, Alexander B, Tanaka T, Rulifson E, Brückner K. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development*. 2011;138: 5379–5391. doi:10.1242/dev.067322
200. Márkus R, Laurinyecz B, Kurucz E, Honti V, Bajusz I, Sipos B, et al. Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106: 4805–4809. doi:10.1073/pnas.0801766106
201. Petraki S, Alexander B, Brückner K. Assaying Blood Cell Populations of the *Drosophila melanogaster* Larva. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 1–11. doi:10.3791/52733
202. Zettervall C-J, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Ando I, et al. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101: 14192–7. doi:10.1073/pnas.0403789101

203. Wertheim B, Kraaijeveld AR, Schuster E, Blanc E, Hopkins M, Pletcher SD, et al. Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. *Genome biology*. England; 2005;6: R94. doi:10.1186/gb-2005-6-11-r94
204. Schlenke TA, Morales J, Govind S, Clark AG. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathogens*. 2007;3: 1486–1501. doi:10.1371/journal.ppat.0030158
205. Coustau C, Carkion Y, Nappi A, Shotkoski F, ffrench-Constant R. Differential induction of antibacterial transcripts in *Drosophila* susceptible and resistant to parasitism by *Leptopilina boulardi*. *Insect molecular biology*. England; 1996;5: 167–172.
206. Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005;35: 443–459. doi:10.1016/j.ibmb.2005.01.014
207. Nappi AJ, Ottaviani E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*. 2000;22: 469–480. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4
208. Nappi AJ, Vass E, Malagoli D, Carton Y. The effects of parasite-derived immune-suppressive factors on the cellular innate immune and autoimmune responses of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology*. 2004;90: 1139–1149. doi:10.1645/GE-266R
209. Russo J, Dupas S, Frey F, Carton Y, Brehelin M. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*. University of Leeds; 1996;112 ( Pt 1: 135–142. doi:10.1017/S0031182000065173
210. Crozatier M, Ubeda JM, Vincent A, Meister M. Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biology*. 2004;2. doi:10.1371/journal.pbio.0020196
211. Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*. Nature Publishing Group; 2009;461: 537–541. doi:10.1038/nature08313
212. Small C, Ramroop J, Otazo M, Huang LH, Saleque S, Govind S. An unexpected link between notch signaling and ROS in restricting the differentiation of hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Genetics*. 2014;197: 471–483. doi:10.1534/genetics.113.159210
213. Louradour I, Sharma A, Morin-poulard I, Letourneau M, Vincenta A, Crozatiera M, et al. Reactive oxygen species-dependent Toll / NF- Kappa B activation in the *Drosophila* hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. *eLife*. 2017; doi:https://doi.org/10.7554/eLife.25496
214. Sorrentino RP, Melk JP, Govind S. Genetic Analysis of Contributions of Dorsal Group and JAK-Stat92E Pathway Genes to Larval Hemocyte Concentration and the Egg Encapsulation Response in *Drosophila*. *Genetics*. 2004;166: 1343–1356. doi:10.1534/genetics.166.3.1343
215. Shrestha R, Gateff E. Ultrastructure and Cytochemistry of the Cell-types in the Tumorous Hematopoietic Organs and the Hemolymph of the Mutant Lethal ( l ) Malignant Blood Neoplasm ( l ) *mbn* of *Drosophila melanogaster*. *Dev Growth & Differ*. 1982;24: 83–98.
216. Makki R, Meister M, Pennetier D, Ubeda JM, Braun A, Daburon V, et al. A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biology*. 2010;8: 33–34. doi:10.1371/journal.pbio.1000441
217. Weavers H, Liepe J, Sim A, Wood W, Martin P, Stumpf MPH. Systems Analysis of the Dynamic Inflammatory Response to Tissue Damage Reveals Spatiotemporal Properties of the Wound Attractant Gradient. *Current Biology*. The Authors; 2016;26: 1975–1989. doi:10.1016/j.cub.2016.06.012
218. Vanha-Aho LM, Anderl I, Vesala L, Hultmark D, Valanne S, Ramet M. Edin Expression in the Fat Body Is Required in the Defense Against Parasitic Wasps in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog*. 2015;11: e1004895. doi:10.1371/journal.ppat.1004895
219. Howell L, Sampson CJ, Xavier MJ, Bolukbasi E, Heck MMS, Williams MJ. A directed miniscreen for genes involved in the *Drosophila* anti-parasitoid immune response. *Immunogenetics*. 2012;64: 155–161. doi:10.1007/s00251-011-0571-3
220. Williams MJ. The *Drosophila* cell adhesion molecule Neuroglian regulates Lissencephaly-1 localisation in circulating immunosurveillance cells. *BMC immunology*. 2009;10: 17. doi:10.1186/1471-2172-10-17
221. Sampson CJ, Valanne S, Fauvarque MO, Hultmark D, Rämetsä M, Williams MJ. The RhoGEF Zizimin-related acts in the *Drosophila* cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42. *Developmental and Comparative Immunology*. Elsevier Ltd; 2012;38: 160–168. doi:10.1016/j.dci.2012.05.004



222. Kari B, Csordás G, Honti V, Cinege G, Williams MJ, And I, et al. The raspberry gene is involved in the regulation of the cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 2016;11: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0150910
223. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunological reviews*. 2014;262: 193–215. doi:10.1111/imr.12212
224. Vlisidou I, Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS Journal*. 2015;282: 1368–1382. doi:10.1111/febs.13235
225. Schmitz A. Interactions immunité-parasitisme et immunité-symbiose chez les insectes : apport de deux modèles biologiques : *Drosophila*-parasitoïde et puceron-symbiotes-parasitoïde. 2012.
226. Honti V, Kurucz É, Csordás G, Laurinyecz B, Márkus R, Andó I. In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters*. 2009;126: 83–84. doi:10.1016/j.imlet.2009.08.004
227. Lee PY, Wang J-X, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013;94: 585–594. doi:10.1189/jlb.0113014
228. Weinstock C, Anliker M, von Zabern I. CD59: A long-known complement inhibitor has advanced to a blood group system. *Immunohematology*. United States; 2015;31: 145–151.
229. Tanaka K, Diekmann Y, Hazbun A, Hijazi A, Vreede B, Roch F, et al. Multispecies analysis of expression pattern diversification in the recently expanded insect Ly6 gene family. *Molecular Biology and Evolution*. 2015;32: 1730–1747. doi:10.1093/molbev/msv052
230. Syed MH, Krudewig A, Engelen D, Stork T, Klambt C. The CD59 Family Member Leaky/Coiled Is Required for the Establishment of the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*. 2011;31: 7876–7885. doi:10.1523/JNEUROSCI.0766-11.2011
231. Hijazi A, Haenlin M, Waltzer L, Roch F. The Ly6 protein coiled is required for septate junction and blood brain barrier organisation in *Drosophila*. *PLoS ONE*. 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0017763
232. Nilton A, Oshima K, Zare F, Byri S, Nannmark U, Nyberg KG, et al. Crooked, coiled and crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components. *Development*. 2010;137: 2427–37. doi:10.1242/dev.052605
233. Dudzic JP, Kondo S, Ueda R, Bergman CM, Lemaitre B. *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. *BMC Biology*. *BMC Biology*; 2015;13: 81. doi:10.1186/s12915-015-0193-6
234. Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, et al. New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology*. 2005;7: 335–350. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x
235. Braun A, Hoffmann JA, Meister M. Analysis of the *Drosophila* host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95: 14337–14342. doi:10.1073/pnas.95.24.14337
236. Corbo JC, Levine M. Characterization of an immunodeficiency mutant in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*. 1996;55: 211–220. doi:10.1016/0925-4773(96)00506-0
237. Rizki RM, Rizki TM. Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 1990;36: 523–529. doi:10.1016/0022-1910(90)90104-N
238. Rizki TM, Rizki RM, Bellotti RA. Genetics of a *Drosophila* phenoloxidase. *Molecular & general genetics* : MGG. Germany; 1985;201: 7–13.
239. Bidla G, Dushay MS, Theopold U. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *Journal of Cell Science*. 2007;120: 1209–1215. doi:10.1242/jcs.03420
240. D'Ischia M, Napolitano A, Pezzella A, Meredith P, Sarna T. Chemical and structural diversity in eumelanins: Unexplored bio-optoelectronic materials. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2009;48: 3914–3921. doi:10.1002/anie.200803786
241. Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European journal of cell biology*. Germany; 1995;68: 450–456.
242. Nappi AJ, Carton Y, Vass E. Reduced cellular immune competence of a temperature-sensitive dopa decarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina boulardi*. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. England; 1992;101: 453–460.
243. Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, et al. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in physiology*. Switzerland; 2014;5: 252. doi:10.3389/fphys.2014.00252

244. Nam H-J, Jang I-H, You H, Lee K-A, Lee W-J. Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Haya protease-phenoloxidase system in *Drosophila*. *The EMBO journal*. England; 2012;31: 1253–1265. doi:10.1038/emboj.2011.476
245. Castillejo-Lopez C, Hacker U. The serine protease Sp7 is expressed in blood cells and regulates the melanization reaction in *Drosophila*. *Biochemical and biophysical research communications*. United States; 2005;338: 1075–1082. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.042
246. Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, et al. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *The EMBO journal*. England; 2002;21: 6330–6337.
247. De Gregorio E, Han S-J, Lee W-J, Baek M-J, Osaki T, Kawabata S-I, et al. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Developmental cell*. United States; 2002;3: 581–592.
248. Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*. United States; 2006;281: 28097–28104. doi:10.1074/jbc.M601642200
249. Schmidt O, Soderhall K, Theopold U, Faye I. Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annual review of entomology*. United States; 2010;55: 485–504. doi:10.1146/annurev.ento.54.110807.090618
250. An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *The Journal of biological chemistry*. United States; 2009;284: 19716–19726. doi:10.1074/jbc.M109.007112
251. Asgari S. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Archives of insect biochemistry and physiology*. United States; 2006;61: 146–156. doi:10.1002/arch.20109
252. Asgari S, Rivers DB. Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annual review of entomology*. United States; 2011;56: 313–335. doi:10.1146/annurev-ento-120709-144849
253. Yan Z, Fang Q, Wang L, Liu J, Zhu Y, Wang F, et al. Insights into the venom composition and evolution of an endoparasitoid wasp by combining proteomic and transcriptomic analyses. *Scientific reports*. England; 2016;6: 19604. doi:10.1038/srep19604
254. Teng Z-W, Xiong S-J, Xu G, Gan S-Y, Chen X, Stanley D, et al. Protein Discovery: Combined Transcriptomic and Proteomic Analyses of Venom from the Endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae). *Toxins*. Switzerland; 2017;9. doi:10.3390/toxins9040135
255. Colinet D, Cazes D, Belghazi M, Gatti J-L, Poirie M. Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *The Journal of biological chemistry*. United States; 2011;286: 40110–40121. doi:10.1074/jbc.M111.288845
256. Coulette Q, Lemauf S, Colinet D, Prevost G, Anselme C, Poirie M, et al. Biochemical characterization and comparison of aspartylglucosaminidases secreted in venom of the parasitoid wasps *Asobara tabida* and *Leptopilina heterotoma*. *PloS ONE*. United States; 2017;12: e0181940. doi:10.1371/journal.pone.0181940
257. Falabella P, Riviello L, Caccialupi P, Rossodivita T, Teresa Valente M, Luisa De Stradis M, et al. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect biochemistry and molecular biology*. England; 2007;37: 453–465. doi:10.1016/j.ibmb.2007.02.005
258. Digilio MC, Isidoro N, Tremblay E, Pennacchio F. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *Journal of insect physiology*. England; 2000;46: 1041–1050.
259. Burke GR, Strand MR. Polydnaviruses of Parasitic Wasps: Domestication of Viruses To Act as Gene Delivery Vectors. *Insects*. Switzerland; 2012;3: 91–119. doi:10.3390/insects3010091
260. Burke GR, Walden KKO, Whitfield JB, Robertson HM, Strand MR. Widespread genome reorganization of an obligate virus mutualist. *PLoS genetics*. United States; 2014;10: e1004660. doi:10.1371/journal.pgen.1004660
261. Beckage N, Drezen J-M. Parasitoid Viruses Symbionts and Pathogens. 2012; 115–125.
262. Volkoff A-N, Ravallec M, Bossy J-P, Cerutti P, Rocher J, Cerutti M, et al. The replication of *Hyposoter didymator* polydnavirus: Cytopathology of the calyx cells in the parasitoid. *Biology of the Cell*. 1995;83: 1–13. doi:10.1016/0248-4900(96)89926-6
263. Stoltz DB, Vinson SB, MacKinnon EA. Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoid wasps. *Canadian journal of microbiology*. Canada; 1976;22: 1013–1023.
264. Norton WN, Vinson SB, Stoltz DB. Nuclear secretory particles associated with the calyx cells of the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis* (Cameron). *Cell and tissue research*. Germany; 1975;162: 195–208.

265. Gundersen-Rindal D, Dupuy C, Huguet E, Drezen J. Parasitoid polydnviruses: evolution, pathology and applications: Dedicated to the memory of Nancy E. Beckage. *Biocontrol Science and Technology*. 2013. doi:10.1080/09583157.2012.731497
266. Bezier A, Annaheim M, Herbinier J, Wetterwald C, Gyapay G, Bernard-Samain S, et al. Polydnviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*. United States; 2009;323: 926–930. doi:10.1126/science.1166788
267. Volkoff A-N, Jouan V, Urbach S, Samain S, Bergoin M, Wincker P, et al. Analysis of virion structural components reveals vestiges of the ancestral ichnovirus genome. *PLoS pathogens*. United States; 2010;6: e1000923. doi:10.1371/journal.ppat.1000923
268. Dupuy C, Huguet E, Drezen J-M. Unfolding the evolutionary story of polydnviruses. *Virus research*. Netherlands; 2006;117: 81–89. doi:10.1016/j.virusres.2006.01.001
269. Strand MR, Burke GR. Polydnvirus-wasp associations: evolution, genome organization, and function. *Current opinion in virology*. Netherlands; 2013;3: 587–594. doi:10.1016/j.coviro.2013.06.004
270. Federici BA, Bigot Y. Origin and evolution of polydnviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. *Journal of insect physiology*. England; 2003;49: 419–432.
271. Whitfield JB, Asgari S. Virus or not? Phylogenetics of polydnviruses and their wasp carriers. *Journal of insect physiology*. England; 2003;49: 397–405.
272. Barat-Houari M, Hilliou F, Jousset F-X, Sofer L, Deleury E, Rocher J, et al. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda* hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnvirus-associated variations in lepidopteran host genes transcript levels. *BMC genomics*. England; 2006;7: 160. doi:10.1186/1471-2164-7-160
273. Kroemer JA, Webb BA. Ikappabeta-related vankyrin genes in the *Campoletis sonorensis* ichnovirus: temporal and tissue-specific patterns of expression in parasitized *Heliothis virescens* lepidopteran hosts. *Journal of virology*. United States; 2005;79: 7617–7628. doi:10.1128/JVI.79.12.7617-7628.2005
274. Burke GR, Strand MR. Systematic analysis of a wasp parasitism arsenal. *Molecular ecology*. England; 2014;23: 890–901. doi:10.1111/mec.12648
275. Song J, Wang X, Hou D, Huang H, Liu X, Deng F, et al. The Host Specificities of Baculovirus per os Infectivity Factors. *PloS ONE*. United States; 2016;11: e0159862. doi:10.1371/journal.pone.0159862
276. Doremus T, Urbach S, Jouan V, Cousserans F, Ravallec M, Demetere E, et al. Venom gland extract is not required for successful parasitism in the polydnvirus-associated endoparasitoid *Hyposoter didymator* (Hym. Ichneumonidae) despite the presence of numerous novel and conserved venom proteins. *Insect biochemistry and molecular biology*. England; 2013;43: 292–307. doi:10.1016/j.ibmb.2012.12.010
277. Yu R, Chen Y-F, Chen X, Huang F, Lou Y, Liu S. Effects of venom/calyx fluid from the endoparasitic wasp *Cotesia plutellae* on the hemocytes of its host *Plutella xylostella* in vitro. *Journal of insect physiology*. England; 2007;53: 22–29. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.09.011
278. Beckage NE. Parasitoids and Polydnviruses. *BioScience*. [American Institute of Biological Sciences, Oxford University Press]; 1998;48: 305–311. doi:10.2307/1313357
279. Feddersen I, Sander K, Schmidt O. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. *Experientia*. 1986;42: 1278–1281. doi:10.1007/BF01946422
280. Bedwin O. An insect glycoprotein: a study of the particles responsible for the resistance of a parasitoid's egg to the defence reactions of its insect host. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. England; 1979;205: 271–286.
281. Reineke A, Asgari S, Schmidt O. Evolutionary origin of *Venturia canescens* virus-like particles. *Archives of insect biochemistry and physiology*. United States; 2006;61: 123–133. doi:10.1002/arch.20113
282. Salt G. Experimental studies in insect parasitism XIII. The haemocytic reaction of a caterpillar to eggs of its habitual parasite. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 1965;162: 303–318. Available: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/162/988/303.abstract>
283. Rotheram S. The surface of the egg of a parasitic insect. II. The ultrastructure of the particulate coat on the egg of *Nemeritis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 1973;183: 195 LP-204. Available: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/183/1071/195.abstract>
284. Rotheram S. Immune surface of eggs of a parasitic insect. *Nature*. England; 1967;214: 700.
285. Gueguen G, Rajwani R, Paddibhatla I, Morales J, Govind S. VLPs of *Leptopilina boulardi* share biogenesis and overall stellate morphology with VLPs of the heterotoma clade. *Virus research*. Netherlands; 2011;160: 159–165. doi:10.1016/j.virusres.2011.06.005



286. Morales J, Chiu H, Oo T, Plaza R, Hoskins S, Govind S. Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victorinae*. *Journal of Insect Physiology*. 2005;51: 181–195. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.11.002
287. Ferrarese R, Morales J, Fimiarcz D, Webb BA, Govind S. A supracellular system of actin-lined canals controls biogenesis and release of virulence factors in parasitoid venom glands. *The Journal of experimental biology*. 2009;212: 2261–2268. doi:10.1242/jeb.025718
288. Dupas S, Brehelin M, Frey F, Carton Y. Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology*. England; 1996;113: 207–212.
289. Rizki TM, Rizki RM. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Developmental and Comparative Immunology*. 1992;16: 103–110. doi:10.1016/0145-305X(92)90011-Z
290. Heavner ME, Ramroop J, Gueguen G, Ramrattan G, Dolios G, Scarpati M, et al. Novel Organelles with Elements of Bacterial and Eukaryotic Secretion Systems Weaponize Parasites of *Drosophila*. *Current biology*. England; 2017;27: 2869–2877.e6. doi:10.1016/j.cub.2017.08.019
291. Samson-Boshuizen M, Van Lenteren JC, Bakker K. Success of Parasitization of *Pseudeucoila Bochei* Weld (Hym., Cynip.): a Matter of Experience. *Netherlands Journal of Zoology*. 1973. doi:10.1163/002829674X00174
292. Vinchon S, Moreau SJM, Drezen JM, Prevost G, Cherqui A. Molecular and biochemical analysis of an aspartylglucosaminidase from the venom of the parasitoid wasp *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect biochemistry and molecular biology*. England; 2010;40: 38–48. doi:10.1016/j.ibmb.2009.12.007
293. Moreau SJM, Dingremont A, Doury G, Giordanengo P. Effects of parasitism by *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae) on the development, survival and activity of *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of insect physiology*. England; 2002;48: 337–347.
294. Enomaa N, Heiskanen T, Halila R, Sormunen R, Seppala R, Vihinen M, et al. Human aspartylglucosaminidase. A biochemical and immunocytochemical characterization of the enzyme in normal and aspartylglucosaminuria fibroblasts. *The Biochemical journal*. England; 1992;286: 613–618.
295. Noronkoski T, Stoineva IB, Petkov DD, Mononen I. Recombinant human glycosylasparaginase catalyzes hydrolysis of L-asparagine. *FEBS letters*. England; 1997;412: 149–152.
296. Ragan TJ, Bailey AP, Gould AP, Driscoll PC. Volume determination with two standards allows absolute quantification and improved chemometric analysis of metabolites by NMR from submicroliter samples. *Analytical chemistry*. United States; 2013;85: 12046–12054. doi:10.1021/ac403111s
297. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of nutrition*. United States; 2000;130: 1007S–15S.
298. Kelo E, Noronkoski T, Mononen I. Depletion of L-asparagine supply and apoptosis of leukemia cells induced by human glycosylasparaginase. *Leukemia*. England; 2009. pp. 1167–1171. doi:10.1038/leu.2008.387
299. Reichhart JM, Gubb D, Leclerc V. The *Drosophila* serpins: multiple functions in immunity and morphogenesis. *Methods in enzymology*. United States; 2011;499: 205–225. doi:10.1016/B978-0-12-386471-0.00011-0
300. Veillard F, Troxler L, Reichhart J-M. *Drosophila melanogaster* clip-domain serine proteases: Structure, function and regulation. *Biochimie*. France; 2016;122: 255–269. doi:10.1016/j.biochi.2015.10.007
301. Labrosse C, Eslin P, Doury G, Drezen JM, Poirie M. Haemocyte changes in *D. melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *Journal of insect physiology*. England; 2005;51: 161–170. doi:10.1016/j.jinsphys.2004.10.004
302. Chabert S, Allemand R, Poyet M, Eslin P, Gibert P. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control*. 2012;63: 40–47. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.05.005
303. Kacsoh BZ, Schlenke TA. High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS ONE*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0034721
304. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annual review of biochemistry*. United States; 2010;79: 803–833. doi:10.1146/annurev-biochem-060208-104626
305. Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell research*. England; 2010;20: 256–275. doi:10.1038/cr.2010.19
306. McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. England; 2011;12: 517–533. doi:10.1038/nrm3151

307. Luyet P-P, Gruenberg J. L'endocytose, cheval de Troie pour l'infection virale. *médecine sciences*. 2005;21: 909–910.
308. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 2009;78: 857–902. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540
309. Miaczynska M, Stenmark H. Mechanisms and functions of endocytosis. *The Journal of cell biology*. United States; 2008. pp. 7–11. doi:10.1083/jcb.200711073
310. Schmid SL, Sorkin A, Zerial M. Endocytosis: Past, present, and future. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. United States; 2014. p. a022509. doi:10.1101/cshperspect.a022509
311. Popova N V, Deyev IE, Petrenko AG. Clathrin-Mediated Endocytosis and Adaptor Proteins. *Acta Naturae*. A.I. Gordeyev; 2013;5: 62–73. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3848845/>
312. Smythe E, Ayscough KR. Actin regulation in endocytosis. *Journal of cell science*. England; 2006;119: 4589–4598. doi:10.1242/jcs.03247
313. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*. England; 2017;18: 361–374. doi:10.1038/nrm.2017.16
314. Gaibelet G, Terce F, Allart S, Lebrun C, Collet X, Jamin N, et al. Fluorescent probes for detecting cholesterol-rich ordered membrane microdomains: Entangled relationships between structural analogies in the membrane and functional homologies in the cell. *AIMS Biophysics*. 2017. doi:10.3934/biophy.2017.1.121
315. Ludwig A, Nichols BJ, Sandin S. Architecture of the caveolar coat complex. *Journal of cell science*. England; 2016;129: 3077–3083. doi:10.1242/jcs.191262
316. Parton RG, Collins BM. Unraveling the architecture of caveolae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States; 2016;113: 14170–14172. doi:10.1073/pnas.1617954113
317. Ludwig A, Howard G, Mendoza-Topaz C, Deerinck T, Mackey M, Sandin S, et al. Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex. *PLoS biology*. United States; 2013;11: e1001640. doi:10.1371/journal.pbio.1001640
318. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. United States; 2014;6. doi:10.1101/cshperspect.a016758
319. Hansen CG, Nichols BJ. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of cell science*. England; 2009;122: 1713–1721. doi:10.1242/jcs.033951
320. Ait-Slimane T, Galmes R, Trugnan G, Maurice M. Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Molecular biology of the cell*. United States; 2009;20: 3792–3800. doi:10.1091/mbc.E09-04-0275
321. Meister M, Tikkanen R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes*. Switzerland; 2014;4: 356–371. doi:10.3390/membranes4030356
322. Riento K, Frick M, Schafer I, Nichols BJ. Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. 2009; 912–918. doi:10.1242/jcs.039024
323. Donaldson JG, Johnson DL, Dutta D. Rab and Arf G proteins in endosomal trafficking and cell surface homeostasis. *Small GTPases*. United States; 2016;7: 247–251. doi:10.1080/21541248.2016.1212687
324. Schweitzer JK, Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Seminars in cell & developmental biology*. England; 2011;22: 39–47. doi:10.1016/j.semcdb.2010.09.002
325. Llobet A, Gallop JL, Burden JJE, Camdere G, Chandra P, Vallis Y, et al. Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. United States; 2011;31: 8512–8519. doi:10.1523/JNEUROSCI.6223-09.2011
326. Watanabe S, Boucrot E. Fast and ultrafast endocytosis. *Current opinion in cell biology*. England; 2017;47: 64–71. doi:10.1016/j.ceb.2017.02.013
327. Cendrowski J, Maminska A, Miaczynska M. Endocytic regulation of cytokine receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews*. England; 2016;32: 63–73. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.07.002
328. Guha A, Sriram V, Krishnan KS, Mayor S. Shibire mutations reveal distinct dynamin-independent and -dependent endocytic pathways in primary cultures of *Drosophila* hemocytes. *Journal of cell science*. England; 2003;116: 3373–3386. doi:10.1242/jcs.00637
329. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular Logistics*. Landes Bioscience; 2012;2: 203–208. doi:10.4161/cl.23967

330. Hijazi A, Masson W, Auge B, Waltzer L, Haenlin M, Roch F. boudin is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. *Development* (Cambridge, England). England; 2009;136: 2199–2209. doi:10.1242/dev.033845
331. Wan B, Goguet E, Ravallec M, Pierre O, Lemauf S, Volkoff A-N, et al. Atypical extracellular vesicles as interspecies comunicasomes involved in host specificity: the case of a parasitoid wasp of *Drosophila*. *Soumis*. 2017.
332. Cherbas L, Willingham A, Zhang D, Yang L, Zou Y, Eads BD, et al. The transcriptional diversity of 25 *Drosophila* cell lines. *Genome research*. United States; 2011;21: 301–314. doi:10.1101/gr.112961.110
333. Johansson KC, Metzendorf C, Soderhall K. Microarray analysis of immune challenged *Drosophila* hemocytes. *Experimental cell research*. United States; 2005;305: 145–155. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.018
334. Loseva O, Engström Y. Analysis of signal-dependent changes in the proteome of *Drosophila* blood cells during an immune response. *Molecular & cellular proteomics*. 2004;3: 796–808. doi:10.1074/mcp.M400028-MCP200
335. Piyankarage SC, Augustin H, Grosjean Y, Featherstone DE, Shippy SA. Hemolymph amino acid analysis of individual *Drosophila* larvae. *Analytical chemistry*. United States; 2008;80: 1201–1207. doi:10.1021/ac701785z
336. Salmand P-A, Iche-Torres M, Perrin L. Tissue-specific cell sorting from *Drosophila* embryos: application to gene expression analysis. *Fly*. United States; 2011;5: 261–265.
337. Tirouvanziam R, Davidson CJ, Lipsick JS, Herzenberg LA. Fluorescence-activated cell sorting ( FACS ) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. 2004;
338. Anggraeni T, Ratcliffe N. Studies on cell-cell co-operation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*. 1991. doi:10.1016/0022-1910(91)90055-5
339. Huxham IM, Lackie AM. Behaviour in vitro of separated fractions of haemocytes of the locust *Schistocerca gregaria*. *Cell and Tissue Research*. 1988;251: 677–684. doi:10.1007/BF00214017
340. Pech LL, Trudeau D, Strand MR. Separation and behavior in vitro of hemocytes from the moth , *Pseudaletia includens*. *Cell and Tissue Research*. 1994; 159–167.
341. Morrissey JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical biochemistry*. 1981;117: 307–310. doi:10.1016/0003-2697(81)90783-1
342. Mathe-Hubert H, Colinet D, Deleury E, Belghazi M, Ravallec M, Poulain J, et al. Comparative venomics of *Psytalia lounsburyi* and *P. concolor*, two olive fruit fly parasitoids: a hypothetical role for a GH1 beta-glucosidase. *Scientific reports*. England; 2016;6: 35873. doi:10.1038/srep35873
343. Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biology of reproduction*. United States; 1996;55: 956–974.
344. Markoutsas S, Bahr U, Papisotiriou DG, Hafner A-K, Karas M, Sorg BL. Sulfo-NHS-SS-biotin derivatization: a versatile tool for MALDI mass analysis of PTMs in lysine-rich proteins. *Proteomics*. Germany; 2014;14: 659–667. doi:10.1002/pm.201300309
345. Handke B, Poernbacher I, Goetze S, Ahrens CH, Omasits U, Marty F, et al. The Hemolymph Proteome of Fed and Starved *Drosophila* Larvae. Lau ATY, editor. *PLoS ONE*. San Francisco, USA: Public Library of Science; 2013;8: e67208. doi:10.1371/journal.pone.0067208
346. Sato JD, Roberts DB. Synthesis of larval serum proteins 1 and 2 of *Drosophila melanogaster* by third instar fat body. *Insect Biochemistry*. 1983;13: 1–5. doi:https://doi.org/10.1016/0020-1790(83)90057-4
347. Asada N, Yokoyama G, Kawamoto N, Norioka S, Hatta T. Prophenol Oxidase A3 in *Drosophila melanogaster*: Activation and the PCR-Based cDNA Sequence. *Biochemical genetics*. 2003. doi:10.1023/A:1023325610300
348. Alatortsev VE, Kramerova IA, Frolov M V, Lavrov SA, Westphal ED. Vinculin gene is non-essential in *Drosophila melanogaster*. *FEBS letters*. England; 1997;413: 197–201.
349. Galletta BJ, Niu XP, Erickson MR, Abmayr SM. Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene*. Netherlands; 1999;228: 243–252.
350. Brown NH, Gregory SL, Rickoll WL, Fessler LI, Prout M, White RAH, et al. Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. *Developmental cell*. United States; 2002;3: 569–579.
351. Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Communication and Signaling*. 2009;7: 13. doi:10.1186/1478-811X-7-13

352. Baek SH, Kwon Y-C, Lee H, Choe K-M. Rho-family small GTPases are required for cell polarization and directional sensing in *Drosophila* wound healing. *Biochemical and biophysical research communications*. United States; 2010;394: 488–492. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.124
353. Escudero LM, Bischoff M, Freeman M. Myosin II regulates complex cellular arrangement and epithelial architecture in *Drosophila*. *Developmental cell*. United States; 2007;13: 717–729. doi:10.1016/j.devcel.2007.09.002
354. Bloor JW, Kiehart DP. zipper Nonmuscle myosin-II functions downstream of PS2 integrin in *Drosophila* myogenesis and is necessary for myofibril formation. *Developmental biology*. United States; 2001;239: 215–228. doi:10.1006/dbio.2001.0452
355. Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D, Bryant PJ. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development (Cambridge, England)*. England; 1999;126: 211–219.
356. Nonaka S, Nagaosa K, Mori T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Integrin alphaPS3/betaneu-mediated phagocytosis of apoptotic cells and bacteria in *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry*. United States; 2013;288: 10374–10380. doi:10.1074/jbc.M113.451427
357. Shokal U, Eleftherianos I. Evolution and Function of Thioester-Containing Proteins and the Complement System in the Innate Immune Response. *Frontiers in immunology*. Switzerland; 2017;8: 759. doi:10.3389/fimmu.2017.00759
358. Blandin S, Leвшina EA. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular immunology*. England; 2004;40: 903–908.
359. Dostalova A, Rommelaere S, Poidevin M, Lemaitre B. Thioester-containing proteins regulate the Toll pathway and play a role in *Drosophila* defence against microbial pathogens and parasitoid wasps. *BMC biology*. England; 2017;15: 79. doi:10.1186/s12915-017-0408-0
360. Pearson AM. Scavenger receptors in innate immunity. *Current opinion in immunology*. England; 1996;8: 20–28.
361. Ramet M, Pearson A, Manfruelli P, Li X, Koziel H, Gobel V, et al. *Drosophila* scavenger receptor CI is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*. United States; 2001;15: 1027–1038.
362. Pearson A, Lux A, Krieger M. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States; 1995;92: 4056–4060.
363. Lazzaro BP. Elevated polymorphism and divergence in the class C scavenger receptors of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics*. United States; 2005;169: 2023–2034. doi:10.1534/genetics.104.034249
364. Fang Q, Wang L, Zhu Y, Stanley DW, Chen X, Hu C, et al. *Pteromalus puparum* venom impairs host cellular immune responses by decreasing expression of its scavenger receptor gene. *Insect biochemistry and molecular biology*. England; 2011;41: 852–862. doi:10.1016/j.ibmb.2011.07.001
365. Etebari K, Hussain M, Asgari S. Suppression of scavenger receptors transcription by parasitoid factors. *Developmental & Comparative Immunology*. 2012;38: 517–524. doi:https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.08.006
366. Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C, Hoffmann JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature reviews Immunology*. England; 2007;7: 862–874. doi:10.1038/nri2194
367. Kurucz E, Markus R, Zsomboki J, Folkl-Medzihradzky K, Darula Z, Vilmos P, et al. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Current biology*. England; 2007;17: 649–654. doi:10.1016/j.cub.2007.02.041
368. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RA. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*. United States; 1996;4: 431–443.
369. Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart J-M, Wang C, Butt TM, et al. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. United States; 2006;127: 1425–1437. doi:10.1016/j.cell.2006.10.046
370. Kudumala SR, Penserga T, Borner J, Slipchuk O, Kakad P, Lee LH, et al. Lissencephaly-1 dependent axonal retrograde transport of LI-type CAM Neuroglian in the adult *drosophila* central nervous system. *PLoS ONE*. United States; 2017;12: e0183605. doi:10.1371/journal.pone.0183605
371. Prevost N, Woulfe D, Tanaka T, Brass LF. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred. *Proceedings of the*



- National Academy of Sciences of the United States of America. United States; 2002;99: 9219–9224. doi:10.1073/pnas.142053899
372. Amit M, Weisberg SJ, Nadler-Holly M, McCormack EA, Feldmesser E, Kaganovich D, et al. Equivalent mutations in the eight subunits of the chaperonin CCT produce dramatically different cellular and gene expression phenotypes. *Journal of molecular biology*. England; 2010;401: 532–543. doi:10.1016/j.jmb.2010.06.037
373. Dekker C, Stirling PC, McCormack EA, Filmore H, Paul A, Brost RL, et al. The interaction network of the chaperonin CCT. *The EMBO journal*. England; 2008;27: 1827–1839. doi:10.1038/emboj.2008.108
374. Roh S-H, Kasembeli M, Galaz-Montoya JG, Trnka M, Lau WC-Y, Burlingame A, et al. Chaperonin TRiC/CCT Modulates the Folding and Activity of Leukemogenic Fusion Oncoprotein AML1-ETO. *The Journal of biological chemistry*. United States; 2016;291: 4732–4741. doi:10.1074/jbc.M115.684878
375. Bajgar A, Kucerova K, Jonatova L, Tomcala A, Schneedorferova I, Okrouhlik J, et al. Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS biology*. United States; 2015;13: e1002135. doi:10.1371/journal.pbio.1002135
376. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013;200: 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138
377. van Dommelen SM, Vader P, Lakhali S, Kooijmans SAA, van Solinge WW, Wood MJA, et al. Microvesicles and exosomes: opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. Netherlands; 2012;161: 635–644. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.021
378. Antonyak MA, Cerione RA. Emerging picture of the distinct traits and functions of microvesicles and exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States; 2015;112: 3589–3590. doi:10.1073/pnas.1502590112
379. Haraszti RA, Didiot M-C, Sapp E, Leszyk J, Shaffer SA, Rockwell HE, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of extracellular vesicles*. Sweden; 2016;5: 32570.
380. Crescitelli R, Lasser C, Szabo TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *Journal of extracellular vesicles*. Sweden; 2013;2. doi:10.3402/jev.v2i0.20677
381. Tissot J-D, Canellini G, Rubin O, Angelillo-Scherrer A, Delobel J, Prudent M, et al. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translational Proteomics*. 2013;1: 38–52. doi:https://doi.org/10.1016/j.trprot.2013.04.004
382. Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*. United States; 2014;30: 255–289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
383. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology*. England; 2015;25: 364–372. doi:10.1016/j.tcb.2015.01.004
384. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of proteomics*. Netherlands; 2010;73: 1907–1920. doi:10.1016/j.jprot.2010.06.006
385. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*. England; 2004;16: 415–421. doi:10.1016/j.ceb.2004.06.003
386. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States; 2010;107: 6328–6333. doi:10.1073/pnas.0914843107
387. Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*. England; 2014;29: 116–125. doi:10.1016/j.ceb.2014.05.004
388. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews. Immunology*. England; 2002. pp. 569–579. doi:10.1038/nri855
389. Sergeeva OA, van der Goot FG. Kicking Out Pathogens in Exosomes. *Cell*. United States; 2015;161: 1241–1242. doi:10.1016/j.cell.2015.05.040
390. Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends in parasitology*. England; 2015;31: 477–489. doi:10.1016/j.pt.2015.06.009
391. Gangoda L, Boukouris S, Liem M, Kalra H, Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics*. Germany; 2015;15: 260–271. doi:10.1002/pmic.201400234

392. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO reports*. 2015;16: 24–43. doi:10.15252/embr.201439363
393. Arefin B, Kucerova L, Krautz R, Kranenburg H, Parvin F, Theopold U. Apoptosis in Hemocytes Induces a Shift in Effector Mechanisms in the *Drosophila* Immune System and Leads to a Pro-Inflammatory State. *PloS ONE*. United States; 2015;10: e0136593. doi:10.1371/journal.pone.0136593
394. Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos I. Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in parasitology*. England; 2011;27: 537–547. doi:10.1016/j.pt.2011.09.001
395. Colinet D, Kremmer L, Lemauf S, Rebuf C, Gatti J-L, Poirie M. Development of RNAi in a *Drosophila* endoparasitoid wasp and demonstration of its efficiency in impairing venom protein production. *Journal of insect physiology*. England; 2014;63: 56–61. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.02.011
396. Levental I, Grzybek M, Simons K. Raft domains of variable properties and compositions in plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States; 2011;108: 11411–11416. doi:10.1073/pnas.1105996108
397. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. United States; 2011;3: a004697. doi:10.1101/cshperspect.a004697

## Résumé

Les guêpes endoparasitoïdes se développent dans le corps et aux dépens d'autres arthropodes, conduisant à leur mort. L'œuf de parasitoïde pondue entraîne une réponse immunitaire de l'hôte, la formation autour de l'œuf d'une capsule multicellulaire (chez la *Drosophile*, formée essentiellement de lamellocytes, hémocytes spécialisés dans la réponse au parasitisme), associée à une réaction de mélanisation produisant des radicaux toxiques. *Leptopilina boulardi* (Cynipidae, Figitidae) est un endoparasitoïde de larves de *Drosophile*, incluant *D. melanogaster*, dont le succès repose sur l'injection de venin avec l'œuf, inhibant notamment la réponse immunitaire de l'hôte. Ce venin est synthétisé au niveau d'une glande unique reliée par un court canal à un large réservoir. Il contient des composants protéiques mais aussi, chez *L. boulardi*, des vésicules originales (baptisées vénosomes). Les objectifs de ma thèse étaient de i) déterminer si les vénosomes jouent un rôle dans le transport et le ciblage de facteurs de virulence ou FVs identifiés dans l'équipe - LbGAP et LbGAP2, des RhoGAPs sécrétées dans le venin – et apparemment impliqués dans l'inhibition de la fonction des lamellocytes ii) tester leur rôle dans la spécificité d'hôte du parasitoïde iii) développer une méthode pour séparer les lamellocytes en vue d'une étude protéomique.

Avec différentes approches, j'ai montré que LbGAP et LbGAP2 sont synthétisées dans toutes les cellules de la glande à venin et qu'elles sont ensuite intégrées aux vénosomes lors de leur assemblage qui, de façon surprenante, semble se faire de façon extracellulaire dans la lumière du canal reliant la glande au réservoir. Cette intégration implique un mécanisme spécifique car la serpine LbSPN également sécrétée en grande quantité, ne s'associe pas aux vénosomes. La microinjection de vénosomes purifiés ou de venin dans la larve hôte a le même effet sur la morphologie des lamellocytes et protège totalement contre l'encapsulation. La mise au point d'une technique de marquage fluorescent des vénosomes purifiés et leur co-immunolocalisation avec LbGAP et LbGAP2 dans les lamellocytes après microinjection, a fourni la preuve que les vénosomes transportent et ciblent ces facteurs de virulence.

Leur entrée dans les lamellocytes implique certaines des voies de l'endocytose : les vénosomes et LbGAP ne colocalisent pas avec la clathrine (marqueur des vésicules mantelées) et la Rab GTPase Rab5 (vésicules mantelées/endosomes précoces) mais colocalisent avec Rab7 (endosomes tardifs), Rab11 (endosomes recyclés) et Lamp1 (lysosomes) et aussi fortement avec la flotilline et le marqueur de surface des lamellocytes Attila (une protéine à ancre GPI), des protéines généralement enrichies dans les radeaux lipidiques membranaires. Ceci suggère que les vénosomes/FVs entrent dans les cellules par une endocytose raft-domaine dépendant et se distribuent ensuite dans presque tous les compartiments cellulaires.

J'ai aussi observé une forte variation de capacité d'entrée et de quantité de vénosomes dans les lamellocytes selon les espèces de *Drosophile* testées (*D. simulans*, *D. yakuba*, *D. suzukii*) qui est corrélée au niveau de réussite parasitaire de *L. boulardi* sur ces espèces. Les vénosomes pourraient ainsi participer à la spécificité d'hôte du parasitoïde en représentant un nouveau niveau à l'échelle cellulaire. Enfin, ceci suggère l'existence d'un ou des récepteurs spécifiques impliqués dans la reconnaissance et l'entrée des vénosomes sur les lamellocytes de *D. melanogaster*. Avec la souche mutante Hop<sup>Tum-1</sup> qui produit des lamellocytes de façon constitutive, j'ai mis au point une méthode de séparation de ces cellules et entrepris l'analyse protéomique de leur membrane pour rechercher des récepteurs candidats.

Mes résultats démontrent que les vénosomes sont des véhicules de transport inter-espèces impliqués dans la virulence parasitaire et qu'ils représentent un nouveau niveau dans la spécificité d'hôte. Ils ouvrent aussi la voie vers l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans l'interaction vénosomes-lamellocytes