



**HAL**  
open science

# Analyse moléculaire de la réponse immunitaire du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* au complexe nématobactérien entomopathogène *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*

Louise Huot

► **To cite this version:**

Louise Huot. Analyse moléculaire de la réponse immunitaire du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* au complexe nématobactérien entomopathogène *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTG084 . tel-02861890

**HAL Id: tel-02861890**

**<https://theses.hal.science/tel-02861890>**

Submitted on 9 Jun 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.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie des Interactions - Mécanismes des Interactions Parasitaires Pathogènes et Symbiotiques

École doctorale GAIA

Unité de recherche Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes (UMR 1333)

Analyse moléculaire de la réponse immunitaire du lépidoptère  
*Spodoptera frugiperda* au complexe nématobactérien  
entomopathogène *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*

Présentée par Louise HUOT

Le 13 décembre 2019

Sous la direction de Bernard DUVIC

Devant le jury composé de

<b>Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN</b> , Directrice de recherche, CNRS, Montpellier	Présidente du jury
<b>Elisabeth HUGUET</b> , Professeur, Université de Tours	Rapporteur
<b>Julien ROYET</b> , Professeur, Aix-Marseille Université	Rapporteur
<b>Christine PAILLARD</b> , Directrice de recherche, CNRS, Plouzané	Examinatrice
<b>Stephen BAGHDIGUIAN</b> , Professeur, Université de Montpellier	Examineur
<b>Bernard DUVIC</b> , Chargé de recherche, INRA, Montpellier	Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## **Remerciements**

*Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de prendre de leur temps pour évaluer ce travail. Je remercie en particulier les deux rapporteurs, Mme Elisabeth Huguet et M. Julien Royet, pour leurs nombreux encouragements lors de nos échanges par e-mail.*

*Je remercie également M. Bernard Duvic, mon directeur de thèse, pour son accompagnement, son amabilité, et pour tous les petits et grands services qu'il m'a rendus au cours de cette thèse. Merci aussi à M. Nicolas Nègre pour sa participation à la conception de nos deux articles et pour m'avoir initiée aux analyses de données de RNAseq.*

*Je souhaiterais remercier chaleureusement M. Pierre-Alain Girard, pour avoir eu la finesse d'esprit nécessaire pour me former aux expérimentations en paillasse, qui me faisaient très peur. Je le remercie aussi pour tout le temps qu'il m'a fait gagner en m'aidant à disséquer des insectes, ainsi que pour les discussions passionnantes que nous avons eues à la lueur de nos loupes binoculaires. Je remercie aussi Mme Sylvie Pagès, pour tout le travail qu'elle a fourni pour que nous puissions travailler sur des nématodes axéniques, ainsi que M. Marc Ravallec, pour les pistes de travail qu'il a permis d'ouvrir grâce à son expertise en microscopie. Un grand merci également à Audrey Bigourdan et à Gaëlle Lextrait, les deux stagiaires de Master 1 que nous avons accueillies, et qui par leur rigueur et leur autonomie, ont considérablement contribué à l'avancement de mes travaux de thèse.*

*Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire DGIMI, pour leur accueil, leur amabilité au quotidien et leur professionnalisme. Je voudrais en particulier remercier Mme Caroline Ausseil, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans l'ensemble de mes démarches administratives. Un grand merci aussi à Mme Clotilde Gibard, M. Gaëtan Clabots et M. Raphaël Bousquet, pour tout le travail qu'ils font à l'insectarium, pour leurs bienveillances, et pour les petites discussions que nous avons eues, qui étaient toujours très agréables. Merci également à Mme Magali Eychenne, Mme Anne Lanois et M. Jean-Claude Ogier, pour avoir partagé leurs connaissances techniques avec moi. Merci aussi à Mme Isabelle Darboux, pour avoir pris de son temps afin de me renseigner et de me guider sur plusieurs aspects théoriques et pratiques de ma thèse. Et merci à Marie Frayssinet, avec laquelle je n'ai pas eu la chance de*

*travailler souvent, mais qui m'a beaucoup apporté de par sa contribution au bien-être de toute l'unité et de par ses attentions lors de la préparation de ma soutenance de thèse.*

*Un grand merci également aux membres de mon comité de thèse, Mme Nathalie Volkoff, Mme Christine Paillard, M. Mathieu Sicard et M. Abdelaziz Heddi, pour leur aide précieuse et pour leurs propositions constructives.*

*Merci à tous les doctorants que j'ai croisés au laboratoire DGIMI : à Sarah François, pour son talent et les discussions -toujours très intéressantes- que nous avons eues, à Laetitia Pigeyre (qui est aussi très intelligente) pour son naturel et sa gentillesse réconfortantes, à Sandra Nhim, pour m'avoir fait découvrir le Royal et pour les discussions (presque ?) philosophiques que nous avons eues, à Amaury Payelleville, pour ses conseils de grand sage et sa gentillesse, à Ange Lorenzi, le cow-boy, pour m'avoir supportée pendant trois ans et pour avoir été stressé aux mêmes moments que moi, ce qui m'a un peu soulagée. Merci aussi à Djibril Aboubakar Souna, à Martine Rehayem, à Marine Cambon et à Rania Jabeur, que je regrette de ne pas avoir eu le temps de mieux connaître.*

*Je souhaiterais également remercier Mme Carole Sainglas, ma première collègue de bureau, pour sa grande sympathie, Mme Malvina Schatz, pour son soutien précieux lors des phases de rédaction et de soutenance, et Mme Véronique Jouan, pour la bienveillance et le naturel dont elle a fait preuve à chaque fois que nous nous sommes croisées.*

*Je souhaiterais aussi remercier très sincèrement l'ensemble des enseignants qui ont su partager leurs connaissances et leurs passions pour leurs disciplines au cours de mon cursus. Cela m'a valu quelques grands moments de révélation, ce que j'adore, et je n'aurais pas eu l'idée de me lancer dans une thèse sans cela.*

*Pour finir, je souhaiterais adresser un très grand merci à ma famille et à mes amis, pour leur soutien constant et pour la détermination dont ils ont dû faire preuve pour m'extraire de mon travail de thèse de temps en temps, ce qui était très important. Je remercie en particulier ma mère, Mme Catherine Ferrière-Marzio, pour m'avoir accompagnée et épaulée au quotidien lors de la rédaction du présent manuscrit.*

## Résumé

Les complexes nématobactériens (CNBs) entomopathogènes sont des associations naturelles symbiotiques et mutualistes entre des nématodes et des bactéries parasites d'insectes. Dans le cadre de ces associations, le nématode sert tout d'abord de vecteur à la bactérie, qu'il transporte dans le sol et libère à l'intérieur du corps des insectes. La bactérie augmente quant à elle la virulence du CNB, puis sert de ressource nutritive au nématode dans le cadavre de l'insecte. En raison de l'originalité de ces pathogènes et de leur potentiel en lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures, les modalités de leurs interactions avec les insectes ont fait l'objet de nombreuses études. Ces travaux ont permis d'établir que la capacité d'un CNB à infecter et à tuer un hôte dépend d'une combinaison de facteurs écologiques et comportementaux, ainsi que du dialogue s'établissant entre chaque membre du CNB et le système immunitaire de l'insecte. Les insectes possèdent un système immunitaire élaboré et capable de répondre de façon adaptée à une grande diversité d'agents infectieux. Ce système est basé sur trois composantes principales : des barrières épithéliales, des réponses cellulaires et humorales locales et des réponses humorales systémiques. Bien qu'un grand nombre de stratégies et de facteurs permettant aux nématodes et aux bactéries de contrer ces trois composantes ait été identifié au sein de différents modèles d'interaction CNB-insecte, l'étude du dialogue s'établissant entre chaque partenaire et le système immunitaire des hôtes souffre d'un déficit de connaissance des aspects signalétiques et moléculaires des réponses immunitaires que les insectes opposent à ces infections duales.

L'objectif premier de cette thèse était de contribuer au développement de ces connaissances au travers d'une analyse transcriptionnelle détaillée et structurée des réponses immunitaires d'un modèle d'insecte lépidoptère, *Spodoptera frugiperda*, à l'un des CNBs les plus étudiés, l'association *S. carpocapsae-X. nematophila*. Dans le contexte scientifique actuel, ce travail était tout d'abord caractérisé par deux nouveautés méthodologiques : l'utilisation d'une approche transcriptomique sur tissus immuno-compétents pour identifier les gènes de l'immunité affectés par l'infection par le CNB, et l'utilisation d'une méthode d'infection par injection de la bactérie et du nématode pour discriminer les réponses immunitaires induites par chaque partenaire. Ce travail a permis d'obtenir une image très résolutive et structurée des réponses immunitaires de l'insecte qui servira de base de travail pour (i) la caractérisation fonctionnelle des interactions des gènes de l'immunité identifiés avec chaque partenaire du CNB et (ii) l'étude détaillée du dialogue moléculaire entre le système immunitaire de *S. frugiperda* et le CNB. Ce travail a également été marqué par la découverte de deux potentiels nouveaux clusters de gènes immunitaires, les *GBHs* et les *UNKs*, qui sont parmi les gènes les plus fortement induits lors de l'interaction tripartite. Nos analyses bioinformatiques et tests d'activité préliminaires suggèrent que les *GBHs* pourraient avoir été acquis par transfert horizontal de gènes bactériens et que les *UNKs* pourraient résulter d'une co-évolution d'insectes de la famille des noctuelles avec des CNBs *Steinernema-Xenorhabdus*. Cette hypothèse ouvre de nouvelles pistes de recherches pour la compréhension des variations de sensibilité aux CNBs entomopathogènes au sein de la diversité des insectes.

## Mots clefs

Insecte, Immunité, Complexe nématobactérien entomopathogène, Transcriptomique

## Abstract

Entomopathogenic nematobacterial complexes (NBCs) are natural symbiotic associations between nematodes and bacteria that are pathogenic for insects. In these associations, the bacterial partner uses the nematode as a vector, which transports it in the soil and releases it inside the insect's body. The bacterium then increases the NBC's virulence and is used as a food supply by the nematode partner in the insect's dead body. Due to the originality of these dual pathogens and to their potential for biological control of insect crop pests, studies have been conducted on diverse aspects of their interactions with insects. These works have shown the ability of an NBC to infect and kill an insect depends on a combination of ecological and behavioral factors, as well as on the dialogue between the two partners of the NBC and the insect's immune system. Insects possess an elaborate immune system which is able to respond by adapted ways to a huge diversity of infectious agents. This system relies on three main components: epithelial barriers, local cellular and humoral responses and systemic humoral responses. A large number of strategies and factors used by NBCs to counteract these three components have already been identified in several NBC-insect interaction models. However, the study of the dialogue between each NBC partner and the hosts' immune systems is currently suffering from a lack of knowledge of the signaling and molecular aspects of the insects' immune responses to these dual infections.

The first goal of this thesis was to increase this knowledge through a detailed and structured transcriptional analysis of the immune responses of a lepidopteran model, *Spodoptera frugiperda*, to one of the most studied NBCs, the *S. carpocapsae*-*X. nematophila* association. In the current scientific context, this work was mainly characterized by two methodologic novelties: the use of a topologic approach for the transcriptomic analysis of the induced immune responses to the infection by the NBC, and the use of an infection by injection method for the discrimination between the nematode- and the bacterium-induced immune responses. This work allowed the observation of a structured and highly resolute picture of the induced immune responses, which will be used as a working base for (i) the functional characterization of the interactions of identified immune genes with each partner of the NBC, and (ii) for the detailed analysis of the molecular dialogue between the immune system of *S. frugiperda* and the NBC. Finally, this work also allowed the identification of two potential new clusters of immune genes, the *GBHs* and the *UNKs*, which are among the most overexpressed genes during the tripartite interaction. Our preliminary bioinformatics analyses and activity tests suggest the *GBHs* could have been acquired by horizontal gene transfer from bacteria and the *UNKs* could result from a coevolution between noctuids and some *Steinernema-Xenorhabdus* NBCs. This hypothesis opens new research trails for the understanding of the NBC-sensitivity variations within insect diversity.

## Keywords

Insect, Immunity, Entomopathogenic nematobacterial complex, Transcriptomics

**INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....5**

**PREAMBULE .....6**

**I. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES INSECTES ET SES BASES MOLECULAIRES.....7**

**A. Premières barrières aux infections.....7**

1. Défenses des épithéliums d'origine ectodermique..... 8

1. a. Barrière cuticulaire ..... 8

1. b. Synthèse de peptides antimicrobiens ..... 8

1. c. Coagulation..... 9

1. d. Réparation tissulaire ..... 10

2. Défenses de l'épithélium de l'intestin moyen ..... 10

2. a. Matrice péritrophique ..... 10

2. b. Enzymes digestives et pH intestinal ..... 11

2. c. Synthèse d'espèces réactives de l'oxygène ..... 11

2. d. Synthèse de peptides antimicrobiens ..... 13

2. e. Contraction des muscles viscéraux..... 14

2. f. Extrusion cytoplasmique ..... 15

2. g. Régénération tissulaire ..... 15

**B. Réponses cellulaires et humorales localisées .....17**

1. Hématopoïèse ..... 17

1.a. Hématopoïèse chez l'embryon..... 18

1.b. Hématopoïèse chez la larve ..... 19

1. c. Hématopoïèse chez l'adulte ..... 21

2. Recrutement et activation des hémocytes..... 22

2. a. Processus de recrutement..... 22

2. b. Processus d'activation ..... 25

3. Mélanisation..... 28

3. a. Voie de synthèse de la mélanine ..... 28

3. b. Induction et régulation..... 29

4. Phagocytose ..... 31

4. a. Reconnaissance ..... 31

4. b. Internalisation et destruction..... 35

5. Encapsulation et nodulation ..... 36

5. a. Reconnaissance ..... 37

5. b. Agrégation des hémocytes ..... 37

5. c. Séquestration et destruction ..... 39

<b>C. Réponses humorales systémiques .....</b>	<b>39</b>
1. Voies d'induction.....	40
1. a. Voie Imd canonique.....	40
1. b. Voies Imd non-canoniques .....	42
1. c. Voie Toll .....	42
1. d. Coopération des voies Imd et Toll .....	44
1. e. Autres voies d'induction .....	45
2. Effecteurs antimicrobiens .....	46
2. a. Peptides antimicrobiens .....	46
2. b. Lysozymes et protéines Lysozyme-like.....	49
2. c. Bomanines .....	49
<b>D. ARN interférence .....</b>	<b>50</b>
1. Voie des siRNAs exogène .....	51
2. Voie des piRNAs.....	52
<b>Conclusion.....</b>	<b>52</b>
<b>II. LES COMPLEXES NEMATOBACTERIENS ENTOMOPATHOGENES ET LEURS INTERACTIONS AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES INSECTES .....</b>	<b>54</b>
<b>A. Origines et diversité .....</b>	<b>54</b>
1. Emergences au cours de l'évolution des nématodes .....	54
2. Diversités d'espèces et d'associations .....	56
<b>B. Habitats, comportements et spectres d'hôtes.....</b>	<b>57</b>
1. Répartitions géographiques et habitats .....	57
2. Stratégies de chasse et spectres d'hôtes .....	58
<b>C. Infection et cycle de vie parasitaire des complexes .....</b>	<b>60</b>
1. Forme infectieuse quiescente .....	60
2. Infection de l'hôte par le nématode.....	61
3. Libération des symbiotes bactériens et mort de l'hôte .....	61
4. Développement et reproduction dans le cadavre de l'hôte .....	62
<b>D. Echappement aux défenses immunitaires de l'hôte.....</b>	<b>63</b>
1. Facteurs et mécanismes utilisés par les partenaires nématodes.....	63
2. Facteurs et mécanismes utilisés par les partenaires bactériens .....	66
<b>Conclusion.....</b>	<b>68</b>
<b>III. ETUDE DES BASES MOLECULAIRES DES REPONSES IMMUNITAIRES DES INSECTES AUX COMPLEXES NEMATOBACTERIENS ENTOMOPATHOGENES.....</b>	<b>70</b>



<b>A. Etudes réalisées sur le modèle <i>D. melanogaster</i></b> .....	<b>70</b>
1. Approches transcriptomiques .....	70
2. Approches fonctionnelles.....	72
2. a. Voies signalétiques .....	72
2. b. Protéines de reconnaissance.....	74
2. c. Effecteurs.....	75
<b>B. Etudes réalisées sur différents modèles lépidoptères.....</b>	<b>76</b>
1. Approches transcriptionnelles et fonctionnelles sur le modèle <i>Manduca sexta</i> .....	76
2. Approche transcriptomique sur le modèle <i>Heliothis virescens</i> .....	78
3. Approche transcriptionnelle sur le modèle <i>Spodoptera exigua</i> .....	79
<b>Conclusion.....</b>	<b>80</b>
<b>TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>81</b>
<b>OBJECTIFS ET DEMARCHE.....</b>	<b>82</b>
<b>I. ANALYSE GLOBALE DES REPONSES TRANSCRIPTOMIQUES DES TISSUS IMMUNOCOMPETENTS A L'INFECTION PAR LE CNB.....</b>	<b>83</b>
A. Approche expérimentale.....	83
B. Principaux résultats.....	84
C. Conclusions .....	85
D. Article 1.....	86
<b>II. ANALYSE DETAILLEE DES REPONSES IMMUNITAIRES A L'INFECTION PAR LE CNB ET IDENTIFICATION DE REPONSES PARTENAIRE-SPECIFIQUES .....</b>	<b>128</b>
A. Approche expérimentale.....	128
B. Principaux résultats.....	129
C. Conclusions .....	131
D. Article 2.....	132
<b>III. RECHERCHE DES FONCTIONS DE POTENTIELS NOUVEAUX EFFECTEURS DE L'IMMUNITE FORTEMENT SUREXPRIMES EN REPONSE AU CNB .....</b>	<b>188</b>
<b>A. Matériels et méthodes.....</b>	<b>188</b>
1. Analyse <i>in silico</i> des séquences nucléotidiques .....	188
2. Analyse <i>in silico</i> des séquences protéiques.....	189
3. Production d'UNK1 et de la Cécropine C par synthèse chimique .....	189

4. Production d'UNK4 en système bactérien .....	190
4. a. Synthèse de l'insert .....	190
4. b. Clonage de l'insert dans le vecteur d'expression .....	190
4. c. Transformation de la bactérie productrice .....	191
4. d. Production et purification .....	191
5. Antibiogrammes .....	192
<b>B. Résultats .....</b>	<b>193</b>
1. Analyses <i>in silico</i> des séquences nucléotidiques et protéiques .....	193
1. a. Analyse des séquences nucléotidiques .....	193
1. b. Analyse des séquences protéiques .....	194
2. Evaluation <i>in vitro</i> des activités antibactériennes d'UNK1 et UNK4 .....	196
<b>C. Discussion .....</b>	<b>198</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>202</b>
<b>I. APPORTS METHODOLOGIQUES POUR L'ANALYSE DESCRIPTIVE DES REPONSES IMMUNITAIRES DES INSECTES AUX INFECTIONS PAR LES COMPLEXES NEMATOBACTERIENS ENTOMOPATHOGENES .....</b>	<b>203</b>
A. Analyse topologique des réponses transcriptomiques à l'infection par le complexe nématobactérien .....	204
B. Analyse comparative des réponses transcriptionnelles induites par chaque partenaire .....	206
<b>II. APPORTS DE L'ANALYSE DESCRIPTIVE POUR L'ETUDE DETAILLEE DU DIALOGUE MOLECULAIRE ENTRE LE SYSTEME IMMUNITAIRE DE <i>S. FRUGIPERDA</i> ET LE COMPLEXE <i>S. CARPOCAPSAE-X. NEMATOPHILA</i> .....</b>	<b>208</b>
A. Pistes de travail pour la caractérisation moléculaire de la réponse immunitaire .....	208
B. Pistes de travail pour l'étude des stratégies d'échappement immunitaire du complexe nématobactérien .....	211
<b>III. PISTES DE REFLEXION ET PERSPECTIVES OUVERTES PAR L'AMORÇAGE DE LA CARACTERISATION DU CLUSTER DES <i>UNKNOWN</i>S .....</b>	<b>212</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>216</b>
ABREVIATIONS .....	254
LISTE TABLEAUX ET FIGURES .....	257

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## Préambule

Les complexes nématobactériens (CNBs) entomopathogènes sont des associations naturelles symbiotiques et mutualistes entre des nématodes et des bactéries, qui coopèrent pour infecter et tuer les insectes afin de se développer dans leurs cadavres. En raison de leur originalité et de leur potentiel dans le cadre de la lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures, ces pathogènes ont été fortement étudiés depuis leur découverte en 1923. Les travaux réalisés ont permis d'explorer la diversité des CNBs, ainsi que leurs écologies, comportements et mécanismes d'interaction avec leurs hôtes insectes. Ils ont notamment montré que l'un des aspects majeurs déterminant le succès ou l'échec du parasitisme est leur confrontation aux défenses immunitaires de l'hôte. L'issue de cette confrontation dépend de nombreux facteurs, incluant les stratégies d'échappement immunitaire mises en œuvre par les deux partenaires du CNB, mais aussi l'espèce et le stade de développement de l'hôte. Les causes précises de ces variations sont encore inconnues, notamment en raison d'une méconnaissance des aspects signalétiques et moléculaires des réponses immunitaires que les insectes opposent à ces infections duales. L'objectif du présent travail est de participer au développement de cette connaissance au travers d'une description topologique et moléculaire des réponses immunitaires induites chez la larve d'un hôte lépidoptère face à l'infection par l'un des CNBs les plus étudiés, l'association *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*. Ce travail nécessite en premier lieu une connaissance détaillée du fonctionnement global du système immunitaire des insectes ainsi que de ses bases moléculaires. C'est donc à ces aspects qu'est consacrée la première et majeure partie de mon introduction bibliographique. Dans un second temps, et afin de resituer mes objectifs de thèse dans leur contexte scientifique, je présenterai différents aspects de l'étude des CNBs entomopathogènes et de leurs interactions avec les insectes, en terminant par les précédents travaux de description et de caractérisation moléculaires des réponses immunitaires d'autres modèles d'insectes vis-à-vis des CNBs entomopathogènes.

## **I. Le système immunitaire des insectes et ses bases moléculaires**

Dans leurs environnements, les insectes sont fréquemment confrontés à une grande diversité d'agents infectieux, incluant des virus, des bactéries, des champignons et levures, des protozoaires, mais aussi des métazoaires parasites et parasitoïdes. Pour s'en protéger, ils possèdent un système immunitaire élaboré, dont la remarquable efficacité intrigue depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Ce système repose tout d'abord sur des barrières physiques et chimiques externes, qui protègent des blessures et des infections (Andersen, 2010 ; Wu *et al.*, 2010 ; Ferrandon, 2013). Il repose ensuite sur une mobilisation rapide de réponses cellulaires et humorales locales principalement mises en œuvre par les hémocytes, les cellules immunitaires circulantes (Strand, 2008 ; Krautz *et al.*, 2014). La dernière ligne de défense est généralement la libération massive de divers effecteurs antimicrobiens dans l'hémocoèle (cavité interne de l'insecte) par les cellules du corps gras, un organe central du métabolisme des insectes (Ferrandon *et al.*, 2007 ; Arrese and Soulages, 2010 ; Viljakainen, 2015). Enfin et spécifiquement dans le cadre des réponses antivirales, les insectes peuvent également utiliser l'ARN interférence pour dégrader les acides nucléiques viraux de façon locale et systémique (Karlikow *et al.*, 2014 ; Tassetto *et al.*, 2017). Chacune de ces composantes principales de l'immunité est associée à divers mécanismes de défense, dont la caractérisation moléculaire et signalétique a été amorcée sur une ou quelques espèces modèles. Dans cette première partie, j'effectue une synthèse de l'ensemble des données disponibles sur ce système, en combinant descriptions globales des acteurs et réponses conservés de l'immunité des insectes, et descriptions détaillées des aspects moléculaires et signalétiques décrits chez ces espèces modèles.

### **A. Premières barrières aux infections**

Les épithéliums de surface sont les premiers tissus confrontés aux blessures, aux infections opportunistes et aux pathogènes présents dans l'environnement. Chez les insectes, la protection de ces épithéliums est assurée par une combinaison de barrières physiques, chimiques et mécaniques, auxquelles viennent s'ajouter des processus de réparation très efficaces. D'après l'état actuel de nos connaissances, ces défenses peuvent être regroupées en deux grandes catégories : celles qui sont associées aux épithéliums d'origine ectodermique et celles qui sont associées à l'épithélium de l'intestin moyen. Les épithéliums d'origine

ectodermique recouvrent la grande majorité des zones d'interface avec le milieu extérieur. Ils incluent l'épiderme, les épithéliums des voies respiratoires et génitales, et ceux des parties antérieure et postérieure de l'intestin (Chen *et al.*, 2005 ; Moussian, 2013). Les défenses protégeant ces épithéliums présentent de nombreux points communs, et l'état actuel de nos connaissances ne permet pas encore de les subdiviser de façon claire en sous-catégories. L'épithélium de l'intestin moyen, d'origine endodermique, est quant à lui protégé par des barrières et mécanismes particuliers. Ces particularités sont étroitement liées à ses fonctions digestives et à ses interactions privilégiées avec les microorganismes intestinaux (Ferrandon, 2013 ; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018).

## **1. Défenses des épithéliums d'origine ectodermique**

### **1. a. Barrière cuticulaire**

Les épithéliums d'origine ectodermique sont tout d'abord protégés par une barrière physique, la cuticule, qui recouvre l'ensemble de l'épiderme, ainsi que la majeure partie des voies respiratoires et génitales et les épithéliums des intestins antérieur et postérieur (Ferrandon, 2013 ; Chauvin and Kristensen, 2012). Elle est majoritairement synthétisée par les épithéliums sous-jacents (Andersen, 2009) et peut être subdivisée en trois parties. La partie la plus externe est l'épicuticule. Elle est majoritairement constituée de lipoprotéines sclérotinisées (reliées entre elles par des liaisons covalentes) et est surmontée d'une couche de cire qui l'imperméabilise (Chauvin and Kristensen, 2012 ; Riddiford, 2009). La partie intermédiaire, l'exocuticule, et la partie la plus interne, l'endocuticule, sont constituées d'un maillage de fibres de chitine et de diverses protéines cuticulaires (Andersen *et al.*, 1995). L'agencement et la composition des constituants de l'exocuticule, ainsi que son degré de sclérotinisation varient en fonction du stade de développement et des régions du corps de l'insecte, de manière à permettre sa mobilité tout en le protégeant des blessures (Andersen *et al.*, 1995).

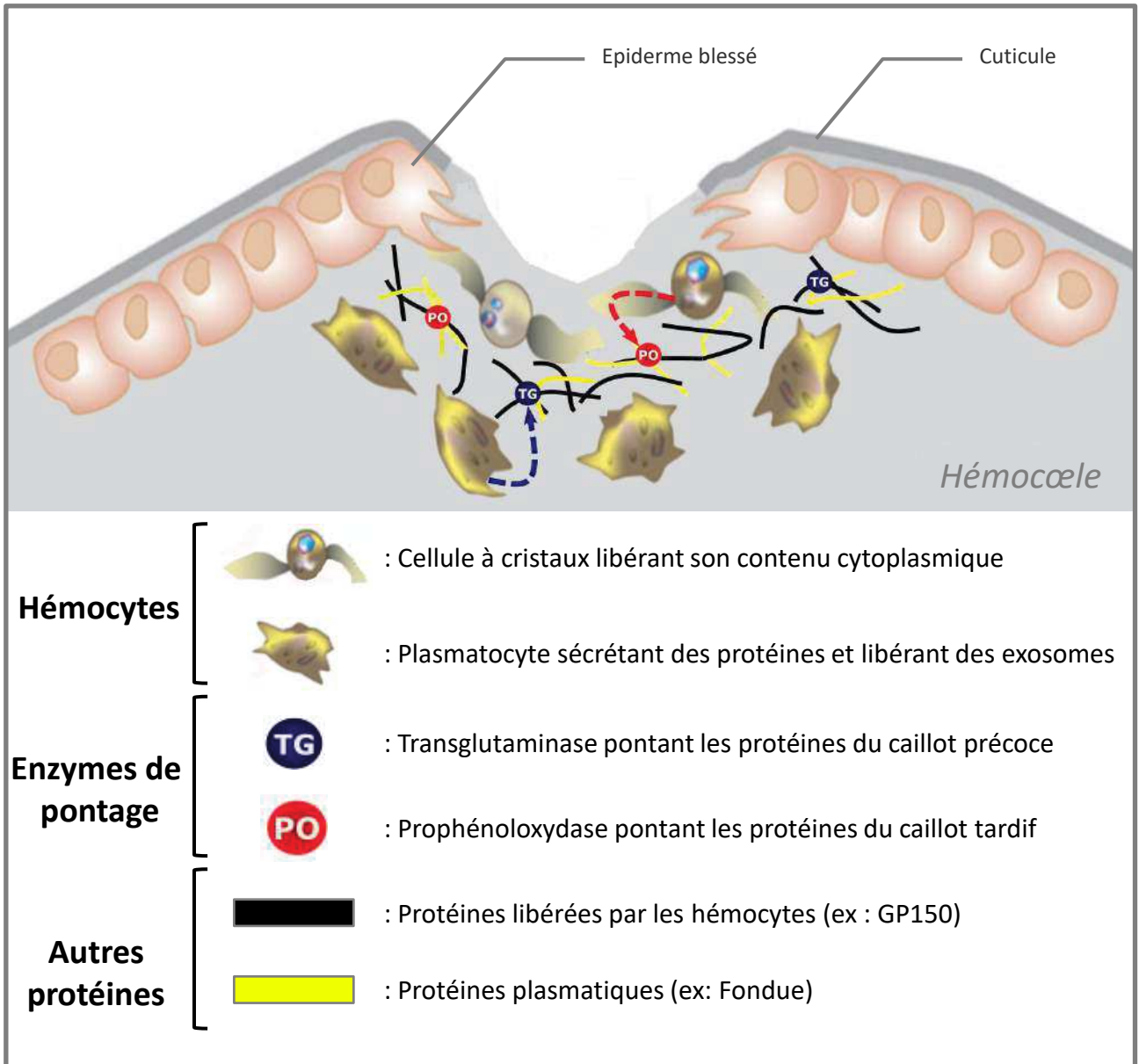
### **1. b. Synthèse de peptides antimicrobiens**

Un autre moyen de défense mis en œuvre par les épithéliums d'origine ectodermique est la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) dans le milieu extérieur. Des travaux réalisés chez le modèle diptère *Drosophila melanogaster* montrent que des PAMs peuvent être produits au niveau de chacun de ces épithéliums (Tzou *et al.*, 2000 ; Tingvall *et al.*, 2001), ce

qui semble cohérent par rapport à des observations réalisées chez d'autres espèces et ordres d'insectes (Brey *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017). Les PAMs sont généralement des peptides cationiques de taille inférieure à 50 acides aminés agissant par déstabilisation des membranes bactériennes (Zhang and Gallo, 2016). Chez les insectes, ils peuvent également présenter des tailles plus importantes et des modes d'action plus complexes, ainsi que des activités antivirales, antifongiques et antiparasitaires (voir section C/2. a.) (Yi *et al.*, 2014). Dans le cas du modèle *D. melanogaster*, chaque épithélium d'interface produit un groupe spécifique de PAMs dont l'expression basale ou inductible dépend essentiellement de la voie signalétique Imd, principalement connue pour son rôle dans l'induction des réponses humorales systémiques au niveau du corps gras (voir section C/1. a.) (Tzou *et al.*, 2000 ; Tingvall *et al.*, 2001). Tandis que la majorité des épithéliums ne semblent synthétiser qu'une ou deux familles de PAMs sur les sept identifiées chez *D. melanogaster*, certaines régions, comme le tractus génital femelle et le cardia dans l'intestin antérieur, peuvent en exprimer jusqu'à cinq (Tzou *et al.*, 2000 ; Tingvall *et al.*, 2001).

### 1. c. Coagulation

Les insectes possédant un système circulatoire ouvert, toute blessure des épithéliums de surface conduit à une fuite d'hémolymphe ainsi qu'à un important risque infectieux. Pour s'en protéger, ils disposent tout d'abord d'un mécanisme de coagulation efficace (Krautz *et al.*, 2014), dont la description détaillée a été amorcée chez *D. melanogaster* (Figure 1). Dans le cas de ce modèle, la coagulation se met en place dans les quinze premières minutes après blessure de l'épiderme (Galko and Krasnow, 2004). Elle débute par une capture d'hémocytes circulants par adhérence aux tissus lésés (Babcock *et al.*, 2008). Les hémocytes libèrent ensuite différentes protéines par sécrétion (ex : Hémolectine, GP150), émission d'exosomes (ex : Transglutaminase) ou par lyse cellulaire (ex : Prophénoloxydase) (voir section B/2. b.) (Schmid *et al.*, 2019). Les protéines libérées s'organisent sous forme de fibres avec diverses protéines plasmatiques, telles que Fondue, la Lipophorine et des Hexamérines, ce qui permet de piéger les hémocytes et les éventuels pathogènes présents sur le site lésé et de commencer à combler la brèche (Krautz *et al.*, 2014 ; Lemaître and Hoffman, 2007). Par la suite, la Transglutaminase libérée par les hémocytes forme des liaisons covalentes entre les constituants du caillot, ce qui initie son durcissement. Enfin, la phénoloxydase (PO), qui correspond à la forme maturée de la prophénoloxydase (proPO) libérée par les hémocytes,



**Figure 1 : Principaux constituants du caillot chez *Drosophila melanogaster*.** Figure modifiée de Lemaitre and Hoffmann, 2007.



mélanise la structure (voir sections B/3. a. et B/3. b.), ce qui achève le processus de durcissement du caillot (Galko and Krasnow, 2004 ; Krautz *et al.*, 2014).

#### **1. d. Réparation tissulaire**

En parallèle de la coagulation un processus de réparation se met en place. Chez *D. melanogaster*, la réparation de l'épiderme est initiée dans les trente premières minutes suivant la blessure (Galko and Krasnow, 2004). Elle débute par un détachement de la cuticule des cellules épithéliales situées sur le pourtour de la blessure, et par un allongement de ces cellules en direction du centre de la lésion (Galko and Krasnow, 2004 ; Tsai *et al.*, 2018). Suivant le stade de développement de l'insecte et le diamètre de la blessure, cet allongement peut s'accompagner de la formation d'un anneau d'actomyosine entre les cellules, qui crée une force contractile permettant de coordonner leurs migrations (Belacortu *et al.*, 2011 ; Tsai *et al.*, 2018). Après environ une heure, les cellules fusionnent et forment un syncytium autour de la blessure, puis des projections cellulaires de types lamellipode et filopode sont émises en direction du centre de la lésion. Ces projections s'intercalent de part et d'autre de la zone lésée, et fusionnent pour rétablir la continuité épithéliale environ dix heures après blessure (Galko and Krasnow, 2004 ; Tsai *et al.*, 2018 ). Dans les 24 heures après blessure, les cellules synthétisent une nouvelle cuticule très épaisse, rétablissant ainsi totalement l'intégrité de la barrière (Galko and Krasnow, 2004). Ce processus de réparation est finement régulé par diverses voies de développement et de réponse au stress impliquées dans les remaniements du cytosquelette d'actine (voies JNK et Hippo, axes Stit/Src et Pvf1/Pvr) (Wu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009 ; Brock *et al.*, 2012 ; Tsarouhas *et al.*, 2014 ; Tsai *et al.*, 2017), de la matrice extracellulaire (voie JNK) (Stevens and Mc-Caw, 2012), dans la régulation des interactions cellule-cellule et de la fusion cellulaire (voie Jak-Stat) (Lee *et al.*, 2017) ainsi que dans la synthèse de la cuticule (voie JNK, axes Stit/Drk/ERK/Grh et Stit/Src42A/Grh) (Galko and Krasnow, 2004 ; Wang *et al.*, 2009 ; Tsarouhas *et al.*, 2014).

## **2. Epithélium de l'intestin moyen**

### **2. a. Matrice péritrophique**

En raison de ses fonctions digestives, l'épithélium de l'intestin moyen est protégé par une barrière physique plus poreuse que la cuticule, la matrice péritrophique (Ferrandon, 2013).

Cette barrière est synthétisée par les cellules épithéliales intestinales, soit tout au long de l'intestin moyen, soit dans une région spécifique de l'intestin, telle que le cardia (extrémité antérieure de l'organe) (Lehane, 1997). Elle est constituée d'un maillage de chitine, de protéines, de glycoprotéines et de protéoglycannes d'une porosité de 2 à 36  $\mu\text{m}$  (Lehane, 1997). En règle générale, le diamètre des pores permet la circulation des nutriments et des enzymes digestives monomériques, tandis que la matrice protège l'intestin de l'abrasion ainsi que du contact avec les microorganismes et de nombreuses toxines (Ferrandon, 2013).

## **2. b. Enzymes digestives et pH intestinal**

L'organe est également protégé par des barrières chimiques inhérentes à son fonctionnement. La première d'entre elles est la sécrétion d'enzymes digestives dans la lumière intestinale. Bien que leurs effets sur les pathogènes n'ait pas été clairement établi, il est probable que certaines d'entre elles s'opposent au maintien et à la croissance d'agents infectieux, par exemple en dégradant leur surface ou leurs facteurs de virulence. Parmi les principales enzymes candidates, on retrouve des lysozymes, qui pourraient dégrader le peptidoglycane bactérien, des  $\beta$ -glucanases et chitinases, qui pourraient dégrader les  $\beta$ -glucanes fongiques, ou encore des pepsines, qui pourraient dégrader des protéines de surface ou sécrétées (Espinoza-Fuentes and Terra, 1987 ; Lemos and Terra, 1991 ; Nayduch and Joyner, 2013 ; Daffre *et al.*, 1994 ; da Silva Moraes *et al.*, 2014). Le pH intestinal, ainsi que ses variations au niveau des différents segments de l'intestin peuvent également constituer une barrière aux infections. Par exemple, le pH très basique (jusqu'à pH 11) de l'intestin moyen de divers lépidoptères, qui permet la digestion des tannins, inhibe la croissance de la plupart des bactéries (Appel and Martin, 1990 ; Engel and Moran, 2013). Au contraire, chez *D. melanogaster*, c'est le pH acide (pH 2 à pH 4) de la région médiane de l'intestin moyen qui constitue un frein à la croissance bactérienne tout en favorisant l'absorption des métaux (Overend *et al.*, 2016 ; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018).

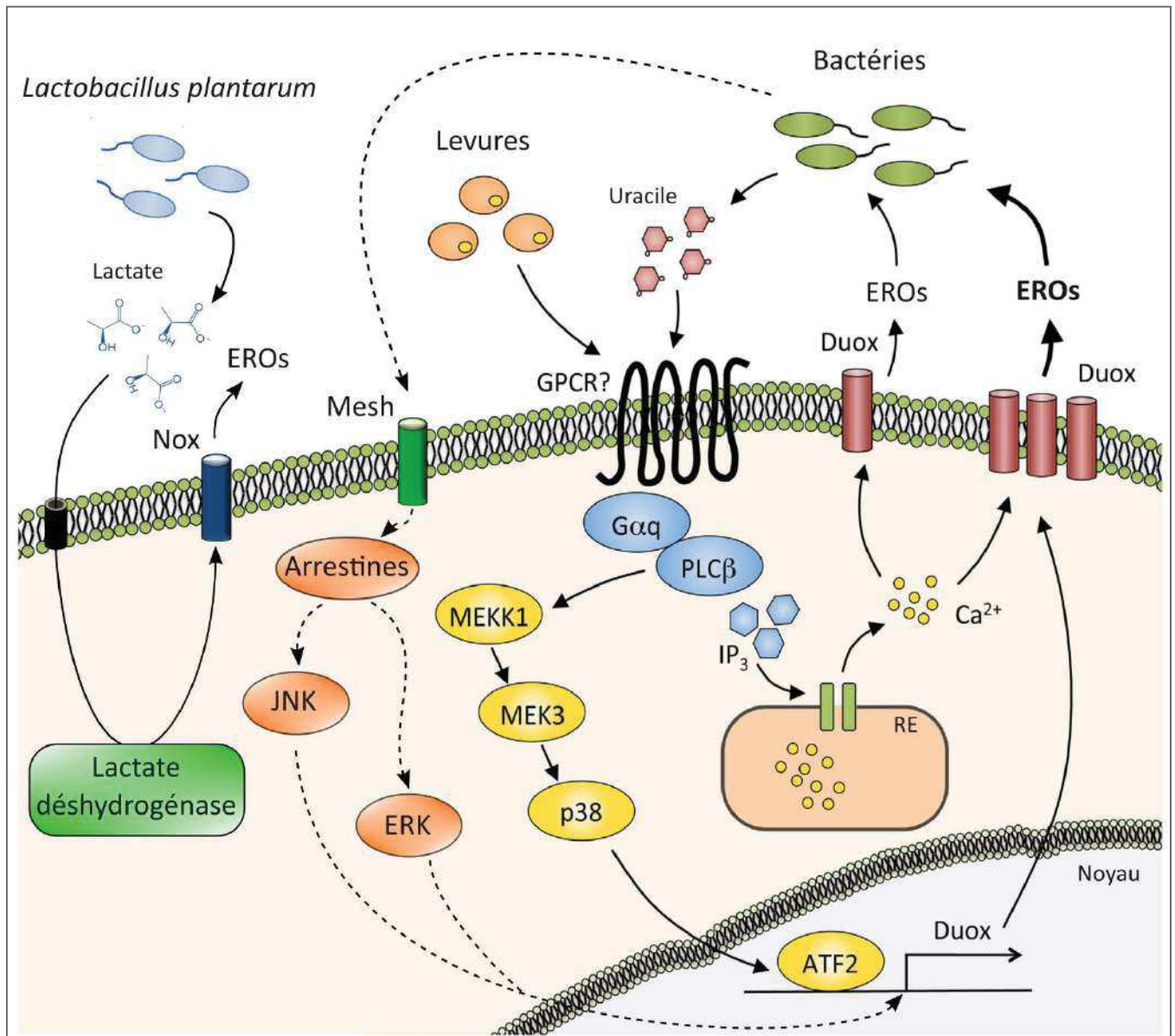
## **2. c. Synthèse d'espèces réactives de l'oxygène**

Une autre barrière chimique protégeant l'épithélium de l'intestin moyen est la production d'espèces réactives de l'oxygène dans la lumière intestinale (Diaz-Albiter *et al.*, 2012 ; Oliveira *et al.*, 2013 ; Hu *et al.*, 2013). Chez *D. melanogaster* (Figure 2), la production de ces molécules

est assurée par les NADPH oxydases NOX et DUOX, qui sont localisées à la membrane des entérocytes (Ha *et al.*, 2009a, 2009b ; Xiao *et al.*, 2017 ; Lee *et al.*, 2013).

En l'absence d'infection, l'activité de NOX est constamment stimulée par l'acide lactique libéré par des bactéries commensales telles que *Lactobacillus plantarum*. Cette activation dépend de l'oxydation de l'acide lactique par une lactate déshydrogénase présente dans les entérocytes, qui génère du NADH utilisé comme agent réducteur par NOX (Figure 2) (Iatsenko *et al.*, 2018).

DUOX est quant à elle régulée par des mécanismes complexes, permettant d'adapter son activité ainsi que son expression à la charge du microbiote, à la présence de levures alimentaires et à la présence de pathogènes. L'activité de DUOX dépend tout d'abord de la quantité d'uracile que les bactéries libèrent dans la lumière intestinale (Kuraishi *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2013). Cet uracile, qui est probablement reconnu par un récepteur couplé à une protéine G (GPCR), induit une activation de la Phospholipase C au sein des entérocytes. La Phospholipase C produit de l'inositol-1,4,5-trisphosphate, à l'origine d'une libération de calcium par le réticulum endoplasmique, qui stimule l'activité enzymatique de DUOX (Ha *et al.*, 2009a). La faible production d'uracile par la majorité des symbiotes intestinaux de l'insecte permet de maintenir cette voie à un faible niveau d'activation en l'absence de pathogène. En revanche, la forte production d'uracile par de nombreuses bactéries pathogènes stimule son activité (Lee *et al.*, 2013). L'expression de DUOX est induite via un axe impliquant la protéine membranaire Mesh, les Arrestines et les voies des MAP kinases JNK et ERK. Cette voie permet d'adapter finement le niveau d'expression de DUOX aux fluctuations de la charge bactérienne dans l'intestin (Xiao *et al.*, 2017). En cas d'infection bactérienne, l'activation de la voie Imd et la production d'uracile bactérien induisent l'activation additionnelle de la voie des MAP kinases MEKK1/MKK3/p38. Cette voie active le facteur de transcription ATF2, qui induit l'expression de DUOX (Ha *et al.*, 2009b ; Lee *et al.*, 2013). Les augmentations conjointes de l'expression et de l'activité de DUOX conduisent à une forte production d'espèces réactives de l'oxygène entre une et quatre heures après ingestion de bactéries pathogènes (Lee *et al.*, 2013) (Figure 2).



**Figure 2 : Voies d'induction de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'intestin moyen de *Drosophila melanogaster*.** Figure modifiée de Kuraishi *et al.*, 2013. Les flèches en pointillés indiquent que la caractérisation de la voie est incomplète.

## 2. d. Synthèse de peptides antimicrobiens

La quatrième barrière chimique aux infections est l'expression et la sécrétion constitutive ou inductible de PAMs dans la lumière intestinale par les entérocytes (Tzou *et al.*, 2000 ; Hamilton *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2010 ; Vieira *et al.*, 2016).

Les mécanismes régulant leur expression ont été étudiés de façon détaillée chez le modèle *D. melanogaster*. Comme au niveau des autres épithéliums d'interface chez ce modèle, l'expression de PAMs dans l'intestin moyen dépend essentiellement de l'activation de la voie signalétique Imd (Tzou *et al.*, 2000). Au niveau de l'intestin moyen, cette voie est activée par la protéine de liaison au peptidoglycane cytosolique PGRP-LE (Ferrandon, 2013). PGRP-LE reconnaît des fragments de peptidoglycane de type DAP. Le peptidoglycane est constitué de chaînes de polymères d'acide N-acétylmuramique et de N-acétylglucosamine reliés entre elles par des chaînes peptidiques de 4 acides aminés. Le peptidoglycane de type DAP est caractérisé par la présence d'un acide diaminopymélique en troisième position de la chaîne et est principalement retrouvé chez les bactéries à Gram négative et chez certains bacilles à Gram positive (Kurata, 2014). Une fois lié à un fragment de peptidoglycane, PGRP-LE interagit avec la protéine adaptatrice Imd, ce qui initie une cascade signalétique intracellulaire (voir section C/1. a.) aboutissant à la translocation du facteur de transcription Relish dans le noyau cellulaire (Ferrandon, 2013). Dans le noyau, Relish se fixe sur des motifs d'ADN  $\kappa$ B en amont de gènes immunitaires, pour induire leurs expressions (Tzou *et al.*, 2000). Dans le cas de l'intestin moyen, il induit notamment l'expression du PAM Diptéricine, qui présente des activités contre les bactéries à Gram négative (Tzou *et al.*, 2000 ; Uvell and Engström, 2007). Dans des conditions basales, le niveau d'activation de cette voie est faible, ce qui permet de tolérer la présence du microbiote intestinal. Cette faible induction résulte tout d'abord de la localisation intracellulaire de PGRP-LE, dont l'activation nécessite donc un transport de petits fragments de peptidoglycane vers l'intérieur des entérocytes. Elle résulte d'autre part de l'action de divers régulateurs. La voie est tout d'abord régulée négativement par la PGRP à domaine amidasique PGRP-LB, qui clive le peptidoglycane de manière à empêcher sa reconnaissance par PGRP-LE. L'activation de la voie est également inhibée par le régulateur Pirk, qui se fixe sur Imd et PGRP-LE, et empêche l'interaction entre les deux protéines. Dans la partie postérieure de l'intestin moyen, l'expression des PAMs est également réprimée par le régulateur transcriptionnel Caudal, qui n'a en revanche pas d'effet sur l'expression des

régulateurs PGRP-LB et Pirk. En cas de surcharge bactérienne dans la lumière intestinale, le niveau d'activation de la voie est tel que la réponse s'amplifie malgré la présence de ces régulateurs (Ferrandon, 2013).

Ces mécanismes d'induction et de régulation pourraient toutefois ne pas être généralisables à d'autres espèces d'insectes. Il a en effet été montré chez le lépidoptère *Bombyx mori* que les niveaux d'induction des PAMs dans l'intestin moyen suivaient la même dynamique que ceux de membres des voies Imd, Toll et Jak-Stat (Wu *et al.*, 2010). La voie Toll étant la seconde voie impliquée dans l'induction de l'expression des PAMs lors des réponses systémiques (voir section C/1. c.) et la voie Jak-Stat participant également à l'induction de gènes immunitaires chez *D. melanogaster* (Lagueux *et al.*, 2000 ; Ferrandon *et al.*, 2007), les auteurs ont émis l'hypothèse d'une coopération de ces trois voies dans l'induction de l'expression des PAMs au niveau intestinal. Dans le cas de *B. mori*, cette induction débiterait généralement dans les quatre heures après ingestion de bactéries à Gram négative ou à Gram positive (Wu *et al.*, 2010).

## **2. e. Contraction des muscles viscéraux**

L'intestin moyen peut également être protégé par un mécanisme récemment mis en évidence chez *D. melanogaster* (Du *et al.*, 2016), qui permet d'expulser par défécation les bactéries pathogènes, dans les deux premières heures après ingestion (Du *et al.*, 2016 ; Benguettat *et al.*, 2018). Ce processus est étroitement lié à l'activité de DUOX et à sa stimulation par l'uracile bactérien. Une fois activée, DUOX produit une importante quantité de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), dont une partie est transformée en acide hypochloreux (HOCl) par son domaine d'homologie aux peroxydases (Du *et al.*, 2016). Les molécules d'HOCl sont ensuite reconnues par le récepteur TRPA1 (isoforme (A)10b), au niveau de la membrane apicale d'une population de cellules entéroendocrines de l'intestin moyen antérieur (Du *et al.*, 2016 ; Benguettat *et al.*, 2018). Suite à cette interaction, un influx de calcium active la libération de l'hormone diurétique DH31 par les cellules entéroendocrines, du côté basal de l'épithélium. DH31 est alors reconnue par son récepteur DH31-R au niveau des muscles longitudinaux bordant la face interne de l'épithélium, ce qui induit leur contraction (Benguettat *et al.*, 2018). Contrairement au péristaltisme intestinal, qui implique des contractions répétées des muscles viscéraux circulaires, ce processus conduit à un raccourcissement de l'intestin moyen, qui se rétracte sur lui-même. Ce phénomène aboutit à une augmentation de la fréquence des

défécations et à une réduction importante de la quantité de bactéries présentes dans le bol alimentaire (Du *et al.*, 2016 ; Benguettat *et al.*, 2018).

## **2. f. Extrusion cytoplasmique**

Dans le cas où les barrières citées précédemment n'empêcheraient pas l'invasion par des pathogènes et/ou la diffusion de leurs toxines jusqu'à l'épithélium, d'autres mécanismes de protection sont directement mis en œuvre au niveau épithélial. Tout d'abord, en cas d'atteintes par des toxines, il a été montré chez *D. melanogaster* que les entérocytes sont capables de relarguer une grande partie de leur cytoplasme dans la lumière intestinale. Ce processus d'extrusion cytoplasmique permet d'éliminer les organites endommagés, les toxines et les éventuels pathogènes intracellulaires dans les trois heures après ingestion d'une toxine formant des pores, sans rupture de la continuité épithéliale. Après un amincissement considérable de l'épithélium, il retrouve son aspect normal dans les 24 heures, sans nécessité de régénération tissulaire. Les mécanismes moléculaires régissant ce processus sont encore à l'étude, mais il a été montré que la cycline J et les petites protéines sécrétées What else, La costa et CG34212 sont impliquées dans la récupération de l'épithélium après amincissement (Lee *et al.*, 2016).

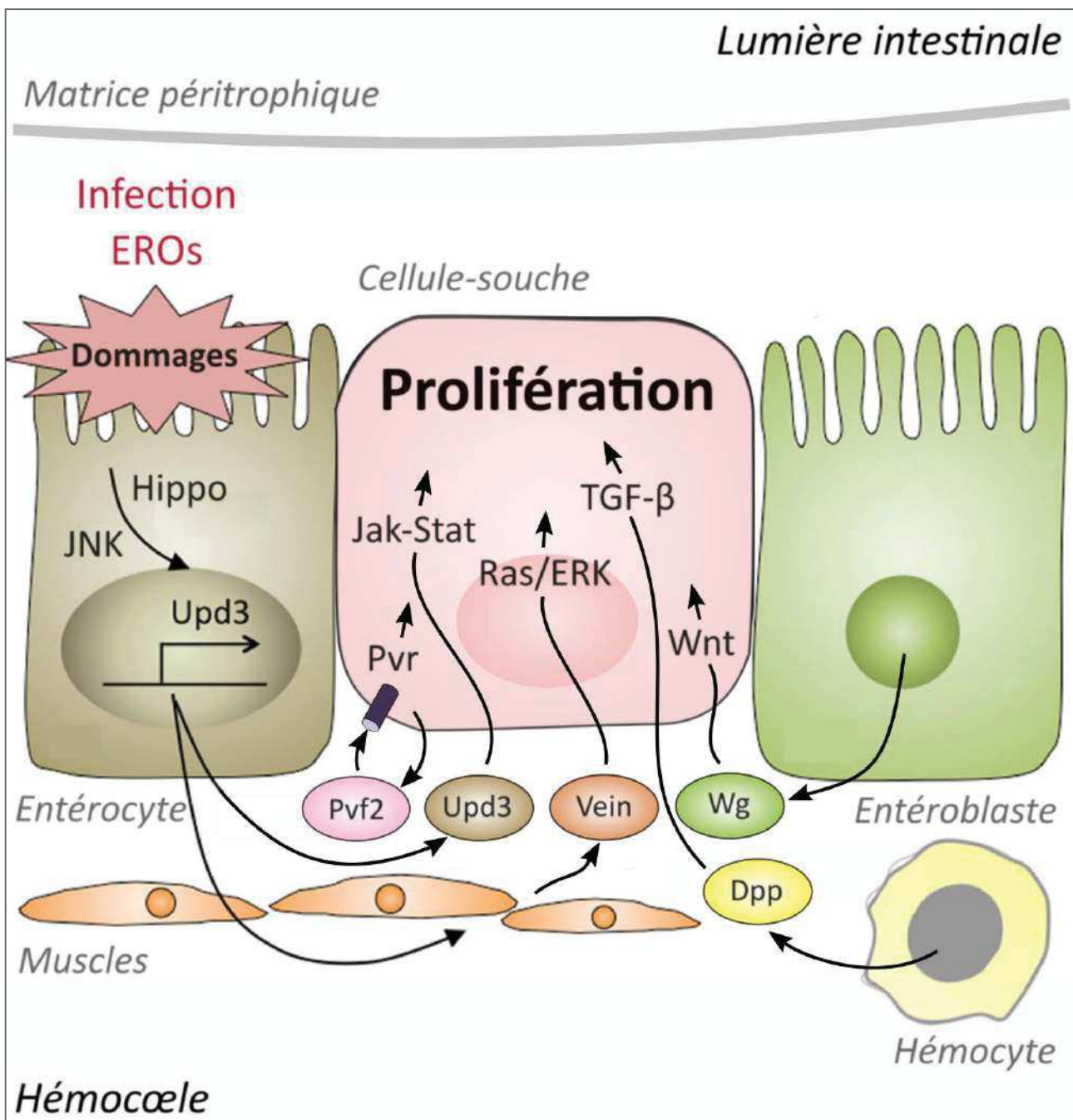
## **2. g. Régénération tissulaire**

Le dernier mécanisme de protection de l'épithélium est la régénération tissulaire, qui a été très étudiée chez la Drosophile adulte. Dans le cas de cet insecte, l'épithélium de l'intestin moyen est constitué d'une majorité d'entérocytes, qui assurent la plupart des fonctions digestives et immunitaires de l'organe. Il comprend également des cellules entéroendocrines sécrétrices d'hormones, ainsi que des cellules souches intestinales (ISCs) et des entéroblastes, qui permettent le renouvellement de l'épithélium (Ferrandon, 2013 ; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018). Chez une Drosophile en bonne santé, les ISCs se divisent fréquemment, permettant un renouvellement complet de l'épithélium en environ sept jours (Amcheslavsky *et al.*, 2009). Ce renouvellement est contrôlé par des voies signalétiques telles que JNK, Jak-Stat, Wnt, Hippo, TGF- $\beta$ , TOR et la voie du récepteur à l'Insuline, ainsi que par des régulateurs transcriptionnels comme Escargot, GATAe, Daughterless et Charlatan. En règle générale, les ISCs se divisent de façon asymétrique pour donner d'une part une nouvelle ISC et d'autre part un entéroblaste, qui peut ensuite se différencier en entérocyte ou en cellule entéroendocrine. Les signaux

impliqués dans la différenciation en entérocyte incluent une stimulation des voies Notch et Jak-Stat, ainsi qu'une activation des facteurs de transcription Hindsight et Sox21a au sein de l'entéroblaste. Les signaux impliqués dans la différenciation en cellule entéroendocrine incluent une expression du facteur de transcription Prospero dans les ISC, ainsi qu'une faible sécrétion de la glycoprotéine Slit par les cellules entéroendocrines déjà différenciées (Liu and Jin, 2017 ; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018).

En cas de rupture de l'intégrité épithéliale, par exemple après blessure ou suite à des apoptoses et délaminations d'entérocytes endommagés, la continuité de l'épithélium peut être rapidement rétablie via une accélération du processus de renouvellement, dont la vitesse peut être multipliée par 20 (Ferrandon, 2013 ; Amcheslavsky *et al.*, 2009). L'intensification de la prolifération des ISCs repose sur l'intégration de signaux additionnels en provenance des entérocytes lésés et des entéroblastes, mais aussi d'autres tissus environnants, incluant les muscles viscéraux et les hémocytes (Figure 3) (Ayyaz *et al.*, 2015 ; Chakrabarti *et al.*, 2016 ; Liu and Jin, 2017). En réponse à des signaux de danger (ex : tissus lésés, espèces réactives de l'oxygène), les voies Hippo et JNK sont tout d'abord activées dans les entérocytes, et induisent la libération de la cytokine activatrice de la voie Jak-Stat Unpaired 3 (Upd3). L'activation de la voie Jak-Stat dans les muscles viscéraux en réponse à Upd3 induit la libération de Vein, une cytokine activatrice de la voie du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), par les cellules musculaires. En parallèle, la perception de dommages induit la libération de la cytokine activatrice de la voie Wnt Wingless (Wg) par les entéroblastes. En réponse à l'ensemble de ces cytokines, les voies Jak-Stat, Wnt et l'axe EGFR/Ras/MAPK sont activés dans les ISCs, ce qui stimule leurs activités mitotiques (Kuraishi *et al.*, 2013 ; Liu and Jin, 2017). Les hémocytes recrutés au niveau de la lésion participent à cette induction via la sécrétion de cytokines pro-prolifératives, telles des cytokines Upd ou encore Decapentaplegic (Dpp), qui appartient à la voie du TGF- $\beta$  (Ayyaz *et al.*, 2015 ; Chakrabarti *et al.*, 2016). Enfin, une boucle autocrine impliquant la cytokine PDEF and VGEF-related factor 2 (Pvf2) et son récepteur Pvr au niveau des ISCs, contribue également à l'accélération de leur renouvellement (Liu and Jin, 2017).





**Figure 3 : Voies signalétiques induisant la régénération de l'épithélium de l'intestin moyen en réponse à un danger chez *Drosophila melanogaster*.** Figure modifiée de Kuraishi *et al.*, 2013.

## B. Réponses cellulaires et humorales localisées

Lorsque les défenses locales échouent à protéger l'insecte, les hémocytes constituent la seconde ligne de défense face aux infections. Suivant le type de pathogène rencontré, les hémocytes peuvent tout d'abord mettre en œuvre différentes réponses cellulaires. La première d'entre elle est la phagocytose, un processus conservé permettant l'internalisation et l'élimination de particules de tailles supérieures à 0,5  $\mu\text{m}$ , telles que des bactéries ou des levures, dans un phagolysosome (Rosales and Uribe-Querol, 2017). La seconde est la nodulation, qui permet de piéger des amas entiers de bactéries via des agrégations d'hémocytes. La troisième est l'encapsulation, un processus très similaire à la nodulation qui permet d'éliminer des particules ou pathogènes de grandes tailles. De plus, certains hémocytes jouent un rôle crucial dans la production d'une réponse humorale quasi-constitutive appelée la mélanisation, qui participe au piégeage et à l'élimination des pathogènes dans différents contextes (Strand, 2008). Ces réponses sont assurées par différents types d'hémocytes dont la production dépend du stade développemental et du statut physiologique de l'insecte, et dont le recrutement et l'activation dépendent de l'intégration de divers signaux (Banerjee *et al.*, 2019). Dans cette deuxième partie, je commencerai donc par décrire les processus de production, de recrutement et d'activation des différents types d'hémocytes, avant de présenter de façon détaillée les réponses qu'ils peuvent mettre en œuvre face à différents types de pathogènes.

### 1. Hématopoïèse

Il existe une grande diversité de types d'hémocytes, dont le nombre et la nature peuvent varier en fonction de l'espèce d'insecte considérée (Hillyer, 2016). En règle générale, les insectes produisent au moins trois types d'hémocytes, qui sont associés à des fonctions immunitaires relativement bien conservées. Le premier d'entre eux, qui est souvent majoritaire, assure essentiellement des fonctions phagocytaires. Ces hémocytes sont généralement nommés granulocytes, sauf dans le cas de *D. melanogaster*, chez laquelle ils sont appelés plasmacytes. Le second type d'hémocytes, qui correspond généralement aux plasmacytes, ou aux lamellocytes chez *D. melanogaster*, est principalement caractérisé par ses capacités d'étalement, qui sont essentielles aux processus de nodulation et d'encapsulation. Enfin, le troisième type d'hémocytes est celui des œnocytoïdes, ou cellules à

cristaux chez *D. melanogaster*. Ces cellules ont pour principales fonctions de stocker et de transporter la proPO, qui est essentielle à l'induction de processus de mélanisation au niveau de foyers infectieux ou de blessures (Strand, 2008 ; Hillyer, 2016). La capacité d'un insecte à répondre de façon rapide et appropriée à un pathogène dépend en partie de sa capacité à produire ces différents types d'hémocytes de façon basale ou inductible. Dans cette section, je présenterai donc les modes de production de ces cellules, en fonction de l'espèce d'insecte considérée et de son stade de développement.

### 1.a. Hématopoïèse chez l'embryon

Chez les insectes, la genèse des hémocytes débute dès le stade embryonnaire, auquel ils participent au développement de l'embryon, mais aussi à sa protection vis-à-vis des blessures (Evans and Wood, 2014 ; Hillyer, 2016).

Ces premiers processus hématopoïétiques ont été étudiés de façon particulièrement détaillée chez *D. melanogaster* (Figure 4). Dans le cas de ce modèle, la première vague de production d'hémocytes débute peu de temps après la gastrulation, à partir du mésoderme procéphalique, dans la partie antérieure de l'embryon (Tepass *et al.* 1994). Elle permet de produire environ 700 plasmatocytes, puis 20 à 30 cellules à cristaux (Tepass *et al.* 1994 ; Lebestky *et al.*, 2000). La différenciation des cellules du mésoderme requiert les activités du facteur de transcription Serpent et de son régulateur négatif U-shaped dans les deux cas. Dans le cas de la différenciation en plasmatocytes, elle requiert en outre les facteurs de transcription Glial cells missing (GCM) et GCM-2, tandis que l'absence de GCM et GCM-2 et la présence du facteur de transcription Lozenge induisent la différenciation en cellules à cristaux (Banerjee *et al.*, 2019). Les plasmatocytes produits migrent et se dispersent ensuite progressivement dans l'embryon en assurant des fonctions phagocytaires (Tepass *et al.* 1994), tandis que les cellules à cristaux se regroupent au niveau du cardia (Lebestky *et al.*, 2000).

Un processus similaire a été observé chez le lépidoptère *Manduca sexta*. Chez ce modèle, les principaux hémocytes produits sont des granulocytes et des plasmatocytes. Seuls les granulocytes sont produits et migrent au cours des premiers stades embryonnaires, en assurant des fonctions phagocytaires et en produisant des constituants de la lame basale. Les plasmatocytes n'apparaissent quant à eux qu'à la fin du développement de l'embryon, au niveau des deuxième et troisième segments thoraciques (Nardi, 2004).

## 1.b. Hématopoïèse chez la larve

Le processus d'hématopoïèse chez la larve a également été très étudié chez *D. melanogaster*. Dans le cas de cet insecte, la génération de nouveaux hémocytes au cours du développement larvaire peut se produire à partir d'hémocytes sessiles, circulants ou bien dans un organe spécialisé appelé la glande de la lymphe, qui est situé sur la face dorsale de la larve (Figure 4) (Banerjee *et al.*, 2019).

Les hémocytes sessiles sont retrouvés dans des poches hématopoïétiques localisées entre l'épiderme et les couches de muscles sous-jacentes. Tout comme les hémocytes circulants, ils sont issus des plasmacytes et cellules à cristaux produits au cours du développement embryonnaire (Vlisidou and Wood, 2015). Chez la larve, ces cellules acquièrent la capacité de se régénérer et les plasmacytes peuvent même se transdifférencier en cellules à cristaux suite à l'activation de la voie Notch, ou en lamellocytes, suite à une surexpression du facteur de transcription Krüppel (Stofanko *et al.*, 2008 ; Leitao and Sucena, 2015). Ces poches sont localisées à proximité de neurones périphériques, qui promeuvent le maintien des hémocytes dans leur compartiment sessile, ainsi que leur prolifération via une libération d'Activine- $\beta$ , un ligand activateur de la voie du TGF- $\beta$  (Makhijani *et al.*, 2017).

La glande de la lymphe est un organe compact constitué de plusieurs lobes, qui produit des hémocytes au cours du développement larvaire, mais n'en libère pas dans la circulation chez une larve en bonne santé (Banerjee *et al.*, 2019). Le lobe antérieur, qui est le mieux décrit, se compose de trois zones principales : le centre signalétique postérieur, qui correspond à un centre régulateur de l'hématopoïèse, la zone médullaire, qui comprend des cellules progénitrices d'hémocytes, et la zone corticale, au sein de laquelle les hémocytes se différencient en plasmacytes, en cellules à cristaux, et plus rarement en lamellocytes (Jung *et al.*, 2005). La principale fonction du centre signalétique postérieur est d'émettre des signaux régulant la production et la différenciation des cellules progénitrices de la zone médullaire. Ces signaux incluent la cytokine Dpp, qui inhibe la génération de cellules progénitrices via la voie Notch. Ils incluent également la cytokine Hedgehog (Hh), qui inhibe leurs différenciations via une activation du facteur de transcription Cubitus interruptus. Le centre émet par ailleurs la cytokine Pvf1, qui se lie à son récepteur Pvr au sein de la zone corticale, ce qui induit l'expression du facteur de croissance Adenosine deaminase growth factor A (Adgf-A), qui régule négativement la différenciation des cellules progénitrices dans la

zone médullaire (Banerjee *et al.*, 2019). D'autres facteurs, tels que les facteurs de transcription U-shaped et Collier, les protéines E-cadhérine, Asrij et Terribly reduced optic lobe (Trol), ainsi que des facteurs liés à la signalisation calcique, inhibent leurs différenciations directement au niveau des zones médullaire et corticale. A l'inverse, la différenciation des cellules progénitrices est induite par la voie du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) ainsi que par la production d'espèces réactives de l'oxygène, via une activation de la voie JNK et du facteur de transcription FOXO. Au niveau de la zone corticale, les facteurs de transcription Serpent et Pannier sont impliqués dans la différenciation des plasmotocytes, tandis que les voies Wnt et Notch et les facteurs de transcription Serpent et Lozange sont impliqués dans la différenciation des cellules à cristaux (Banerjee *et al.*, 2019).

En réponse à une blessure ou à une infection, divers signaux peuvent stimuler la production et la différenciation des hémocytes en circulation ou au sein de la glande de la lymphé (Figure 4). Ces réponses ont été fortement étudiées dans le cadre d'infections par des guêpes parasitoïdes, qui piquent et pondent leurs œufs à l'intérieur des larves de *Drosophile*. Ce type d'infection induit généralement une prolifération d'hémocytes ainsi qu'une forte production de lamellocytes dès 6 heures après infection (Banerjee *et al.*, 2019). Au niveau de la glande de la lymphé, les principales voies signalétiques impliquées sont Toll, JNK et Jak-Stat, ainsi que les voies induites par l'EGFR et le Pvr (Sorrentino *et al.*, 2002 ; Zettervall *et al.*, 2004 ; Sinenko *et al.*, 2012 ; Tokusumi *et al.*, 2009 ; Louradour *et al.*, 2017 ; Tokusumi *et al.*, 2017). Une production d'espèces réactives de l'oxygène dans le centre signalétique postérieur en réponse à la blessure infligée par la guêpe joue également un rôle primordial. Elle promeut d'une part l'activation des voies Toll et de l'EGFR dans l'organe, et réprime d'autre part la voie Notch, ce qui favorise la différenciation en lamellocyte plutôt qu'en cellule à cristaux (Small *et al.*, 2014 ; Louradour *et al.*, 2017). Elle active également la voie de l'EGFR dans les hémocytes circulants, ce qui participe à induire leur différenciation en lamellocytes (Sinenko *et al.*, 2012). Dans le cas d'une infection par injection de bactéries, c'est au contraire la production de plasmotocytes et de cellules à cristaux qui est favorisée. Dans la glande de la lymphé, la production de ces hémocytes est augmentée suite à la rupture des jonctions septées qui relient entre elles les cellules du centre signalétique postérieur. Cette rupture favorise probablement la circulation de signaux pro-prolifératifs vers les cellules progénitrices de la zone médullaire. Une expérience de suractivation des voies de l'immunité humorale Imd et

Toll dans la glande de lymphes suggère que chacune d'entre elles pourrait être responsable de ces pertes d'adhérence, en réponse à la détection d'agents pathogènes (Khadilkar *et al.*, 2017). Ces phénomènes de prolifération et de différenciation sont régulés négativement par un mécanisme dépendant de la protéine membranaire Hemese, qui est spécifiquement exprimée par les hémocytes (Kurucz *et al.*, 2003).

Les processus d'hématopoïèse de la larve ont également été étudiés chez divers modèles lépidoptères. Globalement, les études montrent que la production d'hémocytes peut être initiée à partir de cellules progénitrices ou d'hémocytes circulants, ainsi qu'au niveau d'organes hématopoïétiques, qui en libèrent en permanence *ex vivo* (Akai and Sato, 1971 ; Monpeysson and Beaulaton, 1978 ; Gardiner and Strand, 2000 ; Mangalika *et al.*, 2010 ; Tan *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2013). Il existe 4 organes hématopoïétiques chez les lépidoptères, qui sont localisés à proximité des disques imaginaux (tissus de cellules indifférenciées précurseurs des ailes et des pattes de l'adulte) au niveau du méso- et du métathorax (Monpeysson and Beaulaton, 1978 ; Gardiner and Strand, 2000). Ces organes peuvent soit présenter une structure compacte et contenir principalement des cellules progénitrices, soit présenter une structure réticulée, et contenir des populations séparées de cellules progénitrices et d'hémocytes différenciés (Monpeysson and Beaulaton, 1978). Les hémocytes différenciés incluent des plasmacytes et des granulocytes en proportions variables, ainsi qu'une minorité d'œnoctoïdes et de cellules à sphérules (dont la fonction dans l'immunité est encore incertaine) (Akai and Sato, 1971 ; Monpeysson and Beaulaton, 1978 ; Gardiner and Strand, 2000 ; Liu *et al.*, 2013). La signalisation associée à la production et à la différenciation des hémocytes chez ces modèles est encore mal comprise, mais des études suggèrent qu'une cytokine, le Parasitic Peptide (PP), a un impact négatif sur la production d'hémocytes par les organes hématopoïétiques, tandis que l'insuline, l'hormone de mue 20-hydroxyecdysone et d'autres facteurs plasmatiques de nature inconnue, ont un impact positif (Nakahara *et al.*, 2003 ; Nakahara *et al.*, 2006).

### **1. c. Hématopoïèse chez l'adulte**

L'hématopoïèse chez l'insecte adulte a principalement été documentée pour des modèles diptères, qui ne possèdent pas d'organe hématopoïétique à ce stade (Lanot *et al.*, 2001 ; Grigorian *et al.*, 2011 ; King and Hillyer, 2013). Dans le cas de *D. melanogaster*, la glande de la lymphes est détruite à la fin du développement larvaire, ce qui libère les hémocytes produits

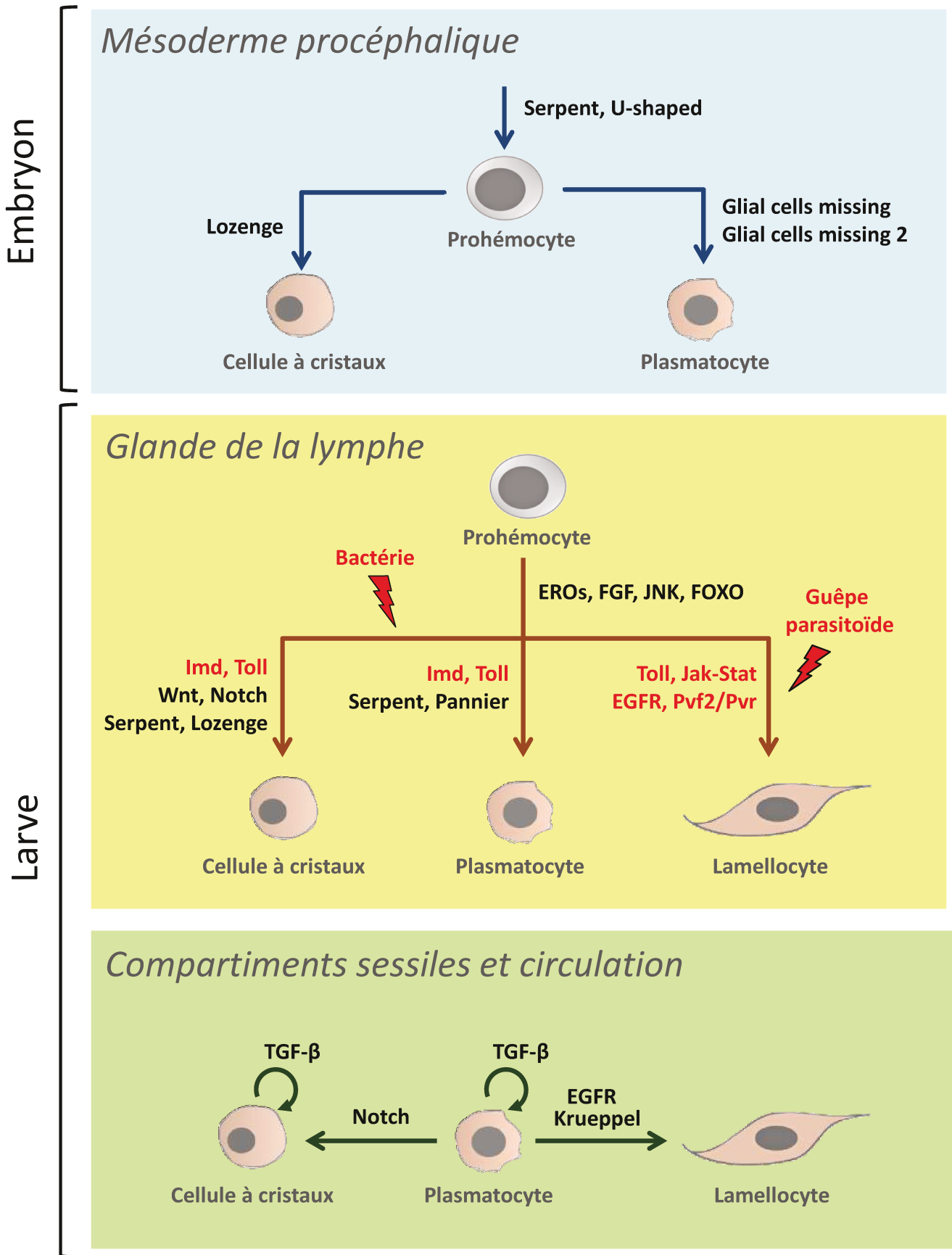


Figure 4: Principaux stimuli, voies signalétiques et facteurs de transcription participant à l'activation de l'hématopoïèse chez l'embryon et la larve de *Drosophila melanogaster*

dans la circulation. Conjointement avec les hémocytes d'origine embryonnaire, ces cellules assurent ensuite diverses fonctions lors de la métamorphose (Lanot *et al.*, 2001 ; Grigorian *et al.*, 2011). Au stade adulte, l'ensemble des populations se maintiennent et passent sous forme sessile ou circulante (Holz *et al.*, 2003 ; Ghosh *et al.*, 2015). Les compartiments sessiles sont localisés au niveau de l'abdomen, à proximité de l'épiderme (Ghosh *et al.*, 2015). Chez l'adulte en bonne santé, les hémocytes sessiles ne se multiplient pas (Lanot *et al.*, 2001). En revanche, il a récemment été montré par marquage à la bromo-désoxy-uridine, que des cellules contenues dans ces compartiments se multiplient après infection bactérienne. Par ailleurs, la présence de cellules indifférenciées au sein de ces compartiments suggère qu'ils pourraient constituer des centres hématopoïétiques uniquement activés après infection (Ghosh *et al.*, 2015).

Dans le cas particulier du moustique *Aedes aegypti*, l'ingestion de sang induit la production par le cerveau d'Insuline, qui régule la digestion et la formation d'œufs mais aussi la prolifération des hémocytes circulants de l'insecte. L'insuline est reconnue par le récepteur Mosquitoe insulin receptor (MIR) présent à la surface des hémocytes matures : les granulocytes et les œnocytoïdes. Cette reconnaissance stimule leurs activités mitotiques et protège l'insecte des infections bactériennes (Castillo *et al.*, 2011). La signalisation intracellulaire en aval de la reconnaissance de l'Insuline n'a pas été décrite pour ce modèle, mais une étude menée chez le moustique *Anopheles gambiae* suggère qu'elle pourrait impliquer des MAP kinases (Bryant and Michel, 2014).

La prolifération d'hémocytes chez l'adulte a également été observée chez le criquet *Locusta migratoria*, au niveau des hémocytes circulants. En revanche, et bien que les orthoptères possèdent encore leur organe hématopoïétique au stade adulte, aucune prolifération cellulaire n'est détectée dans l'organe après challenge immunitaire (Duessa *et al.*, 2015).

## **2. Recrutement et activation des hémocytes**

### **2. a. Processus de recrutement**

Suite à la perception de signaux de danger, tels qu'une infection, des dommages ou encore des cellules tumorales (Evans and Wood, 2014 ; Vlisidou and Wood, 2015), les hémocytes peuvent être recrutés de deux manières : par capture des hémocytes circulants et/ou par rupture des compartiments sessiles avoisinants et migration des hémocytes en direction du



signal. La capture des hémocytes circulants est par exemple observée chez la larve de *D. melanogaster*, en réponse à des blessures épidermiques. Il s'agit d'un mécanisme passif, qui résulte probablement d'une fixation d'hémocytes circulants à des débris cellulaires et/ou à des facteurs plasmatiques déposés sur le site lésé (Babcock *et al.*, 2008).

En revanche, la libération et la migration des hémocytes sessiles est un processus actif, requérant des modifications de morphologie et de propriétés adhésives, ainsi que la perception de signaux chimiotactiques. Seulement quelques facteurs impliqués dans le chimiotactisme ont été identifiés chez les insectes. Les premiers d'entre eux ont été identifiés chez l'embryon de *D. melanogaster*. Au stade embryonnaire, l'épiderme de *D. melanogaster* exprime la NADPH oxydase DUOX, qui libère de l' $H_2O_2$  en réponse aux blessures. Plus précisément, DUOX est activée suite à une libération intracellulaire de calcium initiée sur le pourtour de la blessure, et qui s'étend aux cellules environnantes via un transport d'inisitol-1,4-5-trisphosphate. Ce mode d'activation permet de créer un gradient d' $H_2O_2$  qui s'étend vers la périphérie (Moreira *et al.*, 2010). Par un mécanisme impliquant la Phosphatidylinositol-3-kinase, ainsi que les kinases Src42A et Shark et le récepteur phagocytaire Draper-I, les hémocytes embryonnaires répondent à ce signal en migrant vers la blessure, qu'ils atteignent en quelques minutes (Wood *et al.*, 2006 ; Razzell *et al.*, 2013 ; Evans and Wood, 2014). Ces observations suggèrent que l' $H_2O_2$  pourrait être le médiateur chimiotactique reconnu par les hémocytes. Cependant, une étude récente de modélisation des déplacements spatio-temporels des hémocytes après blessure suggère que, chez la pupa de *D. melanogaster*, le signal chimiotactique perçu par les cellules diffuse plus lentement que l' $H_2O_2$ . Selon les auteurs, l'hypothèse la plus probable est que la fonction de l' $H_2O_2$  soit de permettre aux hémocytes voisins de la lésion d'être réceptifs au signal chimiotactique (Weavers *et al.*, 2016). La molécule correspondante n'a pas encore été identifiée chez la Drosophile, mais une étude menée chez le lépidoptère *Pseudaletia separata* suggère que des peptides sécrétés pourraient jouer ce rôle dans le cadre de la réponse aux blessures et aux infections. Il a en effet été montré qu'un peptide sécrété, le Peptide chimiotactique hémocytaire (HCP), exerce un pouvoir d'attraction sur les hémocytes de la larve *ex vivo*, et que son inactivation par un anticorps empêche le recrutement d'hémocytes au niveau des blessures épidermiques *in vivo*. Le peptide, qui est notamment exprimé dans l'épiderme, se localise au niveau de la cuticule après sécrétion. Suite à une blessure, il devient accessible aux hémocytes, qui suivent le

gradient d'HCP jusqu'à la lésion. Une fois recrutés, les hémocytes produisent à leur tour le peptide, notamment en réponse aux bactéries ayant franchi l'épiderme, ce qui permet de recruter davantage d'hémocytes (Nakatogawa *et al.*, 2009).

En réponse aux signaux de danger, les hémocytes quittent leur compartiment sessile, et migrent au travers de la matrice extracellulaire jusqu'à la source du signal. Les mécanismes moléculaires induisant le départ du compartiment sessile sont encore mal compris, mais des expériences de mutagenèse par gain ou perte de fonction dans les hémocytes de *D. melanogaster* suggèrent que diverses protéines associées à l'adhérence et/ou à la mobilité (ex : GTPase Rac1, Rho GEF2, Intégrine  $\alpha$ -PS3), ainsi que plusieurs régulateurs transcriptionnels (ex : Basket, Krüppel, Escargot, Charlatan) pourraient être impliqués (Williams *et al.*, 2006 ; Stofanko *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré que l'activation de la voie Toll dans le corps gras induit la mobilisation des hémocytes sessiles via un mécanisme dépendant de la protéine Immune response deficient 1 (Ird1), qui est impliquée dans le trafic vésiculaire (Schmid *et al.*, 2014 ; Schmid *et al.*, 2016).

La migration des hémocytes implique la formation d'extensions cellulaires de type lamellipode en direction du signal chimiotactique. Ces lamellipodes établissent des adhérences focales avec la matrice environnante, permettant de tirer la cellule vers l'avant par rétractation des filaments d'actine présents au sein des lamellipodes. Parallèlement, les adhérences focales à l'arrière de la cellule se rompent, tandis que le cytosquelette d'actine se contracte à l'avant de la cellule (Williams *et al.*, 2006). Ce processus complexe nécessite en premier lieu la mobilisation de nombreux régulateurs de la dynamique du cytosquelette d'actine, tels que la Fascine, Mena, Arp2/3, ou encore les GTPases Rac1 et Rac2 qui participent à la formation des lamellipodes chez la Drosophile (Paladi and Tepass, 2004 ; Stramer *et al.*, 2005 ; Zanet *et al.*, 2009 ; Tucker *et al.*, 2011 ; Sander *et al.*, 2013). Pour que la migration soit polarisée, la dynamique des filaments d'actine doit être finement coordonnée avec celle du réseau de microtubules. Cette coordination implique diverses Intégrines ainsi que la protéine de liaison aux microtubules CLIP-associating protein (Clasp) (Stramer *et al.*, 2005 ; Comber *et al.*, 2013). La GTPase Cdc42 joue également un rôle dans le maintien de la polarité cellulaire (Sampson and Williams, 2012). Enfin, la formation d'adhérences focales, régulée par la GTPase Rac1 et le facteur de transcription Basket de la voie JNK, requiert en

particulier l'intégrine  $\beta$ -PS, aussi nommée Myospheroid (Williams *et al.*, 2006 ; Comber *et al.*, 2013 ; Moreira *et al.*, 2013).

## 2. b. Processus d'activation

Pour pouvoir répondre aux blessures et aux infections, les hémocytes doivent également être activés. Selon le type d'hémocyte, cette activation peut impliquer une augmentation des capacités adhésives et d'étalement, une modulation de la production de PAMs et d'espèces réactives de l'oxygène, ou encore une induction de processus de lyse cellulaire dans le cas des hémocytes stockant la proPO (Irving *et al.*, 2005 ; Bidla *et al.*, 2007 ; Shrestha and Kim, 2009 ; Tsuzuki *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 2015).

Une voie centrale dans l'activation et la coordination de tous ces processus est la voie des éicosanoïdes. Les éicosanoïdes sont des dérivés oxygénés d'acides gras polyinsaturés comprenant 20 atomes de carbone. Chez les insectes, il en existe de trois types : les prostaglandines, synthétisées par la Peroxinectine, les leucotriènes, synthétisés par la Lipoxigénase et les époxyéicosanoïdes, synthétisés par l'Époxydase. Leurs précurseurs sont issus du clivage de phospholipides membranaires par des Phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>) intra- ou extracellulaires (Stanley and Kim, 2019). Ces molécules peuvent servir de médiateurs dans le cadre de divers processus physiologiques, via des interactions avec des GPCRs. Leur implication dans l'induction de toutes les réponses cellulaires a été mise en évidence chez diverses espèces d'insectes, incluant principalement des lépidoptères, mais aussi des coléoptères, des orthoptères et le diptère *D. melanogaster* (Stanley and Kim, 2011). Suivant l'espèce d'insecte, cette voie peut stimuler la production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase hémocytaire NOX (Park *et al.*, 2015), les capacités d'agrégation et d'adhérence des hémocytes (Marin *et al.*, 2005 ; Miller *et al.*, 2005 ; Srikanth *et al.*, 2011) ou encore la lyse des œnocytoïdes (Shrestha and Kim, 2009a ; Shrestha *et al.*, 2011). Les voies signalétiques en amont et en aval de ces médiateurs ne sont pas encore clairement élucidées, mais il a été montré qu'ils peuvent agir conjointement avec des cytokines et autres médiateurs, telles que des peptides sécrétés de la famille ENF, l'oxyde nitrique (NO), ou encore des monoamines biogènes (Stanley and Kim, 2019).

La famille ENF comprend 16 peptides connus de 23 à 25 acides aminés qui présentent un domaine central similaire au domaine C-terminal de l'EGFR et un motif N-terminal Glutamate-Asparagine-Phénylalanine. Ces peptides sont sécrétés sous forme de précurseurs par

différents tissus, puis sont activés dans le plasma par protéolyse (Wang *et al.*, 1999 ; Clark *et al.*, 1998 ; Strand *et al.*, 2000 ; Kamimura *et al.*, 2001 ; Tsuzuki *et al.*, 2012). Il s'agit de médiateurs impliqués dans le développement, la réponse au stress, et divers aspects de l'immunité (Skinner *et al.*, 1991 ; Ohnishi *et al.*, 1995 ; Furuya *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999 ; Clark *et al.*, 1997 ; Strand *et al.*, 2000 ; Shears and Hayakawa, 2018). Il a en effet été montré chez plusieurs modèles lépidoptères, qu'un peptide de cette famille, le Plasmacyte spreading peptide 1 (PSP-1), induit une augmentation des capacités d'étalement et d'agrégation des hémocytes larvaires dès trente minutes après contact (Clark *et al.*, 1997 ; Strand and Clark, 1999 ; Wang *et al.*, 1999). Chez le modèle *Spodoptera exigua*, l'activation des plasmacytes par le PSP-1 dépend d'un mécanisme impliquant une synthèse d'éicosanoïdes, une libération de calcium et la GTPase Rac 1 (Srikanth *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2013). Un autre peptide ENF, le Growth Blocking Peptide (GBP), produit des effets très similaires sur les hémocytes des lépidoptères *Pseudaletia temperata* et *Pseudoplusia includens* et du diptère *D. melanogaster* (Strand *et al.*, 2000 ; Oda *et al.*, 2010 ; Tsuzuki *et al.*, 2014). La signalétique associée à ces effets a été en grande partie élucidée sur une lignée d'hémocytes embryonnaires de *D. melanogaster* (cellules S2), ainsi que sur des plasmacytes larvaires de *P. temperata*. Une fois maturé, le GBP se lie à son récepteur Methuselah-like 10 (Sung *et al.*, 2017), ce qui induit la phosphorylation de la protéine adaptatrice P77 au niveau de la membrane des hémocytes (Oda *et al.*, 2010). Cette phosphorylation permet l'activation la Phospholipase C, qui produit de l'inositol-1,4,5-trisphosphate, à l'origine d'une libération de calcium par le réticulum endoplasmique. L'influx de calcium provoque la libération de la cytokine Pvf2, qui se lie à son récepteur Pvr à la surface des hémocytes. Pvr active ensuite la voie des MAP kinases ERK, qui reprogramme le comportement de la cellule, de façon à augmenter ses capacités adhésives et à réduire le niveau d'expression des PAMs (Tsuzuki *et al.*, 2014). L'implication de la voie des éicosanoïdes dans ce processus n'a toutefois pas encore été recherchée.

Le NO est une petite molécule signalétique synthétisée à partir de l'acide aminé arginine par la NO synthase (NOS) (Regulski *et al.*, 1995). Chez le lépidoptère *B. mori*, l'expression de NOS peut être augmentée dans les hémocytes et le corps gras par le PSP, ainsi que par les voies Imd et Toll. Cette surexpression induit une augmentation de la concentration en NO dans les

cellules correspondantes, ce qui stimule l'activité de la PLA<sub>2</sub> et la synthèse d'écossanoïdes (Sadekuzzaman *et al.*, 2018 ; Sadekuzzaman and Kim, 2018).

Les monoamines biogènes sont de petites molécules cycliques dérivées d'acides aminés. Elles peuvent agir en tant que neurotransmetteurs, neuromodulateurs ou neurohormones (Osborne, 1996). Chez le lépidoptère *S. exigua*, il a été montré que deux d'entre elles, l'octopamine et la sérotonine, participent à l'induction de réponses cellulaires via une activation de la GTPase Rac1 (Kim and Kim, 2010 ; Park *et al.*, 2013). Ces molécules sont généralement reconnues par des GPCRs (Ngai *et al.*, 2019) et au sein des hémocytes de *S. exigua*, elles agissent en amont de la voie des écosanoïdes (Kim *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2013).

Chez *D. melanogaster*, d'autres molécules signalétiques impliquées dans l'activation des hémocytes de types plasmatoocyte et lamelloocyte ont été identifiées. Par exemple, des expériences d'hyperactivation et d'inactivation transcriptionnelles de gènes au sein d'hémocytes larvaires suggèrent que les régulateurs transcriptionnels Krüppel et Nejire participent à l'augmentation de leurs capacités d'étalement. De la même manière, l'inactivation de la GTPase Rac2 au sein des hémocytes empêche l'activation des plasmatoocytes de la larve après infection (Williams *et al.*, 2005 ; Stofanko *et al.*, 2008). Toutefois, la nature exacte de la participation de ces différents acteurs dans le processus d'activation des hémocytes reste à identifier.

Le processus d'activation des œnocytoïdes, ou des cellules à cristaux chez *D. melanogaster*, diffère de celui des plasmatoocytes et des granulocytes, puisqu'il nécessite principalement l'induction de processus de lyse cellulaire permettant la libération de la proPO. Bien que la caractérisation de ce processus de lyse cellulaire soit encore très incomplète, il semble que les voies mises en œuvre puissent différer en fonction de l'espèce considérée. Chez le lépidoptère *S. exigua*, la rupture des œnocytoïdes est dépendante de la voie des écosanoïdes. La voie des écosanoïdes induit une libération de calcium via la Phospholipase C, ce qui active la Protéine kinase C. La Protéine kinase C provoque ensuite la lyse osmotique de la cellule par modification de l'activité des canaux sodiques (Shrestha *et al.*, 2009b ; Shrestha *et al.*, 2015). Chez *D. melanogaster*, la lyse des cellules à cristaux semble dépendre de modifications de la structure de leurs cytosquelettes, qui seraient induites via une activation

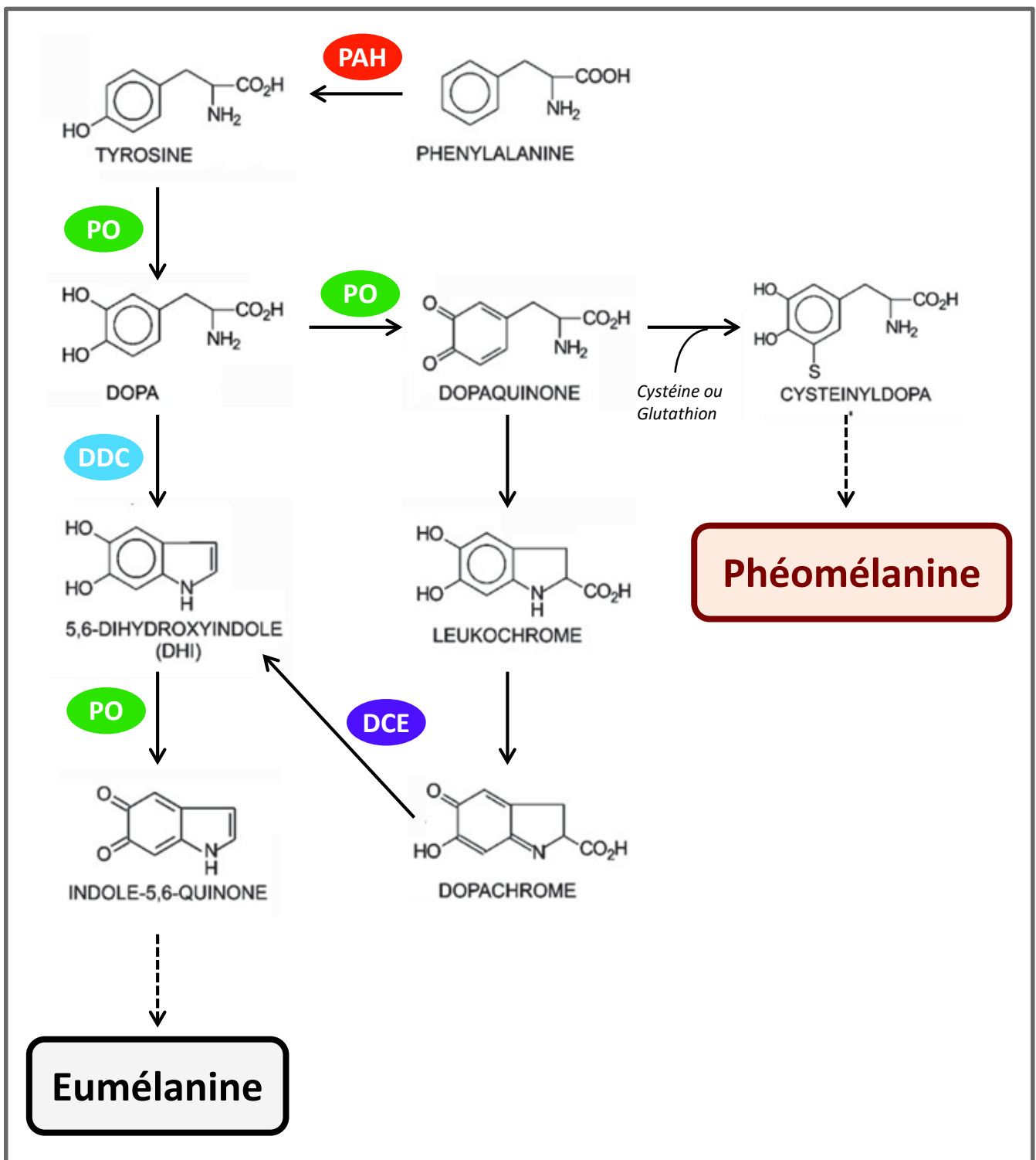
de la GTPase Rac2 et de la voie JNK par la cytokine Eiger, un homologue du facteur pro-inflammatoire Tumor necrosis factor (TNF) des mammifères (Bidla *et al.*, 2007).

### 3. Mélanisation

#### 3. a. Voie de synthèse de la mélanine

La mélanisation est un processus très conservé, dont la description chez les insectes provient d'études réalisées sur divers modèles diptères et lépidoptères (Figure 5) (Aso *et al.*, 1984 ; Nappi *et al.*, 1991 ; Zhao *et al.*, 1995 ; Johnson *et al.*, 2001 ; Infanger *et al.*, 2004 ; Futahashi and Fujiwara, 2005 ; Gorman *et al.*, 2007 ; Sideri *et al.*, 2008). Il débute généralement par une oxydation de Phenylalanine en Tyrosine par la Phenylalanine-4-monooxygénase PAH. La PO oxyde ensuite la Tyrosine pour former de la Dopa, qui est soit décarboxylée en 5,6-dihydroxyindole (DHI) par la Dopa décarboxylase (DDC), soit oxydée en Dopaquinone par la PO. Dans le premier cas, le DHI est directement oxydé par la PO en indole-5,6-quinone, qui polymérise de façon spontanée pour donner de l'eumélanine, un pigment de couleur noirâtre. Dans le second cas, la dopaquinone se cyclise d'abord spontanément pour former du leucodopachrome puis du dopachrome. Le dopachrome est ensuite décarboxylé par la Dopachrome converting enzyme (DCE, ou Yellow f et Yellow f2 chez *D. melanogaster*) pour former du DHI, qui sera ensuite pris en charge comme précédemment par la PO pour former de l'eumélanine. Suivant l'environnement chimique dans lequel se déroule la réaction, la dopaquinone peut aussi incorporer des groupements thiols et former de la phéomélanine, un pigment de couleur plus claire que l'eumélanine (Nappi and Christensen, 2005 ; Vavricka *et al.*, 2010 ; Nakhleh *et al.*, 2017).

Au cours de la dernière étape de la formation de mélanine, les transferts d'électrons se produisant lors de la polymérisation des monomères favorisent l'établissement de liaisons covalentes avec les molécules environnantes. Ces réactions spontanées permettent de recouvrir et d'altérer la surface des agents infectieux, et à terme de les isoler totalement du milieu intérieur de l'insecte. En parallèle, les échanges d'électrons se produisant lors des réactions d'oxydoréduction et pendant la polymérisation conduisent à une génération aléatoire de diverses espèces réactives de l'oxygène (ex :  $H_2O_2$ ,  $\cdot O_2^-$ ) et de l'azote (ex :  $\cdot NO$ ), ainsi que d'autres molécules toxiques (ex : semiquinones). Ces molécules participent



**Figure 5 : Principales réactions du processus de mélanisation chez les insectes**  
 Figure modifiée de Nappi and Christensen, 2005.

également à la destruction des agents infectieux en interagissant avec leurs constituants cellulaires (Nappi and Christensen, 2005).

### 3. b. Induction et régulation

En raison de son important niveau de toxicité, la mélanisation est un processus très contrôlé, qui n'est activé que de façon localisée en réponse à des signaux de danger. Le premier niveau de régulation de la mélanisation réside dans la libération locale du précurseur de la PO, qui catalyse plusieurs étapes de la synthèse de mélanine. Comme indiqué précédemment, les principales cellules productrices de proPO sont les œnocytoïdes ou les cellules à cristaux, qui ne la libèrent qu'après activation, en réponse à une blessure ou à une infection (Strand, 2008). L'induction du processus de mélanisation dépend ensuite de l'activation d'une cascade protéolytique extracellulaire qui aboutit à la maturation par clivage protéolytique du zymogène proPO en PO.

La description de cette cascade, ainsi que de ses modalités d'activation, a été initiée chez différents modèles lépidoptères, coléoptères et diptères, mais c'est pour l'instant chez le lépidoptère *M. sexta* qu'elle est la plus complète (Figure 6) (Nakhleh *et al.*, 2017). Chez ce modèle, il a été montré que la cascade peut être initiée par les protéines de reconnaissance sécrétées  $\beta$ GRP1 et  $\beta$ GRP2, suite à une reconnaissance d'organismes fongiques ou de bactéries à Gram positive (Ma and Kanost, 2000 ; Jiang *et al.*, 2004). Dans le cas de  $\beta$ GRP2, cette reconnaissance conduit à une agrégation des cibles microbiennes et du récepteur, ce qui permet le recrutement et l'auto-activation de la protéase à sérine modulaire HP14 (Jiang *et al.*, 2004 ; Wang and Jiang, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2014). Une fois activée, HP14 clive le zymogène de la protéase à sérine à domaine CLIP (cSP) HP21, qui active à son tour par protéolyse les cSPs PAP2 et PAP3, qui sont responsables du clivage de la proPO (Jiang *et al.*, 1998 ; Jiang *et al.*, 2003a, 2003b ; Wang and Jiang, 2007 ; Gorman *et al.*, 2007). La PO peut également être activée par une voie alternative impliquant les cSPs HP6 et PAP1 (An *et al.*, 2009 ; Jiang *et al.*, 1998). L'étape de maturation de la PO requiert dans tous les cas l'intervention des homologues non-catalytiques de cSPs cSPH1 et cSPH2, qui sont activés par protéolyse par PAP1 et PAP3 (Yu *et al.*, 2003 ; Jiang *et al.*, 2003a ; Gupta *et al.*, 2005 ; Wang and Jiang, 2008 ; Wang *et al.*, 2014). Une fois activé, cSPH1 forme un complexe protéique avec PAP1 et l'immunolectine-2, une lectine de type C qui se lie probablement aux glycosides exposés à la surface de la cible. L'hypothèse la plus probable est que cSPH1 et cSPH2



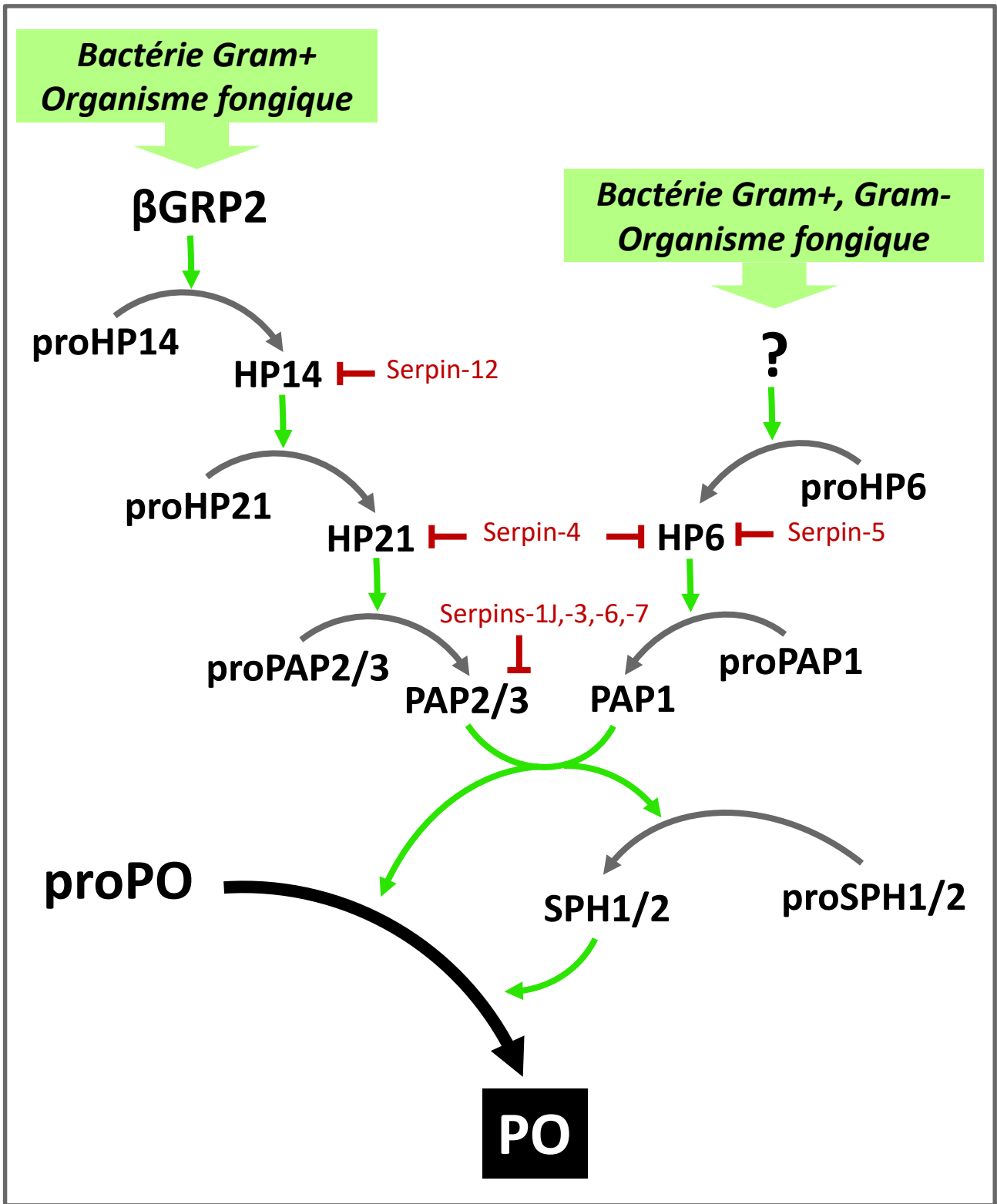


Figure 6 : Système de la prophénoloxydase de *Manduca sexta*.

permettent ainsi une activation localisée de la PO à la surface de l'agent infectieux (Yu *et al.*, 2003). L'ensemble du processus est par ailleurs régulé par des inhibiteurs de protéases à sérine tels que les Serpins -1J, -4, -5 et -12, qui peuvent agir à différents niveaux de la cascade (Jiang *et al.*, 2003b ; Wang and Jiang, 2006 ; Wang and Jiang, 2007 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Tong *et al.*, 2005 ; An and Kanost, 2010 ; Yang *et al.*, 2018).

Les travaux réalisés sur d'autres modèles ont permis d'établir que quelle que soit l'espèce, la cascade protéolytique implique le même type d'acteurs, soient des protéases à sérine modulaires ou présentant un domaine CLIP, des homologues non-fonctionnels de cSP et des Serpins. Néanmoins, ces travaux ont également montré que l'architecture de la cascade, ainsi que ses modalités d'activation, sont variables selon l'espèce considérée (Nakhleh *et al.*, 2017). Par exemple, chez le coléoptère *T. molitor*, la cascade est activée par les peptidoglycanes de type lysine (LYS) et DAP. La reconnaissance du peptidoglycane de type LYS, qui est principalement retrouvé chez des bactéries à Gram positive, implique les homologues des protéines activatrices de la voie Toll PGRP-SA et GNBP1 de *D. melanogaster* (voir section C/1. c) (Park *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2007). Chez *D. melanogaster*, la cascade peut être activée par des organismes fongiques et des bactéries à Gram négative suite à une reconnaissance par GNBP3 et la protéine activatrice de la voie Imd PGRP-LE, respectivement (Takehana *et al.*, 2002 ; Takehana *et al.*, 2004 ; Matskevich *et al.*, 2010). Chez ce modèle, il a par ailleurs été montré qu'une voie indépendante assure la réponse aux blessures via l'activation de la cSP Hagan (Nam *et al.*, 2012). Enfin, chez le moustique *A. gambiae*, la reconnaissance de bactéries à Gram négative, d'organismes fongiques et du parasite *Plasmodium berghei* dépend cette fois-ci de la protéine à motif thioester TEP1, un homologue des facteurs du complément C3, C4 et C5 et des  $\alpha_2$ -macroglobulines des mammifères (Yassine *et al.*, 2012 ; Povelones *et al.*, 2013).

L'induction du processus de mélanisation peut également dépendre d'une activation transcriptionnelle de membres de la cascade de la proPO et/ou d'enzymes intervenant dans la synthèse de mélanine (Nakhleh *et al.*, 2017). Chez les diptères *D. melanogaster*, *A. gambiae* et *A. aegypti*, la voie Toll est l'une des principales voies signalétiques participant à l'induction de membres de la cascade de la proPO (De Gregorio *et al.*, 2002 ; Frolet *et al.*, 2006 ; Garver *et al.*, 2009 ; Zou *et al.*, 2010). Chez *D. melanogaster*, les voies Toll et Imd sont également impliquées dans l'induction de l'expression d'enzymes de synthèse de la mélanine, telles que

la DDC, Yellow f ou encore Punch, une GTP cyclohydrolase synthétisant un cofacteur essentiel à la production de tyrosine par la PAH (voir sections C/1. a et C/1. b) (De Gregorio *et al.*, 2002 ; Tang, 2009).

## 4. Phagocytose

### 4. a. Reconnaissance

Face à un agent microbien de petite taille, comme une bactérie ou un eucaryote unicellulaire, la première réponse cellulaire pouvant être produite par l'insecte est la phagocytose. Cette réponse, qui débute dès les premières minutes après contact avec un microorganisme (Pearson *et al.*, 2003), requiert en premier lieu une reconnaissance et une liaison des phagocytes à la surface de la cible microbienne (Hillyer *et al.*, 2003). La fixation d'une cible s'effectue via des interactions multiples avec des récepteurs membranaires, et éventuellement, avec des opsonines solubles. La caractérisation fonctionnelle de ces molécules a principalement été menée chez le modèle *D. melanogaster*, ainsi que chez quelques autres modèles tels que *A. gambiae* et *M. sexta*. Au total, une dizaine (isoformes exclues) de protéines de reconnaissance solubles ou membranaires ont été expérimentalement associées à la phagocytose chez les insectes. Elles appartiennent aux familles et superfamilles Scavenger, Nimrod, Intégrine, Immunoglobuline, TEP, PGRP et Lectine de type C (Nazario-Toole and Wu, 2017 ; Xia *et al.*, 2018).

Les récepteurs membranaires Scavenger, qui peuvent lier une grande diversité de ligands polyanioniques du soi et du non-soi, sont caractérisés par une forte diversité structurale permettant de les subdiviser en sept classes (Nazario-Toole and Wu, 2017). Chez *D. melanogaster*, la classe B comprend deux récepteurs phagocytaires : Croquemort et Peste. Croquement est impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques ainsi que de la bactérie à Gram positive *Staphylococcus aureus* (Franc *et al.*, 1996 ; Franc *et al.*, 1999 ; Stuart *et al.*, 2005). Peste peut quant à lui participer à la phagocytose de la bactérie à Gram positive *Listeria monocytogenes*, mais il semble jouer un rôle plus important dans l'internalisation de mycobactéries telles que *Mycobacterium fortuitum* et *M. smegmatis*, dont la paroi cellulaire présente une composition biochimique particulière (Agaisse *et al.*, 2005 ; Philips *et al.*, 2005 ; Alderwick *et al.*, 2015). La classe C comprend également un récepteur phagocytaire, le

récepteur membranaire dSRCl, qui participe à la liaison et à la phagocytose d'*E. coli* et de *S. aureus*, ainsi qu'à l'internalisation d'ARNs bicaténaires (Ramet *et al.*, 2001 ; Ulvila *et al.*, 2006). La famille Nimrod comprend des récepteurs membranaires et solubles comportant des domaines très adhésifs de répétitions de motifs EGF-like. Chez *D. melanogaster*, les récepteurs membranaires Draper, Eater, NimC1 et NimC4 sont impliqués dans la phagocytose (Nazario-Toole and Wu, 2017). Draper et NimC4 sont tous deux impliqués dans la phagocytose de cellules apoptotiques et Draper participe également à la phagocytose des bactéries *E. coli* et *S. aureus* (Manaka *et al.*, 2004 ; Cuttell *et al.*, 2008 ; Kurant *et al.*, 2008). Eater est quant à lui impliqué dans l'internalisation de bactéries à Gram positive et d'ARNs bicaténaires, et il peut également prendre part à la phagocytose de bactéries à Gram négative après déstabilisation de leur membrane externe par des PAMs (Kocks *et al.*, 2005; Ulvila *et al.*, 2006 ; Chung and Kocks, 2011 ; Nehme *et al.*, 2011 ; Horn *et al.*, 2014 ; Melcarne *et al.*, 2019b). NimC1 intervient dans la phagocytose de cibles diversifiées, incluant *E. coli*, *S. aureus* et des particules recouvertes de zymosane, un complexe de protéines et de glucides présent à la surface des levures (Kurucz *et al.*, 2007 ; Melcarne *et al.*, 2019b). Enfin, il a été montré que les récepteurs solubles NimB3 et NimB4 de la Drosophile se fixent à la surface de bactéries à Gram négative et positive, ce qui suggère qu'ils pourraient agir en tant qu'opsonines (Zsomboki *et al.*, 2013).

Les intégrines, en plus de leurs rôles dans la migration des hémocytes, peuvent être directement impliquées dans la reconnaissance et la phagocytose d'agents microbiens. C'est par exemple ce qui a été montré pour l'hétérodimère d'intégrines  $\beta v/\alpha$ -PS3 de *D. melanogaster*, qui participe à la phagocytose de cellules apoptotiques, mais aussi à celle de *S. aureus*, via une interaction avec le peptidoglycane de sa paroi (Nagaosa *et al.*, 2011 ; Nonaka *et al.*, 2013). L'orthologue Bint2 de l'intégrine  $\beta v$  chez *A. gambiae* est également impliqué dans la phagocytose, mais avec des divergences en terme de cibles microbiennes (Moita *et al.*, 2005).

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines impliquées dans l'adhérence et la communication cellule-cellule. Chez *D. melanogaster*, le gène Dscam 1 peut coder jusqu'à 36000 protéines membranaires ou sécrétées de cette superfamille, grâce à 95 exons alternatifs. Ces différentes isoformes, qui jouent un rôle crucial pour la formation du système nerveux de l'insecte, pourraient également être impliquées dans la phagocytose (Melcarne *et*

*al.*, 2019a). Il a en effet été montré que l'inactivation de l'expression du gène *Dscam1* dans les plasmotocytes de la larve de drosophile réduit leurs capacités phagocytaires vis-à-vis de *E. coli* (Watson *et al.*, 2005). L'analyse de l'expression des différentes isoformes de *AgDscam* chez *A. gambiae*, suggère par ailleurs que des isoformes spécifiques sont produites en réponse à différents pathogènes. Ces isoformes semblent présenter une efficacité supérieure vis-à-vis du type de microorganisme (ex : bactéries à Gram positive ou à Gram négative) par lequel elles sont induites, suggérant qu'un mécanisme discriminant intervient dans la régulation de l'épissage de *Dscam* (Dong *et al.*, 2006). Cette hypothèse n'a toutefois pas été vérifiée chez *D. melanogaster*, pour laquelle aucun changement significatif de l'épissage de *Dscam* n'a été détecté en réponse à *E. coli* (Armitage *et al.*, 2014). Chez *M. sexta*, une autre protéine à domaines Immunoglobuline, l'hémoline, semble également jouer un rôle dans la phagocytose de bactéries à Gram négative (Eleftherianos *et al.*, 2007).

Les TEPs sont des protéines présentant des motifs thioester et une structure similaire aux facteurs C3, C4 et C5 du système du complément ainsi qu'aux  $\alpha_2$ -macroglobulines des mammifères. Chez les mammifères, les facteurs C3 à C5 du complément lient des cibles microbiennes de façon covalente via leurs motifs thioester, ce qui facilite leur phagocytose. Les  $\alpha_2$ -macroglobulines se lient de manière covalente à des protéases microbiennes, ce qui les empêche de fixer leurs substrats (Shokal and Eleftherianos, 2017). Il existe 6 gènes codant des TEPs chez *D. melanogaster*, dont cinq (*Tep1* à 4 et *Tep 6*) sont exprimés de façon basale ou inductible dans les hémocytes, le corps gras et dans certains épithéliums de surface (Lagueux *et al.*, 2000 ; Aoun *et al.*, 2011). En accord avec l'hypothèse d'une fonction dans l'opsonisation, il a été établi que les protéines *TEP2*, *TEP3* et *TEP6* augmentent respectivement la phagocytose de *E. coli*, de la bactérie à Gram négative *Pseudomonas aeruginosa*, de *S. aureus* et de la levure *Candida albicans* (Stroschein-Stevenson *et al.*, 2006). Cette famille de protéines a également été très étudiée chez *A. gambiae*, chez lequel elle a subi une forte expansion avec un total de 19 gènes *Tep* dans son génome (Christophides *et al.*, 2002). Ces travaux, ont montré que *AgTEP1*, 3 et 4 sont impliquées dans la phagocytose des bactéries et que *AgTEP1* se lie de façon covalente à la surface de *E. coli* via un mécanisme dépendant de son motif thioester (Levanisha *et al.*, 2001 ; Moita *et al.*, 2005). L'ensemble de ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une fonction analogue à celle des facteurs opsonisants du système du complément des vertébrés.

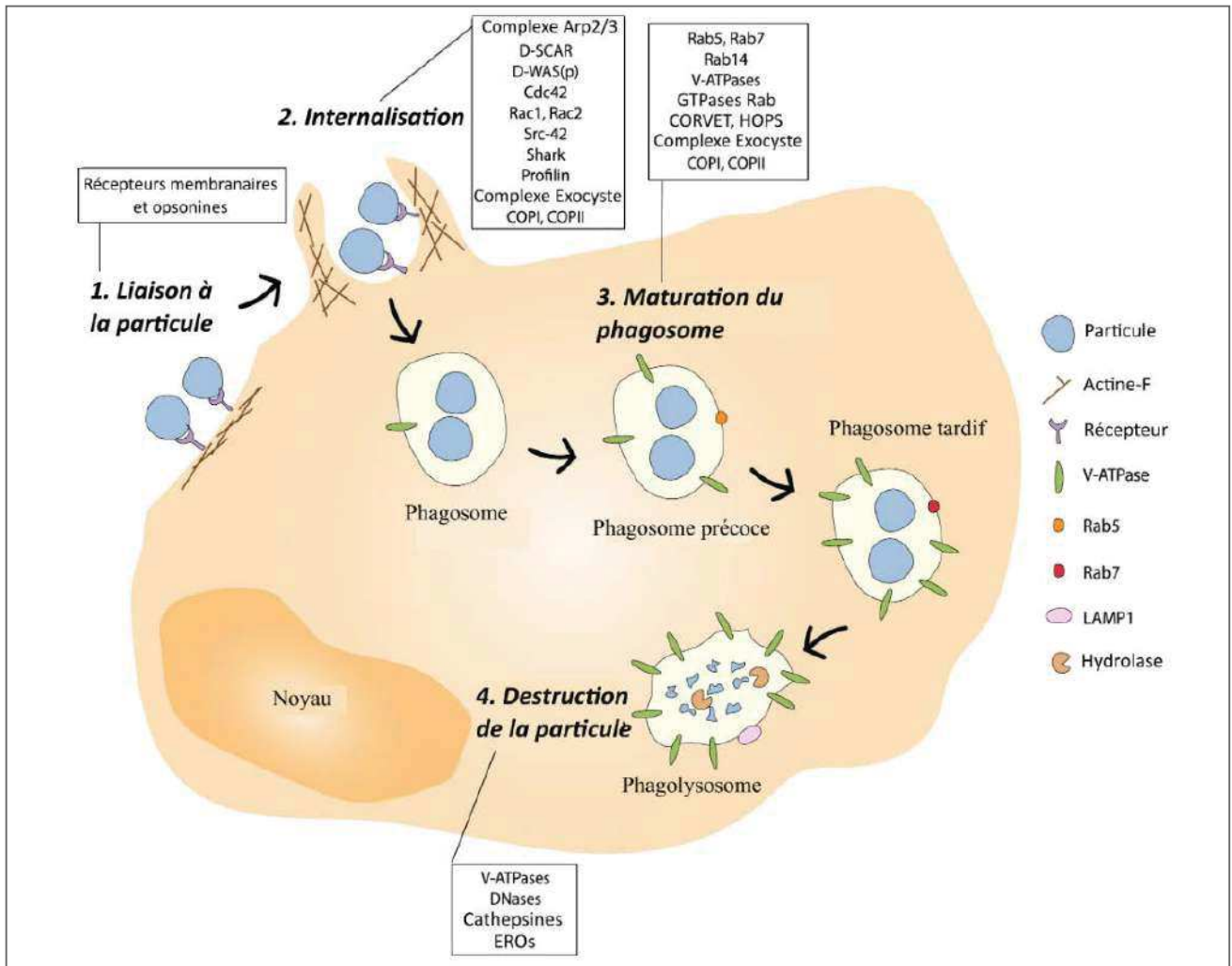
Les PGRPs sont des protéines solubles ou membranaires possédant un domaine de liaison au peptidoglycane (PGRP) qui s'accompagne parfois d'un domaine amidasique permettant de dégrader ce dernier. Ces protéines sont principalement connues pour leurs rôles dans l'induction ou la régulation des réponses antimicrobiennes et de mélanisation. Sur les 19 PGRPs identifiées chez *D. melanogaster* (Kurata, 2014), au moins trois pourraient également être impliquées dans la phagocytose (Nazario-Toole and Wu, 2017). La première d'entre elles est PGRP-LC, un récepteur membranaire existant sous trois isoformes qui participe à l'activation de la voie Imd en réponse au peptidoglycane de type DAP (Kurata, 2014). Il a en effet été montré que l'inactivation transcriptionnelle du gène codant PGRP-LC réduit la fixation et la phagocytose de *E. coli* par les cellules S2 de Drosophile (Ram *et al.*, 2002). La seconde est PGRP-SC1a, une PGRP sécrétée à domaine amidasique régulant positivement la voie Toll (Garver *et al.*, 2006 ; Costechareyre *et al.*, 2016). Il a été établi que cette protéine peut se lier à la surface de la bactérie *S. aureus* et favoriser sa phagocytose via un mécanisme dépendant de son activité amidasique (Garver *et al.*, 2006). Une hypothèse probable est que PGRP-SC1a dégrade la paroi de peptidoglycane de la bactérie afin d'augmenter l'exposition en surface de ligands bactériens reconnus par les phagocytes. Enfin la PGRP sécrétée activatrice de la voie Toll PGRP-SA (Michel *et al.*, 2001) semble également pouvoir participer à la phagocytose de *S. aureus*, bien que les effets observés soient variables en fonction de la méthodologie utilisée (Garver *et al.*, 2006 ; Nehme *et al.*, 2011 ; Nazario-Toole and Wu, 2017). Les lectines de type C sont des protéines membranaires ou sécrétées à domaines CRD (Carbohydrate Recognition Domain) qui peuvent se lier à différents types de glucides. Leur implication dans la reconnaissance des agents infectieux et dans l'induction de réponses humorales et cellulaires a été mise en évidence chez divers modèles d'insectes (Xia *et al.*, 2018). Chez *M. sexta*, la lectine de type C IML-2 participe aux réponses immunitaires contre les bactéries à Gram négative, dont elles lient le LPS (Yu and Kanost, 2000 ; Yu and Kanost, 2003). Cette protéine s'associe également à la surface des deux types d'hémocytes phagocytaires de l'insecte : les granulocytes et les plasmacytes, ce qui stimule leurs capacités phagocytaires (Ling and Yu, 2006). Ces résultats suggèrent fortement qu'IML2 est une opsonine. De la même manière, les lectines de type C sécrétées DL2 et DL3 de *D. melanogaster* peuvent d'une part agglutiner *E. coli*, et d'autre part, se lier aux hémocytes de l'insecte (Ao *et al.*, 2007). Enfin, la lectine sécrétée Pr-CTL du lépidoptère *Pieris rapae* se lie

aux membranes des granulocytes et des plasmacytes et la suppression de son expression cause une inhibition de diverses réponses immunitaires, incluant la phagocytose (Fang *et al.*, 2011).

#### 4. b. Internalisation et destruction

L'interaction des phagocytes avec leurs cibles enclenche divers processus cellulaires permettant dans un premier temps l'internalisation de la cible dans un phagosome, puis de la détruire après maturation et fusion du phagosome avec des vésicules lysosomales. Les mécanismes moléculaires régulant le processus de phagocytose ont principalement été étudiés chez *D. melanogaster* (Figure 7), sur des cellules S2 et des hémocytes embryonnaires. Ces travaux ont montré que les mécanismes impliqués dans la phagocytose chez les insectes sont très similaires à ceux impliqués dans la phagocytose chez les mammifères (Nazario-Toole *et al.*, 2017 ; Melcarne *et al.*, 2019a).

Chez la Drosophile, la reconnaissance d'une cible induit tout d'abord la formation de longs filopodes qui l'entourent progressivement jusqu'à internalisation (Pearson *et al.*, 2003). Cette première étape nécessite la mobilisation de nombreuses protéines régulant la dynamique du cytosquelette d'actine, telles que D-SCAR, D-WASP, Arp2/3, les GTPases Cdc42, Rac1 et Rac2, ainsi que la Profiline. L'internalisation de la cible dans le phagosome requiert également la mobilisation de protéines impliquées dans le bourgeonnement et le trafic vésiculaires, telles que les protéines de manteau COPI et COPII ou encore le complexe Exocyste (Melcarne *et al.*, 2019a). Dans le cas de la phagocytose de cellules apoptotiques par les cellules gliales, la mobilisation de ces facteurs dépend de la kinase Shark, qui serait recrutée à la membrane suite à la phosphorylation des motifs intracellulaires ITAM du récepteur Draper par la kinase Src42A (Ziegenfuss *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré que l'induction de la phagocytose de cellules apoptotiques par la lignée d'hémocytes embryonnaires S2 est dépendante de la Juntophiline Undertaker, qui permet un influx de calcium extracellulaire via un couplage physique entre les canaux calciques localisés à la membrane plasmique et ceux du réticulum endoplasmique (récepteurs Ryanodines) (Cuttell *et al.*, 2008). Toutefois, l'implication de Shark dans la phagocytose Draper-dépendante de *S. aureus* n'ayant pas été confirmée (Hashimoto *et al.*, 2009), la signalisation initiant le processus de phagocytose pourrait différer selon le type de phagocyte et/ou la nature de la cible à internaliser.



**Figure 7 : Processus de phagocytose chez *Drosophila melanogaster*.** Figure modifiée de Melcarne *et al.*, 2019.



Le phagosome est ensuite mûri par fusion avec des vésicules endosomales puis lysosomales, qui acidifient son pH et fournissent les hydrolases nécessaires à la digestion de la cible. Les premiers événements de fusion avec des endosomes précoces sont médiatisés par la GTPase Rab5, qui recrute des effecteurs tels que la Rabenosin-5, la phosphatidylinositol-3-kinase 59F et le complexe protéique CORVET. La GTPase Rab5 est ensuite remplacée par Rab7, qui agit conjointement avec le complexe protéique HOPS et la Lysosome-associated glycoprotein 1 (LAMP1), pour induire la fusion du phagosome avec des vésicules lysosomales (Nazario-Toole and Wu, 2017 ; Melcarne *et al.*, 2019a). Tout au long du processus de maturation, l'acidification du phagosome est permise par des V-ATPases (Cheng *et al.*, 2005 ; Philips *et al.*, 2005). Cette acidification est essentielle au bon fonctionnement des hydrolases fournies par les vésicules lysosomales, telles que des cathepsines et la DNase II (Kocks *et al.*, 2003 ; Seong *et al.*, 2006). L'élimination de la cible pourrait également faire intervenir une production d'espèces réactives de l'oxygène, dont la concentration augmente fortement à l'intérieur du phagolysosome entre deux et trois heures après contact avec une cible bactérienne (Myers *et al.*, 2018).

Des travaux réalisés chez différents modèles diptères suggèrent que d'autres protéines pourraient être impliquées dans la phagocytose. Ces protéines incluent par exemple les chaperones HSPJOL1, HSP20L1 et HSP20L2 chez *A. gambiae*, ou encore la PO et la DDC chez *Ceratitis capitata*. Des travaux supplémentaires sont néanmoins requis pour identifier la nature de leurs participations au processus de phagocytose (Moita *et al.*, 2005 ; Mavrouli *et al.*, 2005 ; Sideri *et al.*, 2008).

## **5. Encapsulation et nodulation**

Les insectes disposent également d'un type de réponse cellulaire spécifique aux invertébrés permettant d'éliminer des pathogènes de grandes tailles ou des amas de microorganismes (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Ces réponses consistent en des phénomènes d'agrégation séquentielle de différents types d'hémocytes autour d'une cible, qui peuvent ou non être suivis d'une mélanisation de la structure. Dans le cas de l'élimination de pathogènes de grandes tailles, comme des œufs ou larves de guêpes parasitoïdes ou encore des nématodes, ce processus est appelé encapsulation. Dans le cas de l'élimination d'agrégats de microorganismes, comme des bactéries, des levures ou des protozoaires, il est appelé

nodulation. Suivant l'insecte et la nature de l'agent infectieux, ce processus peut être initié en quelques minutes ou quelques heures, et il se termine généralement autour de 72 heures après infection (Dubovskiy *et al.*, 2016).

### 5. a. Reconnaissance

Dans le cas de l'encapsulation d'organismes métazoaires, les mécanismes permettant la reconnaissance de la cible comme un agent étranger n'ont pas été clairement identifiés. Des expériences de transplantations de tissus d'insectes altérés ou issus d'espèces plus ou moins éloignées de celle de l'insecte receveur suggèrent que des différences de composition ou de structure de la matrice extracellulaire pourraient être détectées (Lackie, 1988 ; Rizki and Rizki, 1980 ; Rizki and Rizki, 1983). Ces différences pourraient par ailleurs être amplifiées par l'induction de processus de mélanisation altérant la surface de la particule dès son entrée dans l'hémocœle (Chen, 1988 ; Kobayashi *et al.*, 1986 ; Dubovskiy *et al.*, 2016).

Dans tous les cas, la reconnaissance de la cible fait fréquemment intervenir des lectines de type C (Xia *et al.*, 2018). Chez *M. sexta*, il a en effet été montré que la lectine de type C IML-2 se lie à des nématodes tels que *Caenorhabditis elegans* et *Brugia malayi*, tandis que IML-4 agglutine les bactéries et les levures (Yu and Kanost, 2004; Yu *et al.*, 2006). Chez *P. rapae*, la lectine Pr-CTL lie la surface de l'œuf de la guêpe parasitoïde *Pteromalus puparium* ainsi que les granulocytes et les plasmocytes de l'insecte. Son inactivation par ARN interférence réduit les capacités d'encapsulation de billes de latex par les hémocytes de l'insecte (Fang *et al.*, 2011). Chez la Drosophile, les lectines de type C DL2 et DL3, qui agglutinent *E. coli* et lient les hémocytes de l'insecte, présentent le même type d'effets sur l'encapsulation de billes d'agarose (Ao *et al.*, 2007). Certaines lipoprotéines pourraient également intervenir dans cette reconnaissance. Il a en effet été montré chez le lépidoptère *Galleria mellonella* que l'Apolipophorine III, une lipoprotéine impliquée dans le transport de lipides, se lie aux conidies et aux  $\beta$ -glucanes fongiques et que son inactivation réduit les capacités d'encapsulation des hémocytes de l'insecte (Whitten *et al.*, 2004).

### 5. b. Agrégation des hémocytes

Le processus d'agrégation séquentielle des hémocytes autour de la cible varie ensuite en fonction de l'espèce d'insecte considérée. Ce processus a été décrit de façon précise chez les lépidoptères *M. sexta* et *P. includens* ainsi que chez *D. melanogaster*. Chez *D. melanogaster* ce

sont d'abord les plasmatoctes qui se fixent autour de la cible, puis s'étalent en formant des jonctions septées qui imperméabilisent la monocouche hémocytaire. Par la suite, les lamellocytes fraîchement produits s'agrègent et s'étalent en plusieurs couches autour des plasmatoctes, après quoi les hémocytes de la couche interne rentrent en nécrose (Russo *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 2005). Chez *P. includens*, ce sont d'abord les granulocytes qui se fixent de façon non-uniforme autour de la cible. Comme chez la *Drosophile*, les plasmatoctes s'agrègent et s'étalent ensuite en plusieurs couches autour de la structure. Le processus se termine par un nouveau recrutement de granulocytes, qui meurent par apoptose en libérant des constituants de la matrice extracellulaire. Cette dernière étape permet de mimer une lame basale autour de la capsule, ce qui met fin au recrutement des hémocytes (Pech and Strand, 1996 ; Pech and Strand, 2000). Enfin, chez *M. sexta*, c'est une sous-population de plasmatoctes qui est recrutée en premier, puis des plasmatoctes et des granulocytes (qui libèrent également leurs contenus cytoplasmiques) s'agrègent autour de la capsule, de façon plus désorganisée (Wiegand *et al.*, 2000 ; Nardi *et al.*, 2006).

Chez la *Drosophile* comme chez *M. sexta*, l'adhérence des hémocytes à la cible et/ou aux autres hémocytes fait d'une part intervenir des intégrines, et d'autre part le Neuroglian, une immunoglobuline membranaire impliquée dans l'adhérence cellulaire et dans la formation de jonctions septées. Il a en effet été montré chez *M. sexta*, que seule une sous-population de plasmatoctes Neuroglian positifs adhère initialement à la cible (Nardi *et al.*, 2006). Ces hémocytes interagissent entre eux via des interactions homophiles entre molécules de Neuroglian, puis ils recrutent des plasmatoctes Neuroglian-négatifs via des interactions hétérophiles Neuroglian-Intégrine HS (dimère  $\alpha 1/\beta 1$ ) (Zhuang *et al.*, 2007a). Par la suite, les plasmatoctes et les granulocytes Neuroglian négatifs s'agrègent autour via une interaction en trans de l'intégrine HS avec la Tetraspanine D76, une protéine à quatre domaines transmembranaires impliquée dans divers processus signalétiques et d'adhérence cellulaire (Levin *et al.*, 2005 ; Zhuang *et al.*, 2007b). Ces processus pourraient également faire intervenir les intégrines  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  ainsi que l'Hémoline, bien que des travaux supplémentaires soient nécessaires pour identifier leurs fonctions dans le contexte de l'encapsulation et/ou de la nodulation (Eleftherianos *et al.*, 2007 ; Zhuang *et al.*, 2008). Dans le cas de *D. melanogaster*, les intégrines Myospheroid et  $\alpha$ -PS4 ainsi que le Neuroglian sont impliqués dans le processus d'encapsulation, mais les modalités de leurs interactions avec la cible et/ou avec les

hémocytes n'ont pas encore été décrites (Wertheim *et al.*, 2005 ; Irving *et al.*, 2005 ; Williams, 2009). Il a par ailleurs été montré chez ce modèle qu'une N-glycosylation des plasmotocytes par diverses enzymes (ex : Oligosaccharide transférase,  $\alpha$ -1,2-mannosidase) est nécessaire à leur agrégation (Mortimer *et al.*, 2012).

### 5. c. Séquestration et destruction

A la fin du processus, une lyse d'œncytoïdes ou de cellules à cristaux peut survenir au niveau de la capsule, ce qui libère la proPO et aboutit d'une part à une mélanisation de la structure et d'autre part à la génération d'intermédiaires toxiques. Bien que le processus conduisant à la mort de la cible n'ait pas encore été clairement élucidé, il est probable que la production de ces intermédiaires participe à sa destruction. Parmi les principaux facteurs pouvant être impliqués, on retrouve également l'asphyxie et la privation de nutriments (Dubovskiy *et al.*, 2016 ; Hillyer, 2016). Il a par ailleurs été montré que des PAMs sont exprimés au sein des hémocytes de diverses espèces d'insectes, ainsi que des membres des voies Imd et Toll chez la *Drosophile* (Bartholomay *et al.*, 2004 ; Irving *et al.*, 2005 ; Lavine *et al.*, 2005 ; Yakovlev *et al.*, 2017). L'hypothèse d'une destruction de la cible par des PAMs libérés par les hémocytes à l'intérieur de la capsule est donc également envisagée (Strand, 2008).

## C. Réponses humorales systémiques

La dernière ligne de défense mise en place par les insectes est une réponse systémique et humorale, qui débute généralement une à six heures après infection ou blessure (Lemaître *et al.*, 1997 ; Boutros *et al.*, 2002 ; Erler *et al.*, 2011). Cette réponse consiste principalement en une sécrétion massive de sous-groupes de PAMs, ainsi que d'autres protéines de l'immunité, par les cellules du corps gras (Arrese and Soulages, 2010 ; Hillyer, 2016). Les voies d'induction de cette réponse ont été étudiées de façon très détaillée chez le modèle *D. melanogaster*, ce qui a permis d'établir que la production de ces molécules est principalement régulée par deux voies signalétiques : la voie Imd et la voie Toll (Ferrandon *et al.*, 2007). Sauf exception, comme par exemple dans le cas de symbioses obligatoires avec un partenaire microbien (Gerardo *et al.*, 2010), la majorité des intermédiaires de ces voies est conservée au sein de la diversité des espèces d'insectes, bien que le nombre et la nature des effecteurs en aval varient fortement en fonction de l'espèce (Viljakainen, 2015). Dans cette troisième partie, je commencerai donc par présenter les voies d'induction de la réponse systémique, en me focalisant en particulier

sur les travaux réalisés sur la *Drosophile*. Je présenterai ensuite les PAMs et autres effecteurs de l'immunité antimicrobienne qui ont été identifiés au sein de la diversité des insectes.

## 1. Voies d'induction

### 1. a. Voie Imd canonique

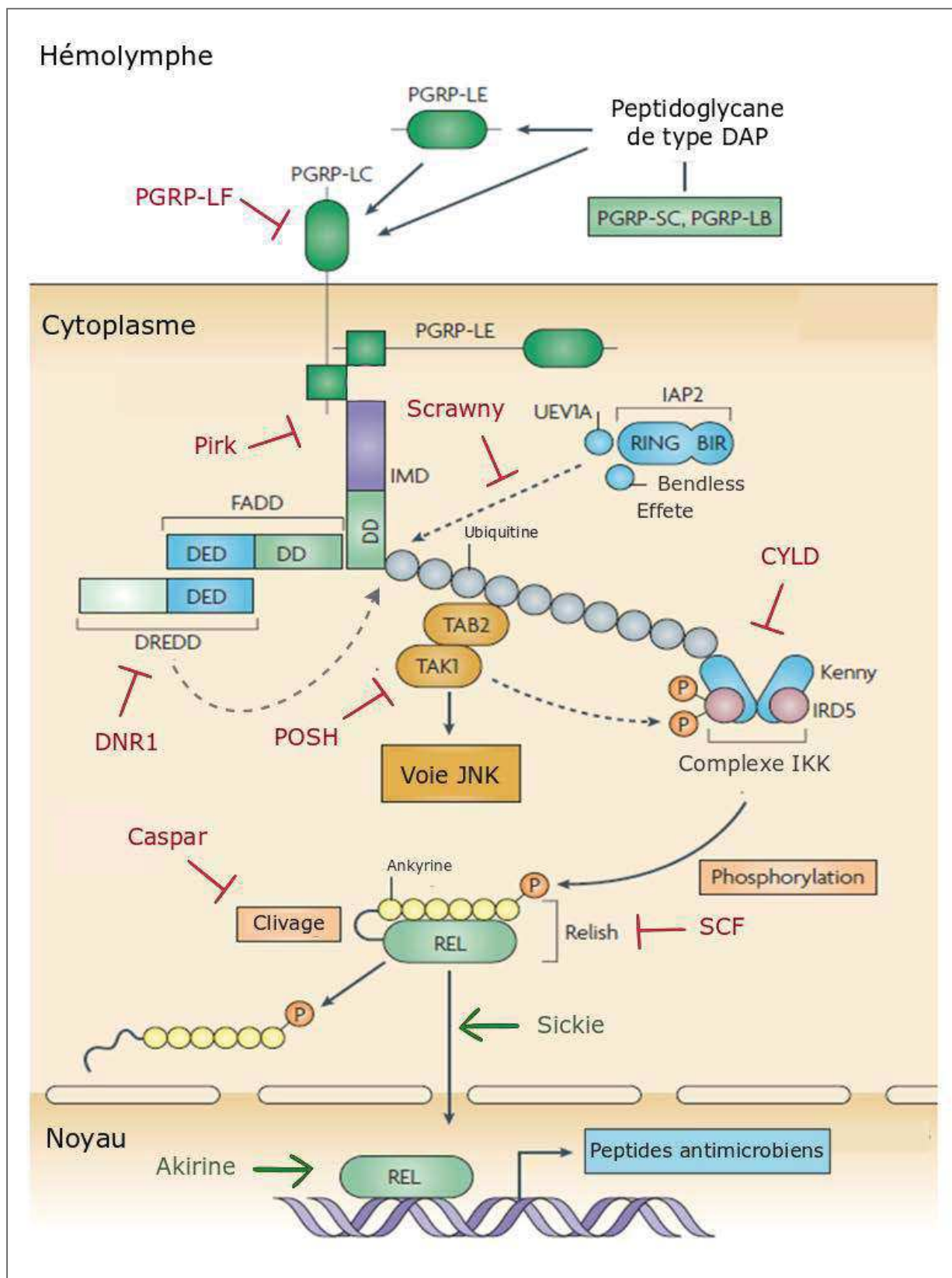
Comme indiqué précédemment, la voie Imd canonique (Figure 8) est activée suite à une reconnaissance de peptidoglycane de type DAP, qui est principalement retrouvé chez des bactéries à Gram négative ainsi que chez des bacilles à Gram positive. Dans le corps gras, cette reconnaissance peut s'effectuer via la protéine membranaire PGRP-LC et/ou via la PGRP soluble PGRP-LE (Myllymaki *et al.*, 2014). PGRP-LC possède au minimum trois isoformes, dont deux, PGRP-LCx et PGRP-LCa, sont impliquées dans la reconnaissance du peptidoglycane. Les homodimères de PGRP-LCx reconnaissent le peptidoglycane sous forme polymérique, tandis que les hétérodimères PGRP-LCx/PGRP-LCa le reconnaissent sous sa forme monomérique (Kaneko *et al.*, 2004 ; Chang *et al.*, 2006 ; Neyen *et al.*, 2012). Dans le corps gras, PGRP-LE peut se trouver sous deux formes, une forme longue intracellulaire et une forme courte extracellulaire. Suite à une reconnaissance de peptidoglycane monomérique, la forme extracellulaire de PGRP-LE active la voie Imd via un mécanisme dépendant de PGRP-LC, tandis que la forme intracellulaire l'active de façon directe (Lim *et al.*, 2006 ; Kaneko *et al.*, 2006).

Cette reconnaissance induit le recrutement d'un complexe constitué de la caspase Dredd et des protéines adaptatrices Immune deficiency (Imd) et Fas-associated death domain (FADD). Dredd est ensuite ubiquitinée par un complexe constitué de la ligase Inhibitor of apoptosis 2 (Iap2) et des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine UEV1a, Bendless et Effete. Cette ubiquitination active Dredd qui clive alors un fragment N-terminal d'Imd, ce qui permet son ubiquitination par Iap2. L'ubiquitination d'Imd induit le recrutement de la TGF $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1), associée à son régulateur TAK1-associated binding protein 2 (TAB2). Le complexe TAK1/TAB2 active le complexe IKK, constitué de l' $\kappa$ B kinase Immune response deficient 5 (Ird5) et de son régulateur Kenny, par phosphorylation. Le complexe IKK phosphoryle alors le domaine inhibiteur C-terminal du facteur de transcription Relish, ce qui provoque son clivage, probablement par Dredd (Ferrandon *et al.*, 2007 ; Wiklund *et al.*, 2009 ; Myllymaki *et al.*, 2014). Le fragment N-terminal de Relish se dimérise alors et transloque dans le noyau cellulaire, où il induit l'expression de gènes immunitaires par fixation sur des motifs

$\kappa$ B localisés dans leurs promoteurs (Busse *et al.*, 2007). En parallèle, le complexe TAK1/TAB2 active la voie JNK, qui induit l'expression de gènes de l'immunité et/ou de réponse au stress (Ferrandon *et al.*, 2007).

Afin de maintenir un niveau d'activation optimal de la voie en réponse à une infection, des systèmes de régulation positive et négative interviennent à différents niveaux. Chez *D. melanogaster*, la voie Imd peut tout d'abord être régulée négativement par des cytokines, telles que Diddel et Eiger (Mabery and Schneider, 2010 ; Lamiable *et al.*, 2016). Son activation est aussi contrôlée par des PGRPs sécrétées à domaine amidasique, telles que PGRP-SC2 ou dans une moindre mesure PGRP-LB, qui clivent le peptidoglycane de manière à le rendre non-immunogène (Costechareyre *et al.*, 2016). La protéine membranaire PGRP-LF inhibe quant à elle l'activation de la voie en empêchant la dimérisation de PGRP-LC (Basbous *et al.*, 2011). Le régulateur cytosolique Pirk, dont l'expression est induite par l'axe Pvf/Pvr/Ras/ERK, empêche la liaison d'Imd à PGRP-LC (Kleino *et al.*, 2008 ; Lee and Ferrandon, 2011). Diverses protéines associées à l'ubiquitination (ex : Iap2, Scrawny, POSH, SCF, Dnr1, Caspar) ou à la désubiquitination (ex : CYLD) participent par ailleurs à la régulation négative de la voie en induisant la dégradation ou en limitant l'activation de ses membres (Kim *et al.*, 2006 ; Guntermann *et al.*, 2009 ; Myllymaki *et al.*, 2014). A l'inverse, la protéine cytosolique Sickie favorise l'activation de Relish (Foley and O'Farrell, 2009), tandis que l'Akirine, un cofacteur de Relish, stimule l'induction de la transcription d'un sous-groupe d'effecteurs immunitaires en s'associant au complexe de modification de la chromatine Brahma (Bonnay *et al.*, 2014).

Parmi les principaux gènes induits par cette voie chez la Drosophile, on retrouve par exemple ceux codant les PAMs Diptéricine A et Attacine D, qui présentent principalement des activités contre les bactéries à Gram négative (Uvell and Engström, 2007 ; Yi *et al.*, 2014). On retrouve également des gènes codant des membres et régulateurs de la voie Imd, tels que Imd et PGRP-LF, ainsi que des membres de la voie Toll, tels que PGRP-SD et Spirit (voir section C/1. c). La voie Imd induit par ailleurs l'expression de gènes impliqués dans la mélanisation, comme proPO-AE, qui code une protéase à sérine activatrice de la proPO, et Punch, une GTP cyclohydrolase synthétisant un cofacteur de Pale, une tyrosine hydroxylase (Yamamoto and Seto, 2014 ; De Gregorio *et al.*, 2002).



**Figure 8 : Voie Imd canonique dans le corps gras de *Drosophila melanogaster*.**  
 Figure modifiée de Ferrandon *et al.*, 2007.

### 1. b. Voies Imd non-canoniques

Certains membres de la voie Imd participent à l'induction de gènes de l'immunité en réponse à d'autres stimuli. Il a par exemple été montré chez *D. melanogaster* que la protéine membranaire STING induit l'expression de gènes tels que les PAMs Attacine A et Cécropine A2 suite à une reconnaissance de dinucléotides cycliques libérés par la bactérie à Gram positive intracellulaire *Listeria monocytogenes*. L'induction par STING de ces gènes immunitaires implique les membres Imd et Relish de la voie Imd, mais elle est indépendante de PGRP-LC (Martin *et al.*, 2018).

Par la suite, il a été montré que STING répond également aux virus picorna-like (virus non-enveloppés à ARN monocaténaire) via un mécanisme dépendant de l' $\kappa$ B kinase Ird5 et de Relish, mais pas des autres membres de la voie Imd. L'activation de cette voie aboutit à la surexpression d'un groupe de gènes différent de ceux induits par la voie canonique. Ces gènes sont pour la plupart de fonction inconnue, mais ils incluent Nazo, dont la surexpression inhibe fortement la réplication virale et qui est considéré comme un potentiel effecteur antiviral. Dans le cadre de cette voie, les mécanismes permettant la reconnaissance des virus ne sont pas encore caractérisés, mais il a été montré qu'ils impliquent le domaine de liaison aux dinucléotides cycliques de STING (Goto *et al.*, 2018).

La protéine adaptatrice Imd est également impliquée dans l'induction de gènes immunitaires, tels que les PAMs Metchnikowine et Diptéricine, en réponse au GBP. Cette voie permet notamment de répondre à des stress non-infectieux, tels que des stress thermiques, qui induisent l'expression et l'activation du GBP chez la Drosophile. Dans ce contexte, la protéine Imd agit conjointement avec l'orthologue Basket de la kinase JNK, et le mécanisme est indépendant des membres Relish, PGRP-LC et PGRP-LE de la voie Imd (Tsuzuki *et al.*, 2012).

### 1. c. Voie Toll

Contrairement à la voie Imd, la voie Toll (Figure 9) est activée de façon indirecte par une cytokine, Spätzle, qui interagit avec le récepteur membranaire Toll à la surface des cellules du corps gras. La cytokine Spätzle, qui est principalement produite par les hémocytes après infection (Irving *et al.*, 2005), est activée dans le plasma par des cascades extracellulaires de cSPs. L'une d'entre elles peut être activée suite à une reconnaissance de  $\beta$ -glucanes fongiques ou de peptidoglycane de type LYS, qui est généralement retrouvé chez les bactéries à Gram positive. Les  $\beta$ -glucanes sont principalement reconnus par la protéine de reconnaissance

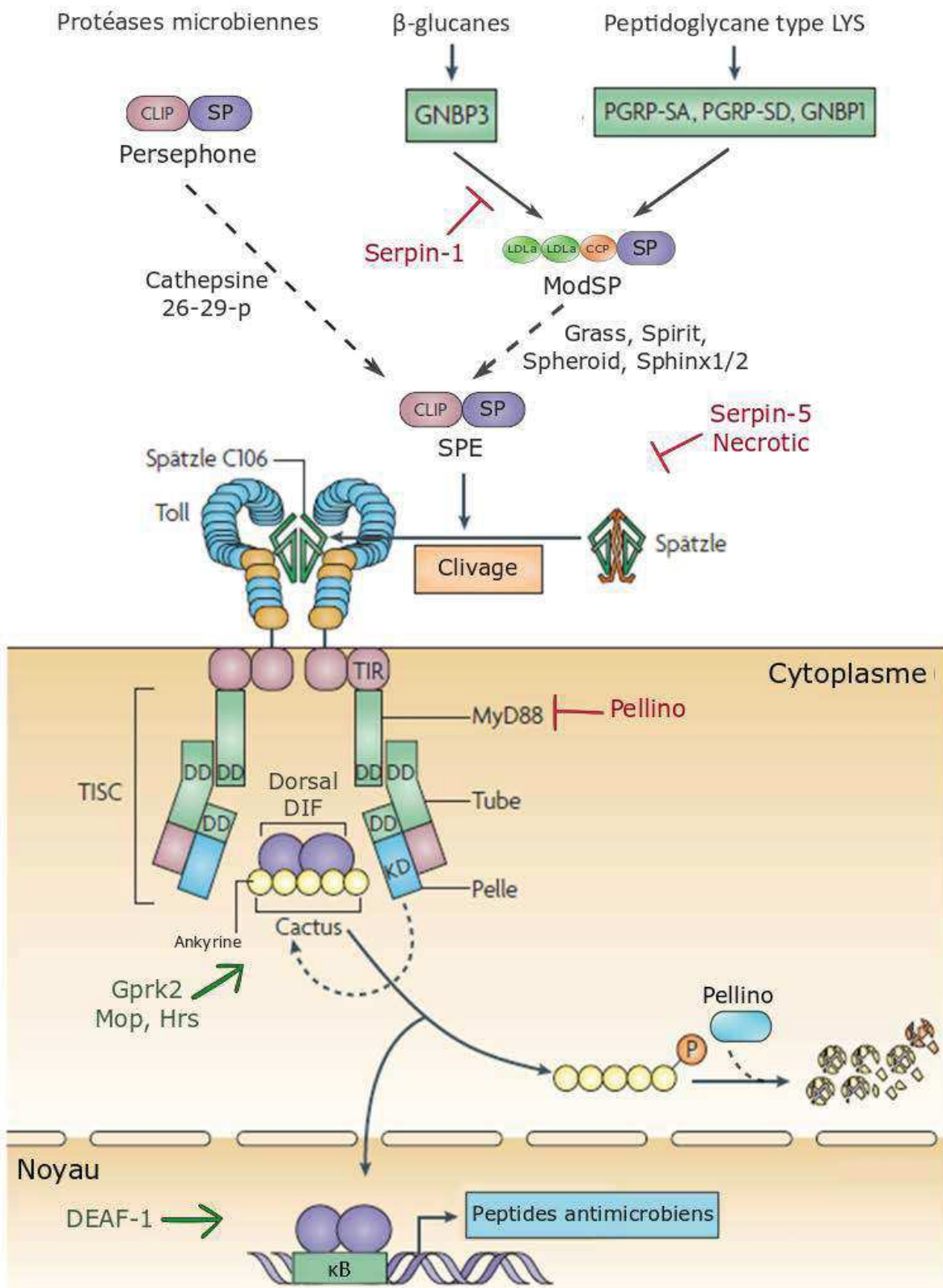


sécrétée GGBP3, tandis que le peptidoglycane peut être reconnu par le dimère GGBP1-PGRP-SA ou par PGRP-SD (Michel *et al.*, 2001 ; Gobert *et al.*, 2003 ; Bischoff *et al.*, 2004 ; Gottar *et al.*, 2006). Cette reconnaissance conduit à l'activation de la protéase à sérine modulaire ModSP, qui active une cascade protéolytique impliquant les cSPs Grass, Spirit, Spheroid, Sphinx1/2 et Spätzle Processing Enzyme (SPE). La dernière cSP de la cascade est SPE, qui active la cytokine Spätzle par protéolyse (Valanne *et al.*, 2011). La seconde cascade responsable de la maturation de Spätzle dans un contexte immunitaire est induite suite à la perception d'activités protéasiques anormales par la cSP plasmatique Persephone. A l'intérieur de son domaine CLIP, Persephone possède une région très sensible à l'hydrolyse par diverses protéases. Le clivage de cette région appât, par exemple par des protéases issues d'organismes pathogènes, induit la maturation de Persephone par la cathepsine plasmatique 26-29-p. Dans quelques cas, Persephone peut également être directement maturée par des protéases exogènes, comme cela a été montré pour la Subtilisine de *Bacillus subtilis*. Persephone active ensuite SPE, qui mature Spätzle (Gottar *et al.*, 2006 ; El Chamy *et al.*, 2008 ; Issa *et al.*, 2018).

Une fois maturée, Spätzle interagit avec le récepteur Toll, ce qui induit sa dimérisation et le recrutement d'un complexe comprenant les protéines adaptatrices MyD88 et Tube ainsi que la kinase Pelle. Pelle s'active par autophosphorylation et agit conjointement avec l'ubiquitine ligase Pellino pour phosphoryler Cactus, et induire sa dégradation. Cactus est l'inhibiteur qui empêche la translocation dans le noyau des facteurs de transcription Dorsal et Dorsal-related immunity factor (DIF) de la voie Toll. La dégradation de Cactus libère le facteur de transcription auquel il est associé, ce qui permet sa dimérisation et sa nucléarisation. Chez l'adulte, seul DIF est exprimé dans le corps gras. Chez la larve, les deux facteurs sont exprimés et peuvent former des homo- et des hétéro-dimères pour induire l'expression de gènes immunitaires en se liant aux motifs  $\kappa$ B présents dans leurs séquences promotrices (Großhans *et al.*, 1999 ; Busse *et al.*, 2007 ; Tanji *et al.*, 2010 ; Valanne *et al.*, 2011).

Les principaux régulateurs négatifs identifiés pour la voie Toll sont des serpins telles que Spn1, Spn5 et Necrotic, qui inhibent les cascades protéolytiques activatrices de Spätzle (Levashina *et al.*, 1999 ; Pelte *et al.*, 2006 ; Ahmad *et al.*, 2009 ; Fullaondo *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été montré que Pellino, qui participe à l'induction de la dégradation de Cactus, peut également présenter un effet inhibiteur, en induisant la dégradation de MyD88 par ubiquitination (Ji *et*

# Hémolymphe



**Figure 9: Voie Toll dans le corps gras de *Drosophila melanogaster*.** Figure modifiée de Ferrandon *et al.*, 2007.

*al.*, 2014). En revanche, la partenaire Pelle de Pellino joue le rôle de régulateur positif, en inhibant l'expression de Cactus via un mécanisme dépendant de la voie signalétique Hippo (Liu *et al.*, 2016). Myopic et Hepatocyte growth factor regulated protein kinase substrate (Hrs), deux protéines qui colocalisent avec Toll dans des vésicules endosomales, induisent quant à elles la dégradation de Cactus par un mécanisme inconnu (Huang *et al.*, 2010). Le récepteur G-protein coupled receptor kinase 2 (Gprk2) active également la voie via une interaction avec Cactus (Valanne *et al.*, 2010). Enfin, le facteur de transcription Deformed epithelial autoregulatory factor 1 (DEAF-1) participe à l'induction des gènes cibles de la voie Toll, en agissant en aval ou en parallèle de Dorsal ou de DIF (Reed *et al.*, 2008 ; Kuttenkeuler *et al.*, 2010).

Parmi les gènes induits par cette voie, on retrouve tout d'abord les Bomanines. Les bomanines constituent une famille de peptides sécrétés impliqués dans les défenses humorales et la résistance aux bactéries à Gram positive et aux organismes fongiques chez *D. melanogaster* (Clemmons *et al.*, 2015 ; Lindsay *et al.*, 2018 ; Hanson *et al.*, 2019). On retrouve également plusieurs membres de la voie Toll, tels que Spätzle, Toll, Pelle, DIF et Cactus, ainsi que le facteur de transcription Relish de la voie Imd (De Gregorio *et al.*, 2002). Enfin, les gènes induits par la voie Toll codent également divers membres du système de la proPO, comme les cSPs Melanization protease 1 (MP1) et proPO-AE ou encore la Serpin 28D (De Gregorio *et al.*, 2002 ; Nakhleh *et al.*, 2017).

#### **1. d. Coopération des voies Imd et Toll**

Les voies Imd et Toll peuvent coopérer pour induire l'expression de divers gènes cibles. Ce mode de régulation a en effet été mis en évidence par l'utilisation de mutants simples et double des gènes *relish* et *spätzle* chez *D. melanogaster*. Cette analyse a montré que l'expression d'une majorité de gènes induits après blessure septique est dépendante des deux voies. Environ un tiers d'entre eux peuvent être induits soit par la voie Imd soit par la voie Toll, tandis que l'induction des autres gènes semble nécessiter la coopération des deux voies. Les gènes induits par la voie Imd ou par la voie Toll incluent neuf PAMs présentant divers spectres d'activités, ainsi que des gènes impliqués dans la mélanisation et dans les voies Toll et JNK. Les gènes dont l'induction requière la coopération des deux voies incluent cinq PAMs ainsi que des molécules de reconnaissance de types PGRPs et TEPs, et quelques gènes impliqués dans le système de la proPO (De Gregorio *et al.*, 2002).

Ces profils d'induction s'expliquent en partie par la configuration des promoteurs en amont des gènes induits par les voies Imd et Toll. Par exemple, le promoteur du gène codant le PAM Metchnikowine comprend un motif  $\kappa$ B capable de lier aussi bien Relish que DIF. Les promoteurs des gènes codant l'Attacine A et la Diptéricine contiennent une combinaison de motifs  $\kappa$ B spécifiques de Relish et de DIF ou Dorsal. Dans le cas de la Diptéricine, l'induction du gène par Relish est considérablement augmentée par la fixation de DIF sur le promoteur (Busse *et al.*, 2007). Ce mode de régulation peut expliquer certains profils d'induction nécessitant l'activation des deux voies.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont par ailleurs montré que des dimères Relish/DIF et Relish/Dorsal se forment spontanément chez la Drosophile. Ces dimères peuvent se fixer sur des sites  $\kappa$ B spécifiques, et induire l'expression de gènes immunitaires tels que celui codant le PAM Drosomycline (Tanji *et al.*, 2010).

#### **1. e. Autres voies d'induction**

L'expression des PAMs peut également être régulée par d'autres voies en réponse à un changement du statut physiologique de l'insecte. Par exemple, il a été montré chez *D. melanogaster* que la réponse inflammatoire induit une stimulation du métabolisme catabolique via une inhibition de la signalisation associée à l'Insuline. Cette répression permet l'activation du facteur de transcription FOXO, qui participe à l'induction de l'expression des PAMs dans le corps gras (Lee and Lee, 2018). De la même manière, la répression de la voie TOR, qui agit en aval de l'insuline, peut induire l'expression de PAMs spécifiques via un mécanisme dépendant du facteur de transcription Forkhead (Teleman, 2010 ; Varma *et al.*, 2014).

Un autre exemple de régulation liée à l'état physiologique de l'insecte est celui de la voie des MAP kinases p38, qui est induite en réponse au stress. Cette voie est notamment impliquée dans la régulation de différentes réponses immunitaires, incluant la réponse humorale systémique. Il a en effet été montré chez *D. melanogaster* que la MAP kinase p38b régule positivement l'expression d'un sous-groupe de PAMs (ex : Défensine, Diptéricine B), tandis qu'elle régule négativement l'expression d'autres PAMs (ex : Attacine A, Cécropine B) (Chen *et al.*, 2010).

Enfin, l'induction de la réponse humorale systémique pourrait être liée à celle des réponses cellulaires. Des travaux réalisés sur différents modèles lépidoptères suggèrent en effet que

l'expression des PAMs peut être stimulée par l'axe PSP/NOS/PLA<sub>2</sub>, l'une des voies impliquées dans l'induction des réponses cellulaires chez ces modèles. Ces travaux suggèrent par ailleurs que ces mécanismes de régulation s'inscrivent dans une boucle de rétrocontrôle positif par laquelle les voies Imd et Toll activent à leur tour la production de NO et la voie des éicosanoïdes (Ishii *et al.*, 2013 ; Sadekuzzaman *et al.*, 2018 ; Sadekuzzaman and Kim, 2018). Des travaux plus parcellaires réalisés sur différents modèles diptères indiquent que ces mécanismes sont probablement conservés au sein des différents ordres d'insectes (Nappi *et al.*, 2000 ; Foley and O'Farrell, 2003).

## **2. Effecteurs antimicrobiens**

A l'issue de l'activation des voies signalétiques évoquées précédemment, la réponse systémique d'un insecte repose en grande partie sur l'arsenal de facteurs protéiques à activités antimicrobiennes qu'il produit. Parmi eux, les facteurs les mieux caractérisés sont les PAMs, qui sont généralement considérés comme les principaux effecteurs des réponses systémiques. Toutefois, d'autres facteurs tels que les Lysozymes, qui sont retrouvés chez une grande diversité d'insectes, et les Bomanines, des peptides appartenant à une famille spécifique au genre *Drosophila*, peuvent également jouer un rôle important dans ces réponses.

### **2. a. Peptides antimicrobiens**

Il existe une grande diversité de PAMs chez les insectes, dont la nature et le nombre peuvent considérablement varier d'une espèce à l'autre (Viljakainen *et al.*, 2015). Ces PAMs sont regroupés en quatre classes en fonction de leurs caractéristiques structurales et/ou biochimiques (composition en acides aminés) et peuvent présenter des activités contre des bactéries, des organismes fongiques, et plus occasionnellement, contre des virus et des protozoaires. Chacune des classes de PAMs peut être subdivisée en une ou plusieurs familles de peptides présentant des séquences homologues (Yi *et al.*, 2014). Bien que les spectres d'activités des PAMs puissent varier en fonction d'affinités particulières pour certaines espèces microbiennes (Hanson *et al.*, 2019) ou de synergies établies avec d'autres effecteurs antimicrobiens produits par l'insecte (Hara and Yamakawa, 1995 ; Zdybicka-Barabas *et al.*, 2012 ; Rahnamaeian *et al.*, 2015 ; Rahnamaeian *et al.*, 2016 ; Hanson *et al.*, 2019), la classe et la famille auxquelles ils appartiennent donnent une bonne indication sur leurs modes d'action

et sur les types de microorganismes qu'ils peuvent ou non cibler (Yi *et al.*, 2014). Dans cette section, je décrirai donc les caractéristiques générales des classes de PAMs des insectes ainsi que des principales familles qui les composent, en indiquant leurs spectres d'activités les plus probables et les ordres d'insectes chez lesquels elles peuvent être retrouvées.

La classe des PAMs à hélice  $\alpha$  comprend les familles des Cécropines et des Moricines. Les Cécropines sont de petits peptides cationiques de 31 à 39 acides aminés. Elles ont été identifiées chez divers modèles diptères, lépidoptères et coléoptères, bien que leurs noms puissent varier d'une espèce à l'autre. En milieu hydrophobe, leur structure secondaire est caractérisée par la présence de deux hélices  $\alpha$  reliées entre elles par une région charnière. Elles agissent probablement par déstabilisation des membranes cellulaires et présentent généralement un spectre d'activités large, avec des activités contre des bactéries à Gram négative, à Gram positive et antifongiques. Les Moricines sont des peptides cationiques de 40 à 45 acides aminés qui ne sont retrouvés que chez les lépidoptères. Elles se structurent en longue hélice  $\alpha$  en milieu hydrophobe et présentent des spectres d'activités proches de ceux des Cécropines (Yi *et al.*, 2014).

Les PAMs à motif  $CS\alpha\beta$  peuvent tous être inclus dans la grande famille des Défensines. Il s'agit de peptides cationiques de 34 à 51 acides aminés comprenant une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$  antiparallèle reliés entre eux par trois à quatre ponts disulfure (Cystein-Stabilized  $\alpha\beta$ ,  $CS\alpha\beta$ ). Ces peptides ont été retrouvés chez des modèles diptères, lépidoptères, coléoptères, hémiptères, hyménoptères et odonates. Ils présentent généralement des activités dirigées contre les bactéries à Gram positive, mais peuvent aussi présenter des spectres d'activités plus vastes ou spécifiquement dirigés contre les organismes fongiques, comme dans le cas de la Drosomycine du diptère *D. melanogaster* et de la Gallerimycine du lépidoptère *G. mellonella* (Yi *et al.*, 2014). Dans le cadre d'une étude du mode d'action des Défensines vis-à-vis des levures *Candida albicans* et *Pichia pastoris*, il a été montré que l'activité antifongique de l'Heliomycine, une Défensine du lépidoptère *Heliothis virescens*, est dépendante de sa liaison aux glucosylcéramides des levures. Ce résultat suggère que les Défensines antifongiques pourraient agir par déstabilisation des membranes cellulaires (Thevisen *et al.*, 2004). Par ailleurs, des travaux menés sur des Défensines d'huître (Schmitt *et al.*, 2010) ou de champignon (Schneider *et al.*, 2010) présentant des structures similaires à celles des insectes mettent en évidence une inhibition de la synthèse de la paroi de peptidoglycane chez la

bactérie à Gram positive *Staphylococcus aureus*. Cette inhibition, qui résulterait d'une séquestration du précurseur Lipide II, pourrait constituer le principal mode d'action des Défensines lors des réponses antibactériennes.

La classe des PAMs riches en prolines ne comprend qu'une famille bien définie chez les insectes : celle des Lébozines, qui est spécifique aux lépidoptères. Les Lébozines sont de petits peptides O-glycosylés de 22 à 32 acides aminés. Elles sont synthétisées sous la forme de précurseurs, qui sont maturés par clivage protéolytique de façon intra- ou extracellulaire. Ces peptides sont généralement actifs contre les bactéries à Gram négative et à Gram positive, ainsi que contre quelques organismes fongiques. La classe des PAMs riches en prolines comprend également divers peptides sans homologie de séquence identifiés au sein d'espèces diptères, hyménoptères et hémiptères (Yi *et al.*, 2014). Ces peptides incluent par exemple la Drosocine et la Metchnikowine de *D. melanogaster*, qui sont respectivement impliqués dans les réponses antibactériennes et antifongiques (Hanson and Lemaitre, 2020). Ils incluent également les PAMs d'hyménoptères Abaecine et Apidaecine, qui exercent leurs activités antibactériennes par inhibition de la protéine chaperone DNaK et/ou de la sous-unité ribosomale 50S chez la bactérie à Gram négative *Escherichia coli* (Castle *et al.*, 1999 ; Otvos *et al.*, 2000 ; Krizsan *et al.*, 2014 ; Rahnamaeian *et al.*, 2015).

La classe des PAMs riches en glycines est très diversifiée, et comprend deux familles bien définies : les Attacines, retrouvées chez les lépidoptères et certains diptères, et les Glovérines, qui sont spécifiques aux lépidoptères. Le terme de peptide est en réalité inexact pour les Attacines, puisque leur taille est d'environ 200 acides aminés. Elles sont synthétisées sous la forme de précurseurs, qui sont maturés par clivage protéolytique avant sécrétion. Les Attacines ont tendance à se structurer en hélices  $\alpha$  en milieu hydrophobe et elles peuvent être chargées positivement ou négativement. Ces PAMs présentent principalement des activités contre les bactéries à Gram négative, dont elles peuvent perméabiliser les membranes et/ou inhiber la production de protéines de la membrane externe (Engström *et al.*, 1984 ; Carlsson *et al.*, 1991). Il a par ailleurs été montré chez *D. melanogaster*, que le propeptide clivé lors de la maturation de l'Attacine C peut également présenter des activités contre les bactéries à Gram négative (Rabel *et al.*, 2004). Les Glovérines sont elles aussi des protéines, dont la taille est d'environ 130 acides aminés. Elles possèdent une structure secondaire en hélice  $\alpha$  et peuvent être neutres, chargées positivement ou chargées

négativement. Tout comme les Attacines, elles sont synthétisées sous la forme de précurseurs maturés par clivage protéolytique et sont surtout actives contre les bactéries à Gram négative. Indépendamment de ces deux sous-familles, on retrouve des peptides riches en glycine chez une importante diversité d'insectes, incluant des diptères, des coléoptères, des hémiptères et des hyménoptères (Yi *et al.*, 2014).

## **2. b. Lysozymes et protéines Lysozyme-like**

Les lysozymes et les protéines Lysozyme-like (LLPs) représentent une autre catégorie d'effecteurs antimicrobiens très répandue chez les insectes. Les lysozymes sont des protéines sécrétées d'environ 120 acides aminés possédant un domaine muramidase qui dégrade le peptidoglycane bactérien. Cette propriété leur confère généralement une activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries à Gram positive, mais aussi des bactéries à Gram négative, grâce à des synergies avec des PAMs déstabilisant la membrane externe des bactéries (Callewaert and Michiels, 2010). Chez les insectes, certains lysozymes peuvent par ailleurs présenter des activités antifongiques ou antivirales, mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore caractérisés (Sowa-Jasilek *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2018). Les LLPs sont des lysozymes dont le domaine muramidase n'est pas fonctionnel. Ces protéines peuvent néanmoins posséder des activités antibactériennes via un mécanisme dépendant de leurs interactions avec le peptidoglycane (Gandhe *et al.*, 2007). Tout comme les lysozymes, les LLPs peuvent également présenter des activités antivirales (Satyavathi *et al.*, 2018).

## **2. c. Bomanines**

Les Bomanines constituent une famille de peptides sécrétés uniquement retrouvés au sein du genre diptère *Drosophila*. Chez l'espèce *D. melanogaster*, ces peptides sont parmi les facteurs les plus surexprimés après activation de la voie Toll (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998 ; De Gregorio *et al.*, 2002 ; Boutros *et al.*, 2002) et plusieurs travaux suggèrent qu'ils jouent un rôle important dans la réponse systémique de l'insecte à différents types d'infections. Il a en effet été montré que la délétion de dix des douze gènes correspondant au répertoire de Bomanines de *D. melanogaster* induit une réduction drastique de sa survie à l'infection par plusieurs bactéries à Gram positive et organismes fongiques (Clemmons *et al.*, 2015 ; Hanson *et al.*, 2019).



Les Bomanines sont caractérisées par la présence de motifs conservés, qui correspondent à des régions de 16 résidus comportant une séquence CXXC. Ces peptides sont maturés par clivage protéolytique et peuvent être de trois types. Le premier type correspond à une forme courte de 16 à 17 résidus comprenant uniquement le motif caractéristique des Bomanines. Le second correspond à une forme flanquée, qui comprend un motif caractéristique des Bomanines suivi d'une séquence de 15 à 82 résidus à l'extrémité C-terminale. Le dernier type correspond à une forme longue comportant deux répétitions du motif caractéristique des Bomanines séparées par une séquence de 43 à 103 résidus (Clemmons *et al.*, 2015).

Bien que leurs activités biochimiques soient encore inconnues et qu'aucune homologie de séquence avec des PAMs connus n'ait été relevée, plusieurs éléments permettent de considérer les Bomanines comme de probables effecteurs de l'immunité antimicrobienne. Tout d'abord, il a été montré que les Bomanines ont bien un impact sur la résistance de l'insecte aux infections, mais pas sur sa résilience (Clemmons *et al.*, 2015). Il a également été montré que les Bomanines ont un impact sur l'activité antimicrobienne du plasma de l'insecte *ex vivo* (Lindsay *et al.*, 2018), mais pas sur la mélanisation et les réponses cellulaires *in vivo* (Clemmons *et al.*, 2015). Enfin, il a été montré que ces peptides n'ont pas d'influence sur le niveau d'activation de la voie Toll (Clemmons *et al.*, 2015), ainsi que sur la maturation des PAMs antifongiques Drosomycine et Metchnikowine de *D. melanogaster* (Lindsay *et al.*, 2018), ce qui suggère qu'ils agissent bien en aval de la voie Toll, et probablement en parallèle des PAMs de l'insecte lors de la réponse systémique. Toutefois, l'existence d'une activité antimicrobienne au sein de cette famille de peptides reste à confirmer, puisque les mesures d'activités antimicrobiennes réalisées sur des Bomanines synthétiques n'ont donné aucun résultat significatif à ce jour (Lindsay *et al.*, 2018).

L'existence de ces peptides laisse penser que d'autres effecteurs antimicrobiens encore non-caractérisés et spécifiques à certains taxons d'insectes pourraient jouer un rôle primordial dans leurs réponses systémiques et humorales aux infections.

## **D. ARN interférence**

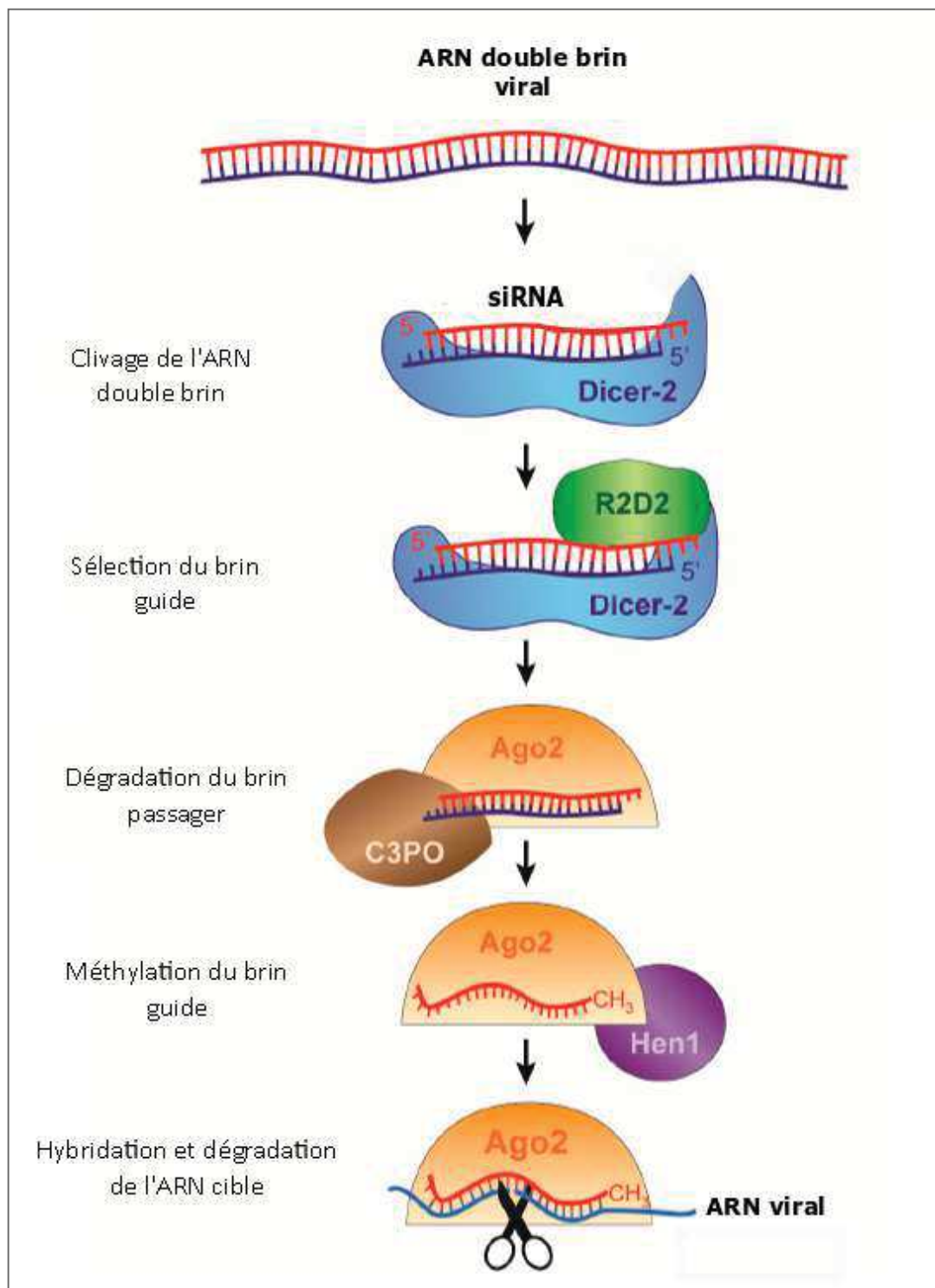
L'ARN interférence représente un cas particulier de réponse locale ou systémique, qui est spécifiquement dirigée contre les pathogènes viraux. Il s'agit d'un mécanisme ancestral et conservé au sein du vivant, qui permet de dégrader et/ou d'altérer les fonctions d'ARNs

endogènes ou exogènes. Quatre voies de l'ARN interférence ont été décrites chez les insectes, et deux d'entre elles, la voie des petits ARNs interférents (siRNAs) exogène et celle des ARNs interagissant avec les protéines Piwi (piRNAs) peuvent être impliquées dans la réponse immunitaire antivirale (Karlikow *et al.*, 2014).

### **1. Voie des siRNAs exogène**

Dans un contexte immunitaire, la voie des siRNAs exogène est initiée dans le cytosol, par de longs ARN bicaténaires viraux (Figure 10). Ces ARNs peuvent provenir de virus possédant un génome à ARN bicaténaire, mais aussi de virus à ARN monocaténaire formant des structures secondaires, ou encore de virus à ADN produisant des ARNs antisens (Karlikow *et al.*, 2014). Chez *D. melanogaster*, ces ARNs sont reconnus par un complexe comprenant la protéine de liaison aux ARNs bicaténaires R2D2 et l'endoribonucléase Dicer 2, qui clive les ARNs viraux en petits fragments bicaténaires de 21 nucléotides (siRNAs). Au cours du clivage de l'ARN cible, le complexe Dicer 2/R2D2 s'associe au complexe protéique RISC, qui comprend les endoribonucléases Argonaute 2 et C3PO (constituée des sous-unités Transline et Trax). Cette association permet le clivage par Argonaute 2 et C3PO de l'un des brins du siRNA formé, suite à une fixation de R2D2 à son extrémité 5'. L'autre brin, appelé brin guide, est en revanche incorporé dans le complexe RISC, où il s'associe à Argonaute 2 et est méthylé à son extrémité 3' par la méthyltransferase Hen1. Le complexe RISC ainsi mûri s'associe aux ARNs viraux par complémentarité de séquence avec le brin guide, ce qui permet à Argonaute 2 de cliver le brin complémentaire 10 paires de bases en aval de l'extrémité 5' du brin guide. Les fragments d'ARNs viraux résultant de ce clivage sont ensuite dégradés par les ribonucléases cellulaires (Schuster *et al.*, 2019).

L'induction de ce mécanisme de défense dans des cellules infectées peut conduire à la production d'une réponse systémique antivirale, via la phagocytose des cellules infectées par les hémocytes circulants. Les hémocytes sont en effet capables de produire des ADN complémentaires aux ARNs viraux via la mobilisation de transcriptases inverses issues d'éléments transposables. Ces ADN permettent de générer une grande quantité de siRNAs, qui sont ensuite distribués aux cellules environnantes par des vésicules de type exosome. Les ADNc produits confèrent une protection durable contre les infections par le virus rencontré,



**Figure 10 : Voie des siRNAs exogènes de *Drosophila melanogaster*.**  
 Figure modifiée de Schuster *et al.*, 2019.

ce qui suggère qu'il existe une forme d'immunité adaptative antivirale chez *D. melanogaster* (Tassetto *et al.*, 2017).

## 2. Voie des piRNAs

Les piRNAs sont des ARNs simple brins de 23 à 29 nucléotides de long, qui sont produits à partir d'ARNs monocaténaux précurseurs. Les précurseurs sont généralement issus de la transcription sens et antisens de régions génomiques contenant des éléments transposables non-fonctionnels. Ils sont ensuite maturés dans des structures cytosoliques particulières appelées corps Yb, via un mécanisme dépendant des protéines Yb, Sister of Yb, Armitage, Vreteno, Shutdown et Zucchini. Chez *D. melanogaster*, les piRNAs peuvent ensuite être pris en charge par les endoribonucléases Piwi, Aubergine ou Argonaute 3 dans les cellules de la lignée germinale, ou uniquement par Piwi dans les cellules de la lignée somatique. Dans la lignée germinale, la prise en charge des piRNAs sens et antisens par Argonaute 3 et Aubergine respectivement, conduit au clivage de l'ARN cible en 3' et en 5' de la zone d'hybridation du piRNA. Ce mode de clivage permet d'amplifier les piRNAs de façon cible-dépendante. Chez la Drosophile, la fonction principale de cette voie est de contrôler l'activité des éléments transposables (Lau *et al.*, 2009 ; Olivieri *et al.*, 2010 ; Yamashiro and Siomi, 2018). Des études menées sur les modèles *A. aegypti* et *A. albopictus* ont toutefois montré qu'une voie non-canonique des piRNAs peut jouer un rôle dans la réponse des cellules de la lignée somatique aux arbovirus à ARN monocaténaire. Cette voie semble impliquer une amplification cible-dépendante des piRNAs similaire à celle observée dans la lignée germinale de la Drosophile (Morazzani *et al.*, 2012 ; Vodovar *et al.*, 2012).

## Conclusion

Notre connaissance des bases signalétiques et des mécanismes de l'immunité des insectes s'est considérablement étendue au cours des dernières décennies. Elles ont été en grande partie élucidées grâce à l'utilisation des outils de manipulation génétique disponibles pour l'organisme modèle *D. melanogaster*. Ces outils ont en effet permis d'identifier les fonctions d'un nombre important d'acteurs moléculaires impliqués dans les défenses épithéliales, l'hématopoïèse, la phagocytose, les réponses humorales systémiques et les réponses antivirales. En parallèle, des travaux menés sur des espèces lépidoptères telles que *M. sexta*

ou encore *S. exigua* ont permis d'améliorer notre compréhension des réponses d'encapsulation, de nodulation ainsi que de mélanisation. Ils ont également permis d'identifier des cytokines et autres médiateurs non-protéiques qui font le lien entre toutes les composantes de l'immunité des insectes. La poursuite de ces travaux devrait à terme permettre d'obtenir une vision plus intégrée du fonctionnement global du système immunitaire. En parallèle, l'étude de l'immunogénome et des fonctions d'effecteurs et de récepteurs de l'immunité chez diverses espèces d'intérêt suggère l'existence d'une grande hétérogénéité de modalités de reconnaissance et de destruction des pathogènes, qui doit être prise en compte dans le cadre de l'étude de leurs interactions avec les pathogènes.

## **II. Les complexes nématobactériens entomopathogènes et leurs interactions avec le système immunitaire des insectes**

Les complexes nématobactériens (CNBs) entomopathogènes sont des pathogènes d'insectes particuliers, constitués de deux organismes en association symbiotique et mutualiste. Le premier d'entre eux est un nématode microscopique qui vit dans les sols. Il s'agit d'un ver rond pourvu de systèmes nerveux, digestif, reproducteur et d'excrétion, et entouré d'une cuticule constituée de protéines, de lipides et de glucides (Basyoni and Rizk, 2016). Le second est une bactérie à Gram négative, que le nématode porte généralement dans son intestin lorsqu'il est hors d'un hôte. Dans le cadre de ces associations, le partenaire nématode sert avant tout de vecteur à la bactérie, tandis que la bactérie augmente la virulence et/ou crée des conditions favorables à la croissance du nématode dans le cadavre de l'hôte (Forst and Clark, 2002). Les premières découvertes de nématodes entomopathogènes ont eu lieu dans les années 1920. L'existence de leurs partenaires bactériens a ensuite été mise en évidence dans les années 1950 (Poinar and Grewal, 2012). Depuis, plus d'une centaine de CNBs entomopathogènes ont été identifiés (Labaude and Griffin, 2018). En raison de l'originalité de ces associations et de leur intérêt pour la lutte biologique contre les insectes ravageurs de cultures, leurs écologies et de leurs biologies ont été fortement étudiés. Dans cette deuxième partie d'introduction, je commencerai par décrire la diversité et les liens de parenté entre les CNBs découverts à ce jour. Je présenterai ensuite les principales informations dont nous disposons concernant leurs répartitions spatiales, leurs habitats et leurs spectres d'hôtes. Enfin, je détaillerai leurs cycles de vie à l'intérieur du corps des insectes, en me focalisant en particulier sur l'un des aspects les plus étudiés de l'interaction : leurs stratégies d'échappement aux défenses immunitaires de leurs hôtes.

### **A. Origines et diversité**

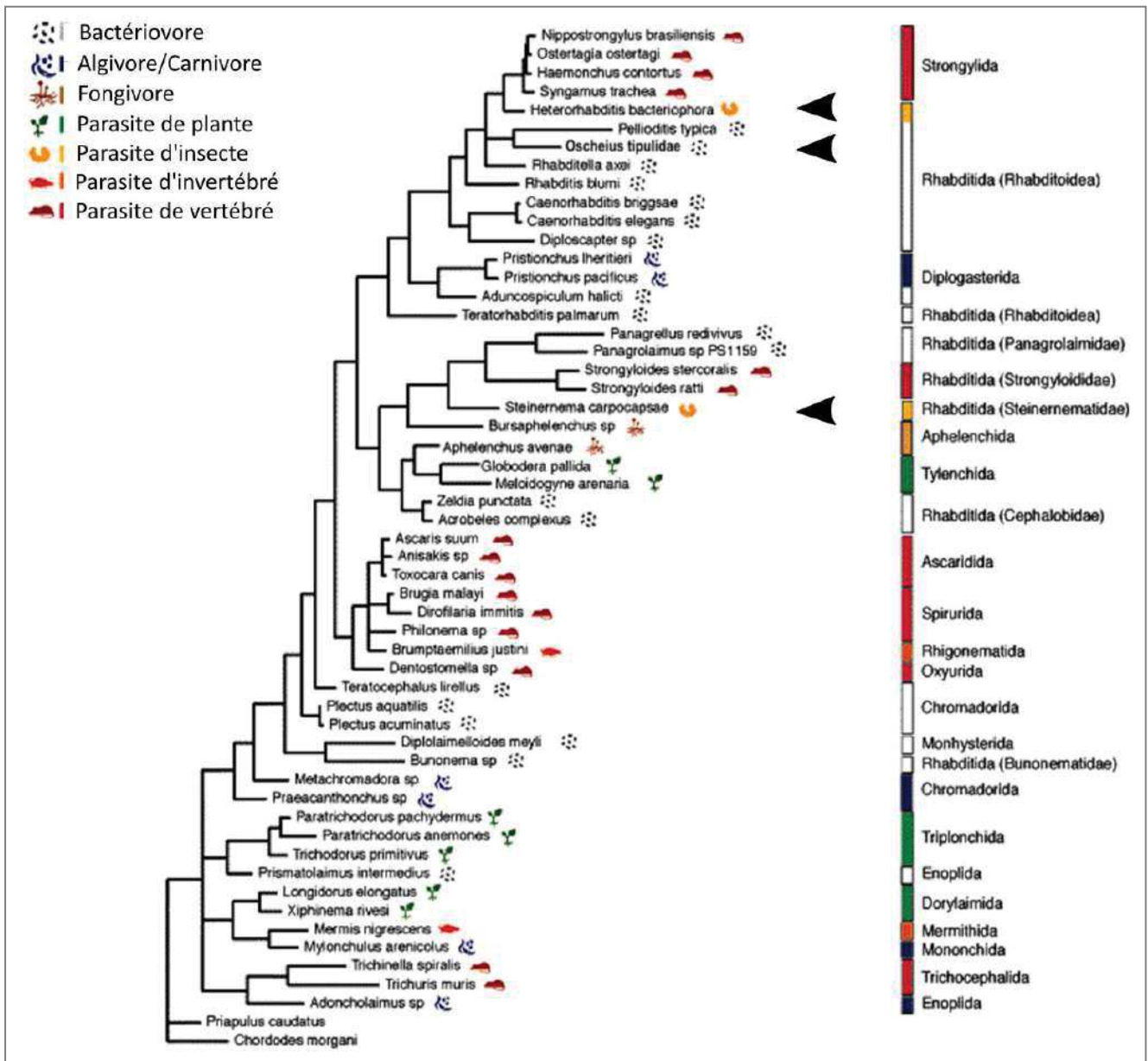
#### **1. Emergences au cours de l'évolution des nématodes**

L'embranchement Nematoda est un phylum ancien dont la diversité est estimée à 100 000 à 10 millions d'espèces (Schafer, 2016). Bien que l'ancêtre commun à tous les nématodes ait probablement été autonome, nombre d'entre eux sont devenus parasites de végétaux et d'animaux au cours de leurs histoires évolutives (Blaxter and Koutsovoulos, 2015). Dans le cas

des nématodes entomopathogènes, la pathogénicité repose systématiquement sur une association symbiotique et mutualiste avec des bactéries qui les assistent dans leurs cycles de vie parasites. Selon l'état actuel de nos connaissances, ces nématodes peuvent appartenir à trois genres : *Steinernema*, *Heterorhabditis* et *Oscheius* (Dillman *et al.*, 2012). Toutes les espèces appartenant aux genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* sont entomopathogènes et associées de façon stable avec des entérobactéries des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*, respectivement (Forst and Clarke, 2002). En revanche, seules deux espèces du genre *Oscheius* sont considérées comme de véritables entomopathogènes (Dillman *et al.*, 2012). L'émergence de nématode entomopathogènes au sein de ce genre est considérée comme plus récente ou anecdotique et la stabilité de leurs associations avec leurs symbiotes, des entérobactéries du genre *Serratia*, est plus incertaine (Zhang *et al.*, 2008 ; Fu and Liu, 2019 ; Torres-Barragan *et al.*, 2011).

Dès 1993, l'étude des caractères morphologiques des nématodes *Steinernema* et *Heterorhabditis* a conduit à l'hypothèse d'une évolution par convergence de ces deux lignées, qui auraient acquis leurs modes de vie parasites de façon indépendante (Poinar, 1993). Depuis, diverses analyses phylogénétiques ont montré que les trois genres de nématodes entomopathogènes ont émergé de façon indépendante (Adams and Nguyen, 2002 ; Holterman *et al.*, 2006 ; van Megen *et al.*, 2009). Les études ayant fourni les résultats les plus précis sont basées sur les séquences de l'ARN ribosomique 18S des nématodes. Elles mettent en évidence une proximité du genre *Steinernema* avec les Strongyloididae (parasites de vertébrés) et les Panagrolaimoidae (autonomes), et une proximité des genres *Heterorhabditis* et *Oscheius* avec les Rhabditidae et les nématodes du genre *Pellioditis* (autonomes) (Figure 11) (Blaxter *et al.*, 1998 ; Spiridonov and Subbotin, 2016 ; van Megen *et al.*, 2009). Sur la base de la répartition géographique des nématodes *Steinernema* et *Heterorhabditis* actuels, Poinar a émis l'hypothèse d'une existence antérieure à la dislocation de la Pangée, à la fin du Permien (~250 millions d'années) (Poinar and Grewal, 2012). L'origine ancienne des Heterorhabditidae a par ailleurs été confirmée par un fossile datant du Crétacé inférieur (100-145 millions d'années), qui suggère que les proto-Heterorhabditidae auraient déjà adopté leur style de vie parasite à cette période (Poinar, 2011).

Les bactéries des genres *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* et *Serratia* appartiennent toutes à la famille des Enterobacteriaceae, qui comprend de nombreuses espèces entretenant des



**Figure 11 : Positions des genres *Steinernema*, *Heterorhabditis* et *Oscheius* dans la phylogénie des nématodes.** Figure modifiée de Blaxter *et al.*, 1998. L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences 18S des nématodes. Il correspond à un consensus entre les arbres obtenus selon la méthode du maximum de vraisemblance et la méthode du maximum de parcimonie. Les flèches noires indiquent les positions des espèces représentantes des genres *Steinernema*, *Heterorhabditis* et *Oscheius*.

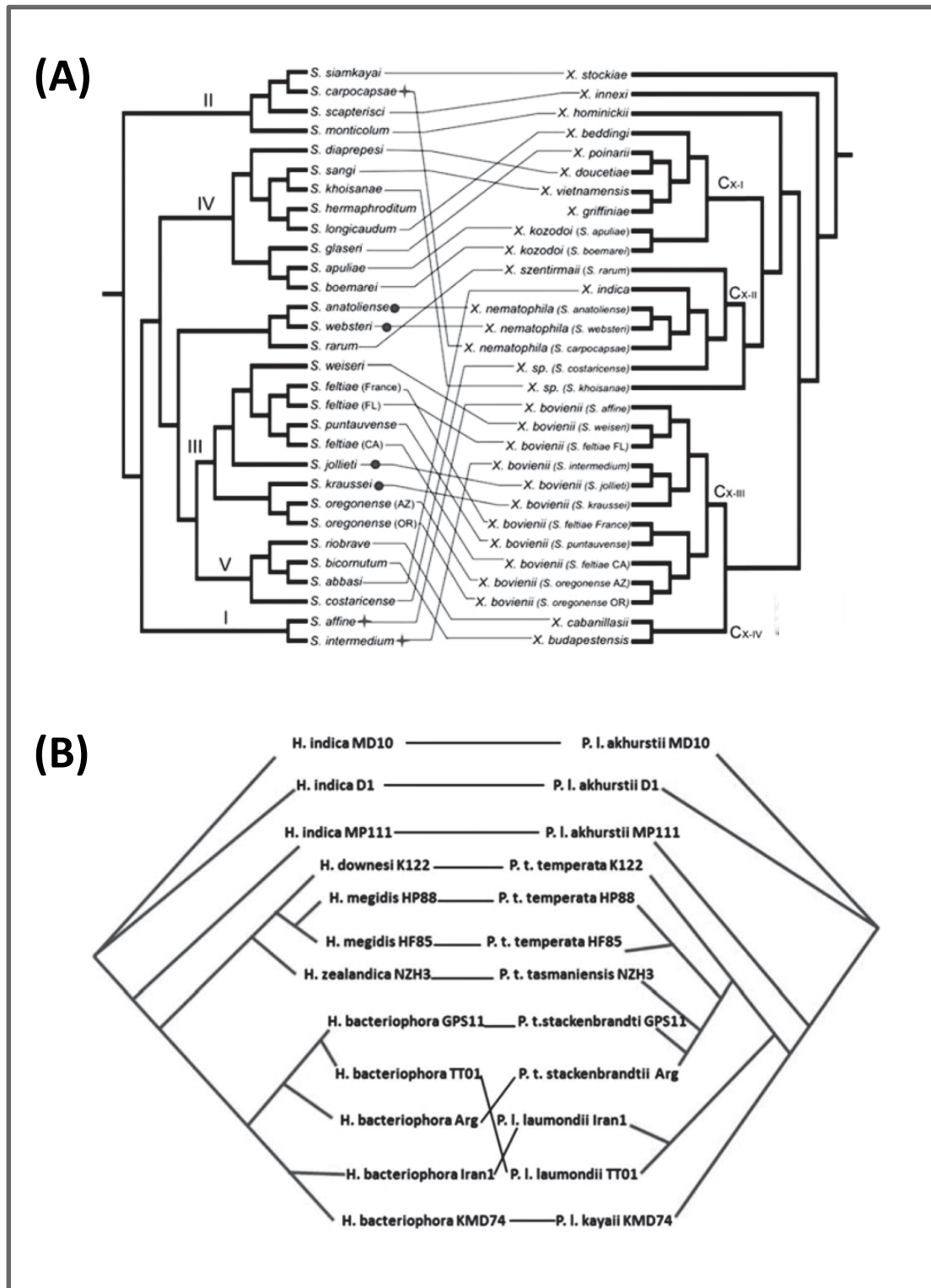


relations pathogènes (ex : *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*), commensales (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) ou mutualistes (ex : *Buchnera aphidicola*, *Sodalis glossinidius*) avec l'homme et les animaux (Husnik *et al.*, 2011 ; Schierack *et al.*, 2007 ; Ruiu *et al.*, 2015 ; Donnenberg *et al.*, 2015). D'après l'analyse phylogénétique des ARN ribosomiques 16S des membres de cette famille, les genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* partagent leur plus récent ancêtre commun (Spröer *et al.*, 1999 ; Moran *et al.*, 2005 ; Chaston *et al.*, 2011). L'hypothèse majoritaire est que cet ancêtre, probablement libre et entomopathogène, se serait indépendamment intégré dans la lignée des Steinernematidae et dans celle des Heterorhabditidae, jusqu'à ne plus être retrouvé sous sa forme libre (Dowds and Peters, 2002 ; Chaston *et al.*, 2011). Le genre *Serratia* possède des liens phylogénétiques plus lointains avec les genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* (Spröer *et al.*, 1999) et, comme indiqué précédemment, son association avec des nématodes entomopathogènes reste anecdotique (Petersen and Tisa, 2013).

## 2. Diversités d'espèces et d'associations

La diversité des complexes *Oscheius-Serratia* est encore difficile à estimer, notamment en raison de l'existence d'un continuum allant de la nécromélie (utilisation de carcasses comme ressource nutritive) à la pathogénicité vis-à-vis des insectes chez le genre *Oscheius* (Dillman *et al.*, 2012 ; Campos-Herrera *et al.*, 2015). Les deux complexes reconnus comme entomopathogènes sont *O. chongmingensis-S. nematodiphila* (Zhang *et al.*, 2008) et *O. carolinensis-S. marcescens* (Torres-Barragan *et al.*, 2011), dont les partenaires nématodes appartiennent au même clade, celui des *Insectivora* (Ye *et al.*, 2018). Ce clade contient environ 9 espèces identifiées à ce jour (Ye *et al.*, 2018 ; Serepa-Dlamini and Gray, 2018 ; Valizadeh *et al.*, 2017), mais la nature de leurs interactions avec les insectes et les bactéries du genre *Serratia* n'ont pas encore été caractérisées pour la plupart d'entre elles.

La diversité des complexes *Steinernema-Xenorhabdus* a quant à elle été fortement explorée, permettant l'identification de 90 espèces de nématodes (réparties en 5 à 12 clades) et 26 espèces de symbiotes bactériens (Laubaude and Griffin, 2018 ; Sajnaga *et al.*, 2018). Bien que quelques espèces bactériennes, comme *X. bovienii* ou *X. poinarii*, puissent être associées à plusieurs espèces de nématodes, chaque espèce de nématode n'est associée qu'à une espèce du genre *Xenorhabdus* (Sajnaga *et al.*, 2018), ce qui restreint la diversité des complexes. Cette



**Figure 12 : Cophylogénies des partenaires nématodes et bactériens des complexes nématobactériens entomopathogènes.** Les arbres cophylogénétiques sont issus de Stock in Campos-Herrera, 2015. L'arbre correspondant aux complexes *Steinernema-Xenorhabdus* (A) a été modifié de Lee and Stock, 2010. Il a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance à partir des séquences *28S*, *12S* et *COI* des nématodes et des séquences *16S*, *RecA* et *SerC* des bactéries. L'arbre correspondant aux complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* (B) a été modifié de Maneesakorn *et al.*, 2011. Il a été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance à partir des séquences *ITS* des nématodes et des séquences *GyrB* des bactéries.

spécificité d'association résulte d'une forte co-évolution entre les deux partenaires dont les rôles respectifs peuvent varier d'un CNB à l'autre (Boemare, 2002 ; Ogier *et al.*, 2014). Cette coévolution a été confirmée par des expériences de réassociation nématode-bactérie, qui ont montré une baisse de fitness chez les nématodes associés à des souches bactériennes non-natives proportionnelle à leur distance phylogénétique avec les souches natives (Sicard *et al.*, 2004 ; Sicard *et al.*, 2005 ; Murfin *et al.*, 2015 ; McMullen *et al.*, 2017). Néanmoins, des analyses de co-cladogenèse ont révélé plusieurs incongruances entre les histoires évolutives des nématodes et de leurs symbiotes bactériens, suggérant qu'une plasticité d'association existe dans la nature (Figure 12A) (Lee and Stock, 2010).

Les complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* semblent moins diversifiés, avec environ 23 espèces de nématodes décrites (réparties en 3 clades) et 19 espèces de symbiotes bactériens (Spiridinov and Subbotin, 2016 ; Machado *et al.*, 2018). Cette faible diversité spécifique est néanmoins compensée par une forte diversité intraspécifique chez les partenaires nématodes, qui est liée à des phénomènes d'adaptation locale (Hominick, 2002). Bien que certaines espèces d'*Heterorhabditis*, comme *H. bacteriophora* et *H. downesi*, puissent être associées à plusieurs espèces bactériennes (Boemare *et al.*, 2002 ; Maher *et al.*, 2017), des analyses de co-cladogenèse suggèrent une co-évolution équivalente voire supérieure chez ces complexes par rapport à celle observée pour les complexes *Steinernema-Xenorhabdus* (Figure 12B) (Maneesakorn *et al.*, 2011).

## **B. Habitats, comportements et spectres d'hôtes**

### **1. Répartitions géographiques et habitats**

L'environnement naturel des nématodes entomopathogènes est la couche superficielle des sols, où ils peuvent occuper des habitats très diversifiés. Ils sont retrouvés sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique et leur prévalence dans le sol peut varier de 2 à 45 % suivant les études (Hominick, 2002). Leur répartition spatiale, aussi bien à l'échelle locale qu'à l'échelle globale, dépend tout d'abord du genre et de l'espèce considérés et de leurs préférences en termes de type de sol, de température et d'hôtes (Boemare, 2002 ; Hominick, 2002 ; Peters, 1996). De manière générale, les nématodes du genre *Heterorhabditis* sont principalement retrouvés dans des zones sableuses en bord de mer, tandis les nématodes du

genre *Steinernema* sont retrouvés dans divers types de sols, et sont particulièrement diversifiés en milieu forestier (Hominick, 2002). Les nématodes du genre *Oscheius* sont retrouvés sur tous les continents habitables (Lephoto and Gray, 2019 ; Serepa-Dlamini and Gray, 2018 ; Campos-Herrera *et al.*, 2015 ; Torrini *et al.*, 2015 ; Foelkel *et al.*, 2017 ; Ye *et al.*, 2018 ; Karimi *et al.*, 2018 ; Zhou *et al.*, 2017 ; Bisel, 2016) et les deux espèces entomopathogènes ont été échantillonnées dans les îles de Shongming en Chine (Zhang *et al.*, 2008), dans un champs de luzerne en Mongolie (Fu and Liu, 2019) et dans du vermicompost en Caroline du Nord (Torres-Barragan *et al.*, 2011), ce qui suggère qu'elles évoluent dans des environnements variés. La répartition géographique des nématodes est toutefois soumise à une forte hétérogénéité spécifique (Hominick, 2002). Par exemple, au sein du genre *Heterorhabditis*, les espèces *H. bacteriophora* et *H. indica* sont très largement distribuées, tandis que les autres espèces du clade *Indica* sont principalement retrouvées en zones tropicales et subtropicales et que les autres espèces du clade *Bacteriophora* ne sont retrouvées que dans une ou deux zones spécifiques (Spiridinov and Subbotin, 2016). De la même manière, au sein du genre *Steinernema*, les espèces *S. carpocapsae* et *S. feltiae* sont ubiquistes (Spiridinov and Subbotin, 2016) tandis que de nombreuses autres espèces sont plus localisées, comme c'est, par exemple, le cas de *S. kushidai* qui n'est retrouvé qu'au Japon (Boemare, 2002) et de *S. riobravis*, qui n'est naturellement retrouvé qu'au Texas et au Mexique (Peters, 1996 ; Stuart *et al.*, 2004).

## **2. Stratégies de chasse et spectres d'hôtes**

Le spectre d'hôtes des nématodes entomopathogènes est difficile à prédire, car il est généralement beaucoup plus étendu en conditions de laboratoire que dans des conditions naturelles (Poinar, 1979 in Peters, 1996). L'un des principaux facteurs pouvant expliquer ces différences est celui de la stratégie de chasse utilisée par les nématodes. Les nématodes entomopathogènes se déplacent généralement en groupe pour rechercher de nouveaux hôtes (Labaude and Griffin, 2018). Selon leur stratégie, ils peuvent être qualifiés d'« ambushers » (qui tendent une embuscade), de « cruisers » (qui partent en croisière) ou d'intermédiaires (Lewis, 2002). Les « ambushers » migrent généralement à proximité de la surface du sol (jusqu'à environ 2 cm de profondeur dans le cas de *S. carpocapsae*), où ils se dressent sur leurs extrémités postérieures dans l'attente du passage d'un hôte. Ces

nématodes peuvent également sauter sur leurs cibles via un mouvement de contraction autour d'une goutte d'eau dont l'éclatement propulse le corps du nématode (jusqu'à environ 5 mm de distance et 4 mm de hauteur pour *S. carpocapsae*) (Reed and Wallace, 1965 ; Campbell and Kaya, 1999). En revanche, les « cruisers » migrent latéralement et en profondeur sur de longues distances (généralement jusqu'à 11 à 12 cm de distance et 35 cm de profondeur pour *H. bacteriophora*) pour trouver un hôte (Ferguson *et al.*, 1995 ; Bal *et al.*, 2014 ; Bal *et al.*, 2015). Les nématodes intermédiaires peuvent quant à eux utiliser les deux stratégies en fonction de leurs prédispositions et des conditions (Lewis, 2002). De manière générale, la stratégie des « ambushers » favorise l'infection d'hôtes mobiles et vivant à la surface du sol (Poinar and Grewal, 2012 ; Labaude and Griffin, 2018). Cette observation est par exemple illustrée par la capacité de *S. carpocapsae* à infester la chenille *Pieris brassica* (Lepidoptera : Pieridae), qui vit exclusivement au-dessus du sol (Peters, 1996). En revanche, la stratégie des « cruisers » favorise l'infection d'hôtes immobiles et vivant plus en profondeur dans le sol (Poinar and Grewal, 2012 ; Labaude and Griffin, 2018). C'est par exemple le cas de *H. bacteriophora*, qui infecte les larves exclusivement souterraines de *Popillia japonica* (Coleoptera : Scarabaeidae) et de *Diabrotica balteata* (Coleoptera : Chrysomelidae) (Peters, 1996). Toutefois, divers éléments de la structure du sol, comme la présence de racines ou d'animaux mobiles pouvant établir des interactions phorétiques, peuvent influencer les capacités de migration de ces différents types de nématodes (Lacey *et al.*, 2015 ; Labaude and Griffin, 2018).

Parmi les facteurs pouvant influencer la spécificité d'hôtes, on retrouve également de nombreux types de signaux de perception à distance. Pour se diriger vers leurs cibles, les CNBs peuvent utiliser des signaux peu spécifiques, comme par exemple un gradient de température (Byers and Poinar, 1982), de dioxyde de carbone (Hallem *et al.*, 2011), des vibrations (Torr *et al.*, 2004), et possiblement, des stimuli électromagnétiques (Shapiro-Ilan *et al.*, 2009 ; Shapiro-Ilan *et al.*, 2012 ; Ilan *et al.*, 2013). Cependant, ils peuvent également utiliser des signaux plus spécifiques, tels que des phéromones sexuels de l'insecte (Rivera *et al.*, 2017), des signaux odorants (Hallem *et al.*, 2011 ; Dillman *et al.*, 2012), des signaux chimiques issus d'un insecte infesté par des nématodes de la même espèce ou d'une espèce différente (Lewis and Gaugler, 1994 ; Grewal *et al.*, 1997 ; Ramos-Rodriguez *et al.*, 2007 ; Christen *et al.*, 2007), ou encore des signaux de stress émis par des plantes blessées par des

insectes (Rasman *et al.*, 2005 ; Laznik and Trdan, 2016 ; Tonelli *et al.*, 2016). Enfin, le contact avec la cuticule de l'insecte peut aussi jouer un rôle dans sa reconnaissance (Lewis, 2002).

## **C. Infection et cycle de vie parasitaire des complexes**

### **1. Forme infectieuse quiescente**

Les nématodes entomopathogènes des genres *Steinernema* et *Heterorhabditis* ne sont retrouvés dans le sol que sous une forme développementale quiescente appelée le stade juvénile-infestant (Figure 13). Il s'agit d'une forme alternative du troisième stade larvaire du nématode, équivalente à la larve Dauer du nématode modèle *Caenorhabditis elegans* (Forst and Clarke, 2002). A ce stade, les symbiotes bactériens *Xenorhabdus* ou *Photorhabdus* sont localisés dans la lumière intestinale des nématodes. Les bactéries y sont sous forme de biofilm accolé à la paroi intestinale dans le cas des complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* (Ffrench-constant *et al.*, 2003), tandis qu'elles sont contenues dans un réceptacle formé de deux entérocytes modifiés et de structures intravésiculaires mucoïdes dans le cas des complexes *Steinernema-Xenorhabdus* (Bird and Akhurst, 1983 ; Martens and Goodrich-Blair, 2005). Dans les deux cas, l'environnement et l'état physiologique des bactéries permettent de stabiliser la taille de leurs populations, avec 0 à 300 bactéries par nématode pour les complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* (Ciche and Ensign, 2003 ; An and Grewal, 2010) et 10 à 200 bactéries par nématode pour les complexes *Steinernema-Xenorhabdus* (Poinar, 1966 ; Stilwell *et al.*, 2018). Le stade juvénile-infestant est également caractérisé par la présence d'un feuillet externe, qui correspond à la cuticule du deuxième stade larvaire du nématode (Adams and Nguyen, 2002). Cette cuticule est connue pour protéger les nématodes *Heterorhabditis* de la dessiccation (Menti *et al.*, 1997 ; Perry *et al.*, 2012) et des infections fongiques (Timper and Kaya, 1989), et elle empêche les nématodes de se nourrir hors d'un hôte (Adams and Nguyen, 2002). Dans ces conditions, les nématodes ne peuvent survivre que pendant quelques semaines ou quelques mois hors d'un insecte-hôte (Shapiro-Ilan *et al.*, 2006 ; Grewal *et al.*, 2011).

## 2. Infection de l'hôte par le nématode

Pour rentrer dans le corps d'un insecte, et ainsi reprendre leur développement, les nématodes juvénile-infestants doivent tout d'abord franchir ses barrières externes (Figure 13). Pour ce faire, ils peuvent passer par les orifices naturels, soient la bouche, l'anus et les spiracles (orifices externes des trachées) (Dowds and Peters, 2002). Les nématodes du genre *Heterorhabditis* peuvent par ailleurs pénétrer directement dans l'hémocœle grâce à une dent terminale leur permettant de percer la cuticule de l'insecte (Bedding and Molyneux, 1982). La voie d'entrée utilisée dépend de plusieurs paramètres, incluant l'épaisseur de la cuticule de l'hôte (Labaude and Griffin, 2018), la taille et l'architecture de ses spiracles (Forschler and Gardner, 1991 ; Peters and Ehlers, 1994), la taille et la puissance de ses mandibules (Eidt and Thurston, 1995 ; Gaugler and Molloy, 1981), la composition de son fluide intestinal (Wang *et al.*, 1995) ou encore la fréquence de ses déjections (Cui *et al.*, 1993). Dans le cas d'une entrée via la voie intestinale, la traversée de l'épithélium digestif s'effectue probablement au niveau de l'intestin moyen (Cui *et al.*, 1993), via une émission d'enzymes hydrolytiques (Abu Hatab *et al.*, 1995 ; Simoes, 1998). Chez *S. carpocapsae*, il a en effet été montré que le contact avec le bol alimentaire du lépidoptère *G. mellonella* induit l'expression des protéases à sérine Sc-SP1 et Sc-SP3, qui causent une délamination et une histolyse des entérocytes lorsqu'elles sont administrées par voie orale à l'insecte (Toubarro *et al.*, 2009 ; Toubarro *et al.*, 2010). De la même manière, il a été montré chez *D. melanogaster* que *H. bacteriophora* induit une destruction de la matrice extracellulaire bordant l'intestin, notamment via une dégradation de collagène de type IV (Arefin *et al.*, 2014). En revanche, aucun mécanisme décrivant le franchissement par le nématode de la matrice péritrophique bordant l'épithélium n'a été décrit à ce jour.

## 3. Libération des symbiotes bactériens et mort de l'hôte

C'est généralement en amont ou au cours de ces premières étapes que le nématode perd sa seconde cuticule, avant de libérer, au contact de l'hémolymphe, son symbiote bactérien (Figure 13) (Snyder *et al.*, 2007 ; Sicard *et al.*, 2004 ; Bedding and Molyneux, 1982 ; Ciche and Ensign, 2003). La libération de la bactérie est amorcée après un temps variant de 30 minutes à plusieurs heures, en fonction de la souche de nématode et de l'hôte considérés (Dunphy and

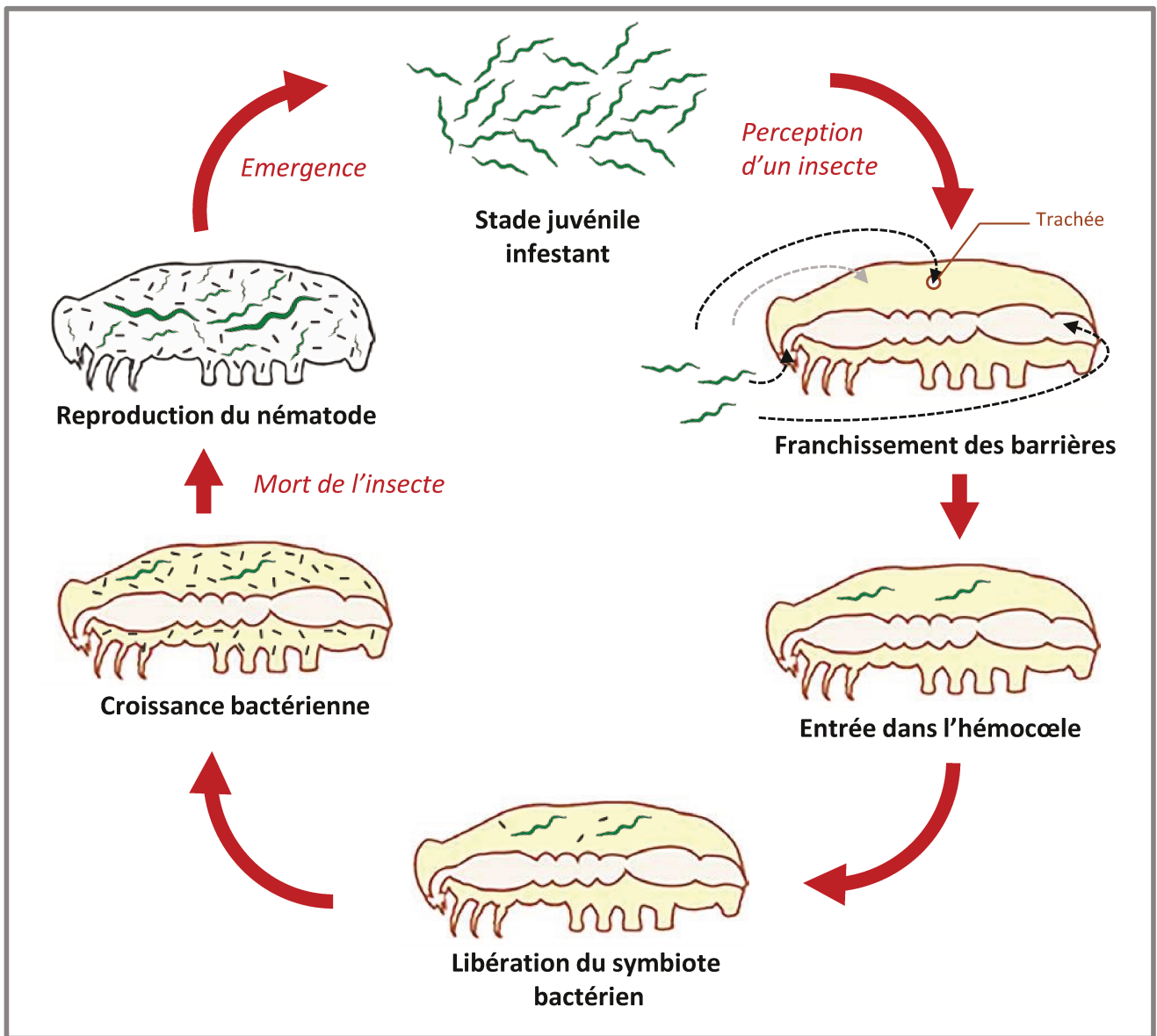
Webster, 1988 ; Ciche and Ensign, 2003 ; Sicard *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 1995). Elle s'effectue par défécation sur environ 2 heures pour les complexes *Steinernema-Xenorhabdus* (Poinar, 1966 ; Sicard *et al.*, 2004) et par régurgitation sur plus de 5 heures pour les complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* (Ciche and Ensign, 2003). Sauf exception (Costa *et al.*, 2009), la bactérie se développe ensuite de façon extracellulaire, dans l'hémolymphe et au niveau des tissus conjonctifs bordant l'intestin ou les organes hématopoïétiques de l'insecte (Sicard *et al.*, 2004 ; Silva *et al.*, 2002). En parallèle, elle participe généralement à la suppression des défenses de l'hôte ainsi qu'à la dégradation de ses tissus, et notamment de son intestin, par émission de toxines et d'enzymes hydrolytiques (Forst and Clarke, 2002 ; Silva *et al.*, 2002 ; Hinchliffe *et al.*, 2010). La bactérie sert par ailleurs de ressource nutritive à son partenaire nématode, qui atteint son quatrième et dernier stade larvaire après une vingtaine d'heures dans les cas de *S. carpocapsae* et de *S. feltiae* (Lu *et al.*, 2017 ; Chang *et al.*, 2019). La mort de l'insecte survient généralement dans les 48 heures après contact avec les complexes, suite à une septicémie, une toxémie et à une inanition (Forst and Clarke, 2002 ; Ciche, 2006 ; Hinchliffe *et al.*, 2010).

#### **4. Développement et reproduction dans le cadavre de l'hôte**

Après la mort, le développement des nématodes se poursuit, leur permettant d'atteindre le stade adulte et de se reproduire (Figure 13) (Forst and Clarke, 2002). Plusieurs centaines ou milliers d'œufs par mère résultent de cette phase de reproduction (Wang and Bedding, 1996), et 1 à 3 cycles complets de développement et de reproduction s'effectuent au sein du cadavre (Adams and Nguyen, 2002). Lorsque les ressources deviennent limitantes, les œufs éclosent et se développent à l'intérieur du corps de leurs mères, où les symbiotes bactériens se réassocient aux nématodes en fin de stade L2 (Wang and Bedding, 1996). Ce processus aboutit à la formation de larves juvéniles-infestantes, qui sortent du corps de la mère, puis du cadavre de l'insecte. On estime qu'environ 150 000 nématodes retournent ainsi à l'environnement entre 7 et 21 jours post-infection (Wang and Bedding, 1996 ; Forst and Clarke, 2002).

L'appropriation du cadavre de l'hôte est permise par la production par la bactérie de divers composés à activités antibactériennes et antifongiques (Paul *et al.*, 1981 ; Akhurst, 1982 ; Boemare *et al.*, 1992 ; Baghdigian *et al.*, 1993 ; Li *et al.*, 1997 ; Hu and Webster, 2000 ; Ji *et*





**Figure 13 : Représentation schématique du cycle de vie des complexes nématobactériens entomopathogènes.** Le schéma a été construit d'après l'état actuel des connaissances sur les cycles de vie des complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus* et *Steinernema-Xenorhabdus*. La flèche en gris correspond à une caractéristique propre aux complexes *Heterorhabditis-Photorhabdus*.

*al.*, 2004 ; Bode *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2006 ; Muangpat *et al.*, 2017), de molécules ayant un effet répulsif sur les animaux nécrotrophes et prédateurs (Bode *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2002) et de molécules à activités nématocides (Webster *et al.*, 1999 ; Sicard *et al.*, 2004b). La persistance de bactéries issues du microbiote intestinal de l'insecte ou du microbiote des nématodes a toutefois été observée chez différents modèles d'interaction, avec un impact variable sur le développement des nématodes (Poinar, 1966 ; Blackburn *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2014 ; Wollenberg *et al.*, 2016).

## **D. Echappement aux défenses immunitaires de l'hôte**

L'un des principaux enjeux associé à l'établissement du parasitisme d'un nématode entomopathogène chez un insecte donné est la confrontation à ses défenses immunitaires (Labaude and Griffin, 2018). En effet, dès son entrée dans l'hémocoèle, le nématode devrait être confronté à diverses réponses constitutives, telles que la coagulation, la mélanisation et l'encapsulation cellulaire, qui sont susceptibles de mettre rapidement fin à l'infection (Wang *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 2007 ; Ebrahimi *et al.*, 2011). Une fois la bactérie libérée, elle devrait également être confrontée à des réponses cellulaires et humorales constitutives, ainsi qu'aux réponses antimicrobiennes systémiques des insectes, qui peuvent également mettre le complexe en échec (Eleftherianos *et al.*, 2017). Pour survivre à ces réponses, les nématodes et/ou leurs symbiotes peuvent utiliser une multitude de stratégies et de mécanismes (Figure 14), dont la nature et l'efficacité varient suivant le CNB considéré, l'espèce-hôte et son stade développemental (Wang *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1995 ; Simoes *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2007 ; Ebrahimi *et al.*, 2011 ; Duvic *et al.*, 2012 ; Eleftherianos *et al.*, 2007 ; Eleftherianos *et al.*, 2008 ; Balasubramanian *et al.*, 2010 ; Ogier *et al.*, 2014 ; Bisch *et al.*, 2014 ; Rahatkhah *et al.*, 2015 ; Brivio and Mastore, 2018).

### **1. Facteurs et mécanismes utilisés par les partenaires nématodes**

L'une des stratégies les plus efficaces pour survivre au système immunitaire de l'insecte est de supprimer ses défenses. Cette stratégie, qui peut impliquer différents mécanismes et types de facteur, est utilisée par de nombreux nématodes entomopathogènes et permet notamment d'affaiblir le système immunitaire avant la libération du symbiote bactérien (Dowds and Peters, 2002).

Les nématodes peuvent tout d'abord excréter des facteurs immunosuppresseurs dans le corps de l'insecte. Cette stratégie est par exemple utilisée par *S. carpocapsae*, l'un des nématodes entomopathogènes les plus étudiés. L'existence de facteurs immuno-suppresseurs au sein des produits excrétés par le nématode lors du processus infectieux a en effet été démontrée chez l'insecte *G. mellonella* (Simoes *et al.*, 2000 ; Walter *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2017). Parmi les principaux candidats, on retrouve les inhibiteurs de protéase Sc-KU4 et Sc-SRP6, qui empêchent respectivement le piégeage des pathogènes dans les fibres du caillot et le couplage entre la coagulation et la mélanisation (Toubarro *et al.*, 2013a, 2013b). Sc-KU4 inhibe également l'agrégation des hémocytes (Toubarro *et al.*, 2013b), tandis que deux autres candidats, les protéases à sérine Sc-CHYM et S01A inhibent la production de réponses cellulaires et l'activité de la PO (Balasubramanian *et al.*, 2009 ; Balasubramanian *et al.*, 2010). Le nématode excrète également un facteur de nature inconnue qui supprime deux PAMs de la famille des cécropines de l'hémolymphe du lépidoptère *Hyalophora cecropia*. La production de ce facteur serait impliquée dans la protection de son symbiote bactérien *X. nematophila* vis-à-vis de la réponse antimicrobienne de l'insecte (Gotz *et al.*, 1981). En plus de ces facteurs, les examens détaillés des génome, transcriptome et protéome du nématode, ainsi que de nématodes entomopathogènes proches tels que *S. feltiae* (Chang *et al.*, 2019), suggèrent qu'une multitude de protéines sécrétées pourraient intervenir dans la suppression des défenses de l'hôte. Ces protéines incluent des protéases et inhibiteurs de protéases, qui pourraient interférer avec les cascades régulatrices de l'immunité, des enzymes de détoxification susceptibles de réduire la toxicité des réponses cellulaires et de mélanisation, ou encore des protéines liant les acides gras et le rétinol (protéines FAR), qui pourraient interférer avec la voie des éicosanoïdes et avec l'induction de réponses cellulaires (Hao *et al.*, 2010 ; Dillman *et al.*, 2015 ; Rougon-Cardoso *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'hypothèse d'une intervention d'autres types de molécules, telles que des ARN interférents ou des métabolites est également envisagée (Lu *et al.*, 2017).

La cuticule des nématodes peut, elle aussi, présenter des propriétés immunosuppressives. C'est par exemple le cas chez les nématodes *S. feltiae* et *S. glaseri*. Dans le cas de l'infection de *G. mellonella* par *S. feltiae*, le mécanisme immunosuppresseur repose sur des déterminants cuticulaires de nature lipidique, qui adsorbent et séquestrent diverses protéines régulatrices et de reconnaissance de l'immunité (ex : protéines de liaison au LPS, au

peptidoglycane, apolipophorine). Ce mécanisme empêche l'induction de différentes réponses immunitaires, incluant l'encapsulation, la mélanisation, la phagocytose, les réponses antimicrobiennes et probablement aussi, la coagulation (Dunphy and Webster, 1987 ; Brivio *et al.*, 2002 ; Brivio *et al.*, 2004 ; Brivio *et al.*, 2006 ; Mastore *et al.*, 2008 ; Brivio *et al.*, 2010). Dans le cas de *S. glaseri*, le mécanisme immunosuppresseur semble plutôt faire intervenir des protéines cuticulaires, qui se dissocieraient ou non de la cuticule en cours d'infection. Il a en effet été montré que les protéines cuticulaires ScP3a et ScP3b du nématode inhibent les capacités phagocytaires et d'encapsulation des hémocytes du coléoptère *Popillia japonica* après injection dans son hémocœle (Wang and Gaugler, 1999). Deux autres protéines cuticulaires du nématode présentent par ailleurs des effets cytotoxiques vis-à-vis des hémocytes du coléoptère *Exomala orientalis* (Li *et al.*, 2009). Ce type de stratégie peut aussi être utilisé par les nématodes *S. carpocapsae* et *H. bacteriophora*, dont les cuticules présentent des effets immunosuppresseurs sur toutes les composantes de l'immunité lorsqu'elles sont injectées seules chez *G. mellonella*. Cette immunosuppression généralisée pourrait être due à une interférence avec la voie des éicosanoïdes (Yi *et al.*, 2016).

Dans le cas de *S. carpocapsae*, les propriétés immunosuppresseuses de la cuticule semblent toutefois dépendre de l'espèce-hôte, car aucun effet immunosuppresseur associé à la cuticule n'a pu être mis en évidence chez le coléoptère *Rynchophorus ferrugineus* (Mastore *et al.*, 2015 ; Binda-Rossetti *et al.*, 2016). Chez cet insecte, la cuticule du nématode semble essentiellement lui permettre de ne pas être détecté par le système immunitaire via une stratégie de camouflage ou de mimétisme qui reste à caractériser. Ce type de stratégie permet notamment de ne pas activer le système immunitaire de l'insecte avant la libération du symbiote *X. nematophila* (Brivio *et al.*, 2018).

Bien que moins étudiées, d'autres stratégies pourraient être utilisées par les nématodes entomopathogènes pour échapper aux premières réponses de l'insecte. Parmi les principales, on peut citer celle de l'échappement à l'encapsulation cellulaire et mélanotique par perte du feuillet externe au cours de la formation de la capsule (Peters, 1997) ou encore celle des infections multiples exploitant les capacités d'encapsulation limitées de l'insecte hôte (Dowds and Peters, 2002).

## 2. Facteurs et mécanismes utilisés par les partenaires bactériens

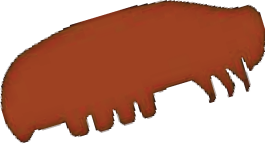
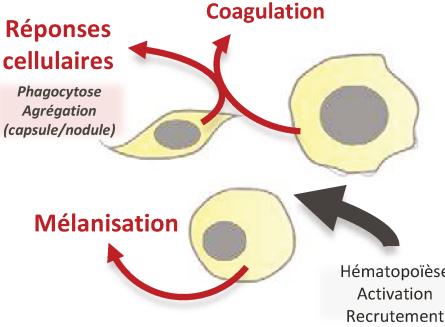
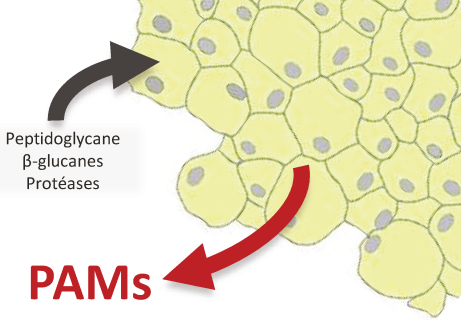


Le niveau de participation des symbiotes bactériens à l'échappement au système immunitaire peut être très variable suivant le complexe considéré. En effet, alors qu'au sein de certains CNBs, comme le couple *S. glaseri-X. poinarii*, la bactérie semble disposer de peu de facteurs permettant l'échappement à la réponse immunitaire (Ogier *et al.*, 2014), le symbiote bactérien d'autres CNBs, tels que les couples *S. carpocapsae-X. nematophila* et *H. bacteriophora-P. luminescens*, semble être très impliqué dans la confrontation aux défenses de l'hôte (Hinchliffe *et al.*, 2010 ; Eleftherianos *et al.*, 2017). L'étude des stratégies et mécanismes utilisés par ces bactéries pour contrecarrer le système immunitaire des insectes a conduit à l'identification d'une grande diversité de facteurs, qui sont principalement impliqués dans des mécanismes d'immunosuppression.

L'une des stratégies les plus communes chez les bactéries des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* pour supprimer les défenses cellulaires des insectes est la destruction des hémocytes. Cette stratégie peut faire intervenir divers métabolites secondaires présentant des activités cytotoxiques, comme par exemple le benzylidèneacétone et le dipeptide Pro-Tyr (Seo *et al.*, 2012 ; Eom *et al.*, 2014). Elle peut également faire intervenir des hémolysines, telles que la protéine de surface Xh1A et la protéine fimbriale MrxA de *X. nematophila*, qui forment des pores dans les membranes cellulaires (Cowles and Goodrich-Blair, 2005 ; Khandelwal *et al.*, 2004 ; Banerjee *et al.*, 2006 ; Chandra *et al.*, 2008). Chez *P. luminescens*, la toxine Makes caterpillar floppy 1 et l'effecteur Cif, délivré directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote, peuvent également induire la mort des hémocytes, par apoptose des cellules (Daborn *et al.*, 2002 ; Dowling *et al.*, 2007 ; Chavez *et al.*, 2010). Enfin, la Xenorhabdolysine, aussi bien synthétisée par *X. nematophila* que par *P. luminescens*, peut quant à elle provoquer la mort cellulaire par osmolyse, nécrose ou apoptose (Ribeiro *et al.*, 2003 ; Vigneux *et al.*, 2007 ; Zhang *et al.*, 2014).

Une stratégie particulièrement étudiée chez le genre *Photorhabdus*, mais dont divers acteurs sont également retrouvés chez des bactéries du genre *Xenorhabdus* (Hinchliffe *et al.*, 2010 ; Ogier *et al.*, 2014), fait intervenir des protéines paralysant les hémocytes via des perturbations de la dynamique de leur cytosquelette. Parmi les protéines impliquées, on retrouve les toxines multimériques Tc (Lang *et al.*, 2010), la toxine Photox (Visschedyk *et al.*, 2010), les effecteurs Pnf (Vlisidou *et al.*, 2019) et LopT (Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005) de *P.*

*luminescens* ou encore la toxine Makes caterpillar floppy 1 (Vlisidou *et al.*, 2009) de *P. asymbiotica*, qui affectent le cytosquelette d'actine. Ces protéines agissent généralement par modification des monomères d'actine (Visschedyk *et al.*, 2010 ; Lang *et al.*, 2010) ou de petites GTPases Rho qui contrôlent la dynamique du cytosquelette (Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005 ; Lang *et al.*, 2010 ; Vlisidou *et al.*, 2019). La toxine binaire PirA(1)B(1) de *P. luminescens*, qui réduit les capacités d'étalement et de phagocytose des hémocytes, pourrait également utiliser ce type de mécanisme (Wu and Yi, 2016). L'étendue des effets de ces protéines à l'échelle du corps de l'insecte n'est pas connue à l'heure actuelle, mais des analyses d'expression réalisées pour les effecteurs LopT et Pnf chez *L. migratoria* et *D. melanogaster* respectivement, suggèrent que ces facteurs sont exprimés dans des contextes particuliers, comme par exemple lors de la formation d'un nodule dans le cas de LopT (Brugirard-Ricaud *et al.*, 2005 ; Vlisidou *et al.*, 2019).

Les symbiotes bactériens peuvent également inhiber ou détruire de façon plus ciblée diverses protéines régulatrices de l'immunité pour supprimer ces réponses. Par exemple, une stratégie qui semble être très conservée chez les bactéries des genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus* est l'inhibition de l'enzyme initiateur de la synthèse des éicosanoïdes, la phospholipase A2 (Kim *et al.*, 2005). Cette stratégie permet de réduire les populations d'hémocytes circulants et d'inhiber les réponses de phagocytose, de nodulation et de mélanisation de façon globale chez une grande diversité d'insectes (Park and Kim, 2000 ; Park and Kim, 2003 ; Kim *et al.*, 2005 ; Park and Stanley, 2006 ; Shrestha and Kim, 2007 ; Seo *et al.*, 2012 ; Eom *et al.*, 2014). Elle repose essentiellement sur la libération par les bactéries de divers métabolites secondaires qui peuvent être communs ou spécifiques à l'espèce bactérienne (Seo *et al.*, 2012 ; Eom *et al.*, 2014). Les cocktails de métabolites libérés par les symbiotes bactériens contiennent de plus divers inhibiteurs de la PO, comme la rhabduscine chez *X. nematophila* ou encore un hydroxystilbène chez *P. luminescens* (Eleftherianos *et al.*, 2007 ; Crawford *et al.*, 2012 ; Eom *et al.*, 2014), qui bloquent la mélanisation et affectent les réponses cellulaires et la coagulation qui lui sont associées. Chez le lépidoptère *M. sexta*, la métalloprotéase PrtA de *P. luminescens* présente quant à elle un mode d'action moins spécifique, en dégradant de nombreuses protéines connues pour être impliquées dans le système de la PO, la coagulation et l'agrégation des hémocytes (Felföldi *et al.*, 2009).

 <p><b>Insecte</b></p>	 <p><b>Réponses cellulaires</b> Phagocytose Agrégation (capsule/nodule)</p> <p><b>Coagulation</b></p> <p><b>Mélanisation</b></p> <p>Hématopoïèse Activation Recrutement</p> <p><b>Hémocytes</b></p>	 <p>Peptidoglycane β-glucanes Protéases</p> <p><b>PAMs</b></p> <p><b>Corps gras</b></p>
 <p><b>Nématode</b></p>	<p>Absence de reconnaissance</p> <p>Piégeage de protéines activatrices</p> <p>Inhibition de l'agrégation des HCs</p> <p>Fuite de la capsule</p> <p>Inhibition de la coagulation</p> <p>Inhibition de la mélanisation</p> <p>Surnombre</p>	<p>Absence de reconnaissance</p> <p>Piégeage de protéines activatrices</p> <p>Dégradation de PAMs</p>
 <p><b>Bactérie</b></p>	<p>Inhibition de protéines activatrices</p> <p>Destruction des HCs</p> <p>Paralysie des HCs</p> <p>Inhibition de l'agrégation des HCs</p> <p>Inhibition de la coagulation</p> <p>Inhibition de la mélanisation</p>	<p>Résistance aux PAMs</p> <p>Dégradation de PAMs</p> <p>Répression de l'expression des PAMs</p>

**Figure 14 : Stratégies d'échappement immunitaires identifiées chez les complexes nématobactériens entomopathogènes.** Ce résumé graphique tient compte de l'ensemble des stratégies de suppression, d'évasion et de résistance identifiées chez un ou plusieurs complexes nématobactériens vis-à-vis du système immunitaire de différentes espèces-hôtes. PAM: Peptide antimicrobien, HC : Hémocyte.

Pour survivre aux réponses humorales antimicrobiennes des insectes, les bactéries peuvent combiner plusieurs stratégies. Dans le cas de *P. luminescens*, la stratégie consiste essentiellement en une modification de la structure de son LPS, qui confère une résistance aux PAMs. Cette modification a lieu en début d'infection au sein d'une sous-population bactérienne, qui devient par la suite majoritaire dans l'hémocœle (Mouammine *et al.*, 2017). En complément, des protéases émises par la bactérie peuvent dégrader sélectivement des PAMs, comme par exemple les cécropines (Jarosz *et al.*, 1998). Bien que certaines bactéries du genre *Xenorhabdus* puissent également présenter des résistances aux PAMs (Duvic *et al.*, 2012), *X. nematophila* semble essentiellement utiliser des stratégies immunosuppressives. En effet, des travaux réalisés chez différents modèles d'insecte ont montré que *X. nematophila* induit une perte d'activité antimicrobienne et de peptides de faibles poids moléculaires au niveau du plasma des insectes (Duvic *et al.*, 2012 ; Binda-Rossetti *et al.*, 2016). Tout comme dans le cas de *P. luminescens*, cette immunosuppression peut s'exercer par protéolyse (Caldas *et al.*, 2002), mais elle semble aussi reposer sur une répression transcriptionnelle de l'expression de ces peptides, comme cela a été montré chez les lépidoptères *M. sexta* et *S. exigua* (Ji and Kim, 2004 ; Park *et al.*, 2007 ; Darsouei *et al.*, 2017 ; Hwang *et al.*, 2013).

## Conclusion

Les travaux réalisés au cours des dernières décennies ont permis de décrire de nombreux aspects des modes de vie des CNB entomopathogènes, et d'identifier les principaux facteurs déterminant leurs capacités à contrôler une population d'insectes. Ces facteurs incluent tout d'abord les propriétés des habitats dans lesquels les nématodes évoluent. En effet, certains nématodes semblent être très adaptés à un habitat particulier, tandis que d'autres sont plus généralistes. Ils incluent également la stratégie de chasse utilisée par les nématodes, qui détermine leur capacité à atteindre un insecte donné. Un autre facteur influençant l'accessibilité de l'hôte est la morphologie et l'équipement dont le nématode dispose pour franchir les barrières physiques et chimiques qui protègent l'insecte. Enfin, les stratégies immunoévasives et immunosuppressives mises en œuvre par chaque membre du CNB sont déterminantes pour la réussite du parasitisme. Ces stratégies peuvent varier considérablement d'un complexe à l'autre et leurs efficacités dépendent de l'espèce hôte et



de son stade de développement. Dans ce contexte, l'un des enjeux majeurs pour améliorer notre compréhension des interactions CNB entomopathogènes-insectes est de déterminer, au cas par cas, pourquoi le dialogue qui s'établit entre le système immunitaire de l'hôte, le nématode et son symbiote bactérien aboutit ou non à la réussite du parasitisme.

### **III. Etude des bases moléculaires des réponses immunitaires des insectes aux complexes nématobactériens entomopathogènes**

L'étude des dialogues s'établissant entre les CNBs entomopathogènes et le système immunitaire de leurs hôtes nécessite une connaissance détaillée des réponses immunitaires que les insectes opposent à ces infections duales. La participation de réponses cellulaires et antimicrobiennes ainsi que de la mélanisation aux réponses immunitaires de l'insecte peut facilement être déduite des stratégies immunosuppressives identifiées chez différents CNBs. En revanche, l'étude du détail des voies signalétiques et des molécules impliquées dans les réponses à chaque partenaire n'en est qu'à ses débuts. Il s'agit d'un exercice complexe en raison (i) de l'hétérogénéité des modèles d'interaction, (ii) de la dualité des pathogènes et (iii) de l'efficacité de leurs stratégies immunoévasives et immunosuppressives. Ces aspects ont à ce jour principalement été étudiés sur le modèle *Drosophila melanogaster*, via une combinaison d'approches transcriptomiques et de génétique inverse. Toutefois, quelques travaux ont également été menés sur des modèles d'insectes lépidoptères ravageurs de cultures. Dans cette dernière partie d'introduction, je ferai l'inventaire des principales informations apportées par ces travaux, qui constituent le contexte scientifique immédiat de mon travail de thèse.

#### **A. Etudes réalisées sur le modèle *D. melanogaster***

##### **1. Approches transcriptomiques**

Les approches transcriptomiques sont principalement utilisées pour obtenir une vision globale des réponses que les insectes opposent ou non aux CNB entomopathogènes. Elles permettent également d'identifier des voies ou gènes candidats susceptibles de jouer un rôle dans la résistance au complexe. Dans le cadre de l'étude de la réponse immunitaire de *D. melanogaster* aux CNBs, trois études de ce type ont été menées. Les deux premières correspondent aux réponses de la larve et de l'adulte au CNB *H. bacteriophora*-*P. luminescens*. La dernière correspond aux réponses de la larve au CNB *S. carpocapsae*-*X. nematophila*.

Dans les trois cas, l'analyse des réponses transcriptomiques de l'insecte a permis de mettre en évidence l'induction de réponses immunitaires diversifiées incluant une surexpression de

gènes impliqués dans la coagulation, les réponses cellulaires, la mélanisation et dans les réponses antimicrobiennes (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). D'un point de vue signalétique, ces réponses sont caractérisées par une surexpression de membres des voies de l'immunité antimicrobienne Imd et Toll, du système de la proPO inducteur de la mélanisation, ainsi que des voies pléiotropiques JNK et Jak-Stat (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). Dans les cas des réponses de l'adulte au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* et de la larve au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* elles sont de plus caractérisées par une surexpression des facteurs de transcription Serpent et GCM respectivement, qui sont impliqués dans l'hématopoïèse et la différenciation des plasmatocytes (Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). Les molécules de reconnaissance surexprimées incluent plusieurs PGRPs et GNBP activatrices des voies Imd et Toll ainsi que des opsonines TEPs dans les trois cas (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). Elles incluent également la protéine très polymorphe Dscam1 dans le cas de la réponse de la larve au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* (Arefin *et al.*, 2014) et le récepteur Scavenger Peste dans le cas de sa réponse au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* (Yadav *et al.*, 2017). Les effecteurs antimicrobiens induits en réponse au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* sont très diversifiés, aussi bien chez la larve que chez l'adulte, avec une surexpression de divers PAMs et Bomanines marquant l'activation des voies Imd et Toll (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015). Dans le cas de la réponse au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila*, la réponse antimicrobienne semble plus spécifique ou moins intense, avec seulement quatre PAMs identifiés comme surexprimés : les Attacines A, B et C et la Drosomyicine (Yadav *et al.*, 2017).

Les études des réponses de l'adulte au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* et de la larve au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* fournissent des informations supplémentaires sur la structure de la réponse qui est induite face à l'infection. La première a été réalisée aux temps 12 et 24 heures post-infection et les auteurs ont procédé à trois types d'infection: des infections par mise en contact avec le CNB, par mise en contact avec le nématode aposymbiotique (dépourvu de son symbiote *P. luminescens*) et par injection de *P. luminescens*. Cette analyse a permis de montrer que les réponses immunitaires au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* sont peu dynamiques au cours du processus infectieux, avec des réponses au CNB très similaires à 12 et à 24 heures après infection. De façon étonnante,

l'étude suggère que les trois types de pathogènes induisent quasiment les mêmes réponses immunitaires. Toutefois, l'infection par *P. luminescens* seule induit une surexpression plus forte de PAMs généralement actifs contre les bactéries à Gram négative (Attacine C et Drosocine) et elle induit spécifiquement plusieurs gènes codant des enzymes de la voie de synthèse de la mélanine ainsi que ceux codant les opsonines TEP1 et TEP2 (Castillo *et al.*, 2015). L'étude de la réponse au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* a quant à elle été réalisée aux temps 6 et 24 heures post-infection et la larve a été infectée par contact avec le CNB d'une part, et avec le nématode aposymbiotique d'autre part. Comme dans le cas de la réponse au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens*, cette étude montre que les réponses au couple *S. carpocapsae-X. nematophila* sont stables au cours du processus infectieux et que les réponses au CNB et au nématode aposymbiotique sont très similaires à 24 heures post-infection. En revanche, la réponse au nématode aposymbiotique semble être retardée par rapport à la réponse au CNB, puisque l'unique gène induit en l'absence du symbiote *X. nematophila* à 6 heures après infection est le régulateur négatif Hemese de la prolifération et de la différenciation des hémocytes (Yadav *et al.*, 2017).

## **2. Approches fonctionnelles**

De nombreuses études fonctionnelles ont été menées chez la Drosophile, dans le but d'identifier les gènes et les voies réellement impliqués dans la résistance ou dans la résilience aux infections par les CNBs. Ces études ont principalement consisté en des approches de génétique inverse par mutagenèse ou ARN interférence, avec inactivation d'un gène candidat et observation des effets sur la survie de l'insecte à l'infection par le CNB entier ou par l'un des deux partenaires du complexe. Cette approche, qui a principalement été utilisée dans le cadre de l'étude des réponses aux CNBs *H. bacteriophora-P. luminescens* et *S. carpocapsae-X. nematophila*, a permis d'identifier plusieurs voies signalétiques, protéines de reconnaissance et effecteurs potentiellement impliqués dans la réponse aux CNBs.

### **2. a. Voies signalétiques**

Les premières voies signalétiques de l'immunité dont les implications dans la réponse aux CNBs et aux symbiotes bactériens ont été testées sont les voies Imd et Toll (Hallem *et al.*, 2007). L'implication de la voie Imd dans la réponse à *P. luminescens* et à *X. nematophila* a pu être mise en évidence grâce à des infections d'insectes pré-immunisés par injection de la

bactérie à Gram négative *Escherichia coli*. Cette méthodologie a permis de contrer les effets suppresseurs des symbiotes bactériens sur la réponse immunitaire de l'insecte et ainsi de rendre apparente la participation de la voie aux réponses aux deux bactéries (Aymeric *et al.*, 2010). En accord avec ce résultat, il a par la suite été montré que l'inactivation du régulateur négatif PGRP-LF de la voie Imd a un effet positif sur la survie de la larve à l'infection par le CNB *H. bacteriophora*-*P. luminescens* (Arefin *et al.*, 2014). En revanche, aucune des expériences d'inactivation de membres de la voie Toll n'a conduit à un changement de phénotype, et ce même après pré-immunisation par *E. coli* (Hallem *et al.*, 2007 ; Aymeric *et al.*, 2010 ; Yadav *et al.*, 2018). L'absence d'implication de cette voie dans la réponse aux CNBs nécessiterait néanmoins d'être confirmée par une expérience de pré-immunisation par une bactérie à Gram positive ou un organisme fongique activant la voie Toll.

Dans le cadre de la caractérisation des réponses au complexe *S. carpocapsae*-*X. nematophila*, les participations des voies JNK et Jak-Stat à la réponse au CNB ont également été testées. Ces travaux ont montré que l'inactivation du récepteur Dome de la voie Jak-Stat n'a aucun effet sur la survie de l'insecte aux infections par le CNB et par le nématode aposymbiotique. En revanche, l'inactivation du récepteur Wengen de la voie JNK a un effet positif sur la survie de la larve à l'infection par le nématode aposymbiotique (Yadav *et al.*, 2018). L'interprétation de ce type d'effet est complexe, car il pourrait correspondre à une fonction dans la régulation des réponses à l'infection par le nématode, mais aussi à une fonction dans l'activation de réponses immunitaires qui seraient délétères pour l'insecte. De plus, la voie JNK étant impliquée dans les composantes cellulaires et humorales de l'immunité, ainsi que dans la réparation tissulaire (voir partie I, sections A/1. d., A/2. c., A/2. g., B/1. b., B/2., C/1. a., C/1. b.) et divers autres processus physiologiques, l'identification de son rôle dans la réponse au nématode aposymbiotique nécessite des travaux supplémentaires.

La voie du TGF- $\beta$  est une autre voie pléiotropique, qui peut être impliquée dans la réparation tissulaire et dans l'hématopoïèse (voir partie I, sections A/2. g. et B/1. b.). Cette voie est également connue pour ses rôles dans la régulation négative des réponses inflammatoires chez les mammifères (Sanjabi *et al.*, 2017), une fonction qui commence à être explorée chez les insectes (Patrnogic *et al.*, 2018a ; Patrnogic *et al.*, 2018b ; Ozakman and Eleftherianos, 2019). Suivant les interactions ligands-récepteurs, la voie du TGF- $\beta$  peut être subdivisée en deux branches : celle des Activines et celle des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)

(Upadhyay *et al.*, 2017). Dans le cas de l'infection par le CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* (mais pas dans celui de l'infection par le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila*), il a été montré que l'inactivation du ligand Dawdle de la branche des Activines a un effet positif sur la survie de la Drosophile à l'infection par le CNB, par le nématode aposymbiotique ainsi que par la bactérie seule. Aussi bien dans le cas du CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* que dans celui du CNB *S. carpocapsae-X. nematophila*, l'inactivation du ligand Dpp de la branche des BMPs impacte spécifiquement et positivement la survie à l'infection par le nématode aposymbiotique (Eleftherianos *et al.*, 2016 ; Yadav *et al.*, 2018). Il a par ailleurs été démontré que l'inactivation du Dpp induit une augmentation du niveau d'activation des voies Imd et Toll en réponse au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens*, mais pas en réponse à *P. luminescens* seule (Patrnogic *et al.*, 2018a). Ces résultats suggèrent que la branche des BMPs participe spécifiquement à la régulation et/ou la spécification de la réponse aux nématodes.

Dans le cadre de la caractérisation de la réponse au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila*, il a récemment été montré que l'inactivation de Jonah 66Ci, une protéase à sérine sécrétée spécifiquement exprimée dans l'intestin de la larve en réponse au CNB, a également un impact positif sur la survie de l'insecte à l'infection par le nématode aposymbiotique. Au niveau intestinal, cette protéine affecte les profils d'expression de différents PAMs, inhibe le renouvellement de l'épithélium et réprime la production de cellules entéroendocrines en réponse au CNB et au nématode aposymbiotique. Elle est par ailleurs impliquée dans la production de NO et dans l'induction des réponses systémiques antimicrobiennes en réponse aux deux pathogènes (Yadav and Eleftherianos, 2019). Comme dans les cas des voies JNK et du TGF- $\beta$ , l'identification des fonctions de Jonah 66Ci dans la régulation de la réponse au partenaire nématode nécessite des analyses complémentaires.

Enfin, l'implication de la voie de synthèse des éicosanoïdes dans la réponse au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* a été démontrée. L'inactivation du gène codant la PLA<sub>2</sub>, l'enzyme qui synthétise le précurseur des éicosanoïdes, a en effet un impact négatif sur la survie de l'insecte à l'infection par le CNB, tout comme l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la voie (Hyrsi *et al.*, 2011).

## **2. b. Protéines de reconnaissance**

Les opsonines de la famille des TEPs étant les principales protéines de reconnaissance de l'immunité cellulaire surexprimées en réponses aux CNBs chez la Drosophile, elles ont fait

l'objet de plusieurs études fonctionnelles. Ces études, qui se sont pour l'instant focalisées sur les réponses au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens*, ont tout d'abord montré que l'inactivation de TEP3 (mais pas de TEP2) a un effet négatif sur la survie de la larve de *Drosophile* à l'infection par le CNB (Arefin *et al.*, 2014). Il a ensuite été montré chez l'adulte que les inactivations de TEP2, de TEP4 et de TEP6 ont des effets positifs sur la survie de l'insecte à l'infection par *P. luminescens*, ainsi que sur sa capacité à limiter la croissance de la bactérie. L'hypothèse des auteurs pour expliquer ce résultat est que les protéines TEPs favorisent la production d'une puissante réponse inflammatoire à *P. luminescens*, qui conduit à une perte rapide des réserves énergétiques de l'insecte et précipite son échec face au pathogène. Cette hypothèse est principalement soutenue par les effets positifs de l'inactivation de TEP2 et de TEP4 sur la teneur de l'insecte en molécules énergétiques, ainsi que par les effets modulateurs de l'inactivation de TEP2 et de TEP6 sur différentes composantes de l'immunité de l'insecte (Shokal *et al.*, 2017 ; Shokal *et al.*, 2018).

Une autre protéine de reconnaissance dont l'expression est induite en réponse au couple *H. bacteriophora-P. luminescens* chez la larve est GNBP-like 3. Sa participation à la réponse de l'insecte au CNB a été démontrée, mais des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si elle intervient dans la reconnaissance de la bactérie ou du nématode, ainsi que pour identifier les réponses immunitaires auxquelles elle participe (Arefin *et al.*, 2014).

Enfin, en raison de leurs rôles dans la phagocytose de bactéries à Gram négative chez *D. melanogaster* (voir partie I, section B/4. a), les effets éventuels de l'inactivation des récepteurs phagocytaires NimC1 et Eater sur la survie à l'infection par le couple *H. bacteriophora-P. luminescens* ont également été recherchés. Aucune des deux études n'a permis de mettre en évidence une fonction de ces récepteurs dans la réponse au CNB. Néanmoins, ces résultats négatifs pourraient s'expliquer par les effets suppresseurs de *P. luminescens* sur les réponses cellulaires (voir partie II, section D. 2.), ainsi que par l'existence de redondances fonctionnelles entre récepteurs phagocytaires (Wang *et al.*, 2010 ; Hyrsi *et al.*, 2011).

## **2. c. Effecteurs**

La principale catégorie d'effecteurs dont la participation à la réponse aux CNBs a été testée est celle des protéines participant à la coagulation et/ou à la réparation tissulaire. Cet aspect a pour l'instant uniquement été étudié dans le cas de la réponse au CNB *H. bacteriophora-P.*

*luminescens*, en raison de la capacité du nématode à percer la cuticule de ses hôtes (voir partie II, section C). Sur les huit gènes codant des protéines du caillot testés, ceux codant Fondue, GP150, Idgf3 et la Transglutaminase jouent effectivement un rôle dans la survie de l'insecte à l'infection par le CNB (Wang *et al.*, 2010 ; HyrsI *et al.*, 2011 ; Kucerova *et al.*, 2016). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation de la Glutactine, une protéine de la lame basale, a un impact négatif sur la survie de l'insecte à l'infection par le CNB. Cet effet est également observé lorsque l'expression du gène codant la Glutactine est spécifiquement supprimée dans les hémocytes, par ARN interférence. Selon les auteurs de l'étude, ces résultats suggèrent que la protéine est impliquée dans la réparation des blessures infligées par le nématode (Arefin *et al.*, 2014).

En revanche, et bien que la mélanisation soit impliquée dans la coagulation, ainsi que dans divers processus immunitaires susceptibles d'intervenir en réponse au nématode ou à la bactérie, l'inactivation de la proPO PPO1 (ainsi que du membre Sp7 de la cascade de la proPO) n'a aucun effet sur la survie de l'insecte à l'infection par le CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* (Wang *et al.*, 2010). Ce résultat négatif s'explique probablement par la production par *P. luminescens* de puissants inhibiteurs de la PO (voir partie II, section D/2.).

En raison de leurs inductions chez la larve lors de l'infection par le CNB *H. bacteriophora-P. luminescens*, les effets du PAM Attacine A et du peptide sécrété IM18 dans la survie de l'insecte ont également été étudiés. Les deux peptides semblent bien jouer un rôle dans la réponse au CNB et tandis que l'Attacine A est très probablement impliquée dans la réponse au symbiote *P. luminescens*, le rôle du peptide non-caractérisé IM18 dans la réponse au CNB reste à identifier (Arefin *et al.*, 2014).

## **B. Etudes réalisées sur différents modèles lépidoptères**

### **1. Approches transcriptionnelles et fonctionnelles sur le modèle *Manduca sexta***

Le lépidoptère *Manduca sexta* (Sphingidae) est un ravageur du tabac et des tomates dont le système immunitaire a été très étudié. Il a été l'un des premiers modèles d'étude de la réponse immunitaire des insectes au symbiote bactérien *P. luminescens*. Les travaux réalisés sur ce modèle ont principalement consisté en des analyses ciblées d'expression de gènes



candidats, ainsi qu'en des expériences d'inactivation par ARN interférence. Ils ont permis d'élucider divers aspects de la réponse au symbiote bactérien.

Ces travaux, qui se sont d'abord focalisés sur la reconnaissance de la bactérie, ont montré qu'en réponse à l'injection de *P. luminescens*, les protéines plasmatiques IML-2, Hémoline et PGRP-1A sont surexprimées dans le corps gras (Eleftherianos *et al.*, 2006a). IML-2 est une lectine de type C se liant à la surface de bactéries et de nématodes, et qui promeut la production de réponses cellulaires en interagissant avec les hémocytes (voir partie I, sections B/4. a., B/5. a.). L'hémoline est une immunoglobuline qui se lie à la surface des bactéries et des hémocytes et qui promeut l'induction de réponses de phagocytose et de nodulation (Eleftherianos *et al.*, 2007). PGRP-1A est quant à elle une PGRP sécrétée non-catalytique qui reconnaît spécifiquement le peptidoglycane de type DAP et promeut l'activation de la PO (Jimathipala and Jiang, 2010). L'inactivation de chacun des gènes correspondants conduit à une baisse importante de la survie de l'insecte après injection de la bactérie. Dans le cas d'IML-2, cet effet est lié à une réduction de l'activité de la PO, et dans les trois cas, il est associé à une réduction de l'activité antibactérienne du plasma de l'insecte vis-à-vis de *P. luminescens* (Eleftherianos *et al.*, 2006a ; Eleftherianos *et al.*, 2006b). Parmi les facteurs plasmatiques pouvant être impliqués dans cette activité, il a été montré que des PAMs des familles des Attacines, Cécropines, Lébecines et Moricines ainsi que des Lysozymes sont surexprimés dans le corps gras suite à l'injection de *P. luminescens*. Sauf pour les Lébecines et les Lysozymes, tous ces effecteurs humoraux ont en effet un rôle protecteur vis-à-vis de l'infection par *P. luminescens* lorsque celle-ci est injectée après pré-immunisation de la larve par *E. coli* (Eleftherianos *et al.*, 2006b). L'induction de ces effecteurs humoraux, ainsi que la stimulation de l'activité de la PO en réponse à *P. luminescens* dépend par ailleurs de l'homologue non-catalytique de protéase à sérine SPH3. Le gène codant cette protéine est surexprimé dans le corps gras et les hémocytes en réponse à *P. luminescens* et son inactivation a un effet négatif sur la survie de l'insecte à l'infection par la bactérie (Felföldi *et al.*, 2011).

Les travaux réalisés sur ce modèle ont également permis de mettre en évidence le rôle du peptide ENF activateur des réponses cellulaires PSP, dont l'expression est spécifiquement induite dans le corps gras en réponse à *P. luminescens*. Il a en effet été montré que l'inactivation de l'expression du propeptide par ARN interférence impacte négativement la

survie de l'insecte à l'infection. Cet effet semble être principalement associé à une légère inhibition de la réponse de nodulation (Eleftherianos *et al.*, 2009a). Le rôle du médiateur pro-inflammatoire NO a également été exploré chez ce modèle. L'enzyme responsable de sa synthèse, NOS, est spécifiquement surexprimée dans le corps gras et les hémocytes en réponse à l'injection de *P. luminescens*. Toutefois, son inactivation transcriptionnelle dans ce contexte n'a aucun effet sur la survie de l'insecte à l'infection. Il a en effet été montré que seul le NO produit au niveau intestinal lors d'infections orales par *P. luminescens* peut affecter la survie de l'insecte à l'infection, en inhibant le transfert des bactéries de l'intestin vers l'hémocœle. Ce mode d'infection est toutefois très éloigné des conditions naturelles d'infection par le CNB (Eleftherianos *et al.*, 2009b).

## **2. Approche transcriptomique sur le modèle *Heliothis virescens***

Le lépidoptère *Heliothis virescens* (Noctuidae) est un insecte ravageur de cultures très polyphage. Sa sensibilité au CNB *H. bacteriophora*-*P. temperata* a récemment motivé l'étude de ses réponses transcriptomiques à l'infection par ce potentiel agent de lutte biologique (An *et al.*, 2017). Les auteurs ont analysé les réponses de la larve à trois temps post-infection : le temps 11 heures, qui correspond aux premières détections du nématode dans l'hémocœle, le temps 12 heures, qui correspond aux premières détections de *P. temperata* sous forme libre dans l'hémolymphe, et le temps avancé de 18 heures post-infection.

Selon cette étude, le nématode est d'ores-et-déjà responsable de fortes réponses transcriptionnelles au temps 11 heures, qui incluent la surexpression de divers gènes immunitaires. Parmi eux, on retrouve tout d'abord des membres des voies Toll et Jak-Stat, ainsi que NOS et plusieurs protéases à sérine potentiellement impliquées dans la voie Toll et/ou dans le système de la proPO. On retrouve également divers récepteurs membranaires de la famille des Scavengers, et en accord avec les résultats obtenus chez *Manduca sexta*, des Lectines de type C, diverses PGRPs ainsi qu'un homologue de l'Hémoline. Enfin les effecteurs surexprimés à 11 heures incluent une proPO, des PAMs des familles des Attacines, Léboïcines et Moricines ainsi qu'un Lysozyme et des Chitinases.

La libération du symbiote *P. temperata* dans l'hémocœle à 12 h coïncide avec une baisse d'expression de divers gènes induits par le nématode, tels que des membres de la voie Jak-Stat, des protéases à sérine ou encore des récepteurs Scavengers. A l'inverse, les niveaux

d'expression de quelques gènes, comme de ceux codant des PAMs des familles des Moricines et des Attacines, ainsi que le Lysozyme, deux PGRPs et l'Hémoline, sont augmentés à 12 heures. Les profils d'expression des différents gènes immunitaires se maintiennent ensuite de façon globalement stable jusqu'à 18 heures.

### **3. Approche transcriptionnelle sur le modèle *Spodoptera exigua***

Le lépidoptère *Spodoptera exigua* (Noctuidae) est un ravageur de cultures très polyphage dont les réponses immunitaires aux CNBs *S. carpocapsae-X. nematophila* et *H. bacteriophora-P. luminescens* ont fait l'objet d'une étude récente (Darsouei *et al.*, 2017). Il s'agit d'une analyse temporelle des profils transcriptionnels de trois types de PAMs : les Attacines, généralement actives contre les bactéries à Gram négative, les Cécropines, généralement à large spectre d'activités, et la Spodoptéricine, un PAM de la sous-famille des Défensines, généralement actives contre les bactéries à Gram positive (voir partie I, sections C/2. a., C/2. c., C/2. d.). Les objectifs de l'étude étaient d'une part de comparer les effets de chaque CNB sur l'induction ou la répression transcriptionnelle de ces PAMs, et d'autre part, de comparer les effets du nématode *S. carpocapsae* et de son symbiote *X. nematophila*.

Les résultats de l'étude suggèrent tout d'abord que le CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* est un faible inducteur des réponses antimicrobiennes de l'insecte. En effet, l'infection par ce CNB n'induit que la surexpression des Attacines, avec un niveau d'induction relativement faible (x20) à deux heures, qui décroît ensuite jusqu'à 16 heures. En revanche, le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* induit de fortes surexpressions des Attacines (x600) et des Cécropines (x200), qui atteignent un maximum à 8 heures post-infection par le CNB.

L'analyse détaillée des réponses au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* établit par ailleurs que le nématode aposymbiotique induit principalement une surexpression d'Attacines, avec un niveau d'induction relativement faible (x45), à 4 heures post-infection, tandis que *X. nematophila* induit une surexpression forte des Attacines (x200) à deux heures et des Cécropines (x150) à quatre heures. L'induction des Attacines par *X. nematophila* chute néanmoins fortement entre deux et quatre heures, ce qui n'est pas observé après injection de la bactérie morte. Ces résultats suggèrent que *X. nematophila* est la principale responsable de la modulation de l'expression des Attacines et des Cécropines en réponse au CNB et qu'elle possède tout au moins une capacité à supprimer l'expression des Attacines.

## Conclusion

L'utilisation de *D. melanogaster* comme modèle d'étude des réponses immunitaires des insectes aux CNBs a permis d'établir que malgré leurs nombreuses stratégies immunosuppressives et immunoévasives, les CNBs *H. bacteriophora*-*P. luminescens* et *S. carpocapsae*-*X. nematophila* peuvent induire des réponses immunitaires diversifiées. Ces réponses sont caractérisées par la mobilisation des principales voies signalétiques de l'immunité des insectes, ainsi que de plusieurs familles de protéines de reconnaissance et d'effecteurs. Les outils de manipulation génétique disponibles pour ce modèle ont par ailleurs permis d'identifier différents gènes candidats potentiellement impliqués dans la réponse aux partenaires bactériens et nématodes. Ces travaux nécessitent toutefois d'être approfondis, en raison des fonctions très pléiotropiques de la plupart des acteurs identifiés, notamment dans le cadre de l'étude des réponses aux partenaires nématodes. Le développement d'analyses fonctionnelles chez des modèles lépidoptères ravageurs tels que *M. sexta* est par ailleurs pertinente au regard de l'utilisation des CNB entomopathogènes en lutte biologique. Sur le plus long terme, l'utilisation de ces approches sur différents modèles pourrait en effet permettre d'identifier les spécificités immunitaires qui conduisent à une hétérogénéité de sensibilité aux CNBs entomopathogènes entre genres et espèces d'insectes. En dehors de la poursuite de ces travaux fonctionnels, un enjeu majeur pour la compréhension des dialogues s'établissant entre les CNBs et le système immunitaire de leurs hôtes est de resituer les réponses immunitaires dans le contexte du processus infectieux. Les analyses réalisées sur les modèles *H. virescens* et *S. exigua*, qui visent à discriminer les effets de chaque partenaire au cours du temps post-infection sur l'induction des réponses immunitaires, s'inscrivent dans cette démarche.

# TRAVAUX DE THESE

## Objectifs et démarche

Dans le contexte des études présentées précédemment, mon travail de thèse consiste en l'initiation d'un travail d'analyse et de caractérisation moléculaires des réponses immunitaires du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) à l'infection par le complexe nématobactérien (CNB) entomopathogène *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*. Il s'agit d'une première étude globale des réponses transcriptionnelles d'un modèle lépidoptère à ce CNB, qui est l'un des plus étudiés et l'un des plus utilisés en lutte biologique contre les lépidoptères ravageurs de cultures (Eleftherianos *et al.*, 2017 ; Lacey *et al.*, 2015). Il s'agit également de la première étude détaillée des réponses immunitaires de *S. frugiperda*, un ravageur de cultures polyphage et résistant à la plupart des pesticides chimiques à l'infection par un CNB entomopathogène (Gouin *et al.*, 2017 ; Gutiérrez-Moreno *et al.*, 2019).

La principale nouveauté de notre approche par rapport à celles utilisées sur d'autres modèles est l'introduction d'une dimension topologique à l'analyse des réponses transcriptionnelles de l'insecte. En effet, nous avons débuté cette étude par une description des réponses transcriptomiques des trois principaux tissus immunocompétents confrontés au CNB, soient l'intestin moyen, les hémocytes et le corps gras. L'utilisation d'une telle approche devait nous permettre d'être très résolutif dans l'identification des gènes différentiellement exprimés, mais aussi d'obtenir une image plus structurée des réponses immunitaires induites et du contexte dans lequel les gènes candidats sont surexprimés ou sous-exprimés. A l'issue de cette analyse topologique, nous avons poursuivi notre description globale et contextualisée des réponses immunitaires de l'insecte en étudiant la dynamique des réponses identifiées au cours du temps post-infection ainsi que les effets respectifs de chaque partenaire du CNB sur ces réponses. Nous avons ensuite défini les gènes candidats nous paraissant les plus intéressants afin d'amorcer la caractérisation moléculaire de la réponse immunitaire de *S. frugiperda* au CNB.

## **I. Analyse globale des réponses transcriptomiques des tissus immunocompétents à l'infection par le CNB**

L'analyse des réponses transcriptomiques des tissus immunocompétents à l'infection par le CNB a fait l'objet de notre premier article, « *Spodoptera frugiperda* transcriptional response to infestation by *Steinernema carpocapsae* », qui a été publié dans la revue Scientific Reports le 9 septembre 2019. Les principaux éléments de cet article sont résumés ci-dessous.

### **A. Approche expérimentale**

Des groupes de 9 larves (stade 6) de *S. frugiperda* ont été mis en contact de façon individuelle avec une suspension contenant 150 CNBs (condition exposée) ou une solution dépourvue de CNB (condition contrôle). Au cours de trois expériences indépendantes, les intestins moyens, corps gras et hémocytes des larves ont été prélevés et regroupés par condition à 8 heures ou à 15 heures post-contact. Le temps 8 heures correspond aux débuts de la libération et/ou de la croissance de *X. nematophila* dans le corps de l'insecte, tandis que le temps 15 heures correspond à l'apparition de la septicémie et à environ 14 heures avant les premières mortalités. Ces temps ont été respectivement choisis pour favoriser l'observation des réponses au partenaire nématode et au partenaire bactérien. Sauf pour les hémocytes à 8 heures (en raison de contraintes budgétaires), les banques d'ADNc produites à partir de chaque échantillon ont ensuite été séquencées selon la méthode Illumina sur 50 paires de bases et les données ont été analysées à l'aide des logiciels Bowtie2 et DESeq2.

Un design particulier a été utilisé pour l'analyse de l'expression différentielle des gènes, en raison de l'utilisation d'une plateforme de séquençage différente pour les échantillons correspondant aux intestins moyens et aux corps gras des larves contrôles à 15 heures. Nous avons tout d'abord recherché les gènes différentiellement exprimés (DE) entre tous les échantillons correspondant à la condition contrôle et tous ceux correspondant à la condition exposée au CNB, quels que soient le temps et le tissu. Le regroupement de toutes ces données nous a permis d'utiliser un test de maximum de vraisemblance pour sélectionner les gènes dont la variation d'expression entre les deux conditions n'est pas significativement affectée par le changement de plateforme. Nous avons ensuite effectué des tests d'expression différentielle classiques par tissu et par temps sur les gènes sélectionnés. Pour l'interprétation biologique des données, nous avons finalement séparé les gènes DE en

plusieurs groupes suivant que leurs expressions soient significativement modulées dans un, deux ou dans les trois tissus à 15 heures.

## **B. Principaux résultats**

Nos résultats indiquent tout d'abord qu'aucune réponse transcriptionnelle significative n'est induite dans l'intestin moyen à 8 heures, et que les réponses du corps gras sont également très restreintes à ce temps. Ces dernières correspondent à une surexpression de 5 gènes, dont un gène métabolique et 4 gènes sans homologie avec des séquences connues.

Au temps 15 heures, nous avons identifié un total de 216 gènes DE toutes catégories confondues, dont 185 sont surexprimés. Parmi eux, la plupart des gènes immunitaires sont retrouvés dans la catégorie commune aux hémocytes et au corps gras, qui comprend 35 gènes immunitaires surexprimés. Ces gènes codent principalement des protéines impliquées, entre autre, dans l'immunité humorale antimicrobienne telles que des PGRPs, des peptides appartenant à toutes les familles de PAMs connues de *S. frugiperda* (Attacines, Cécropines, Glovérines, Lébovines, Défensines et Moricines) (Gouin *et al.*, 2017) et des membres de la voie Toll. Ils codent également 5 homologues des Insect metalloproteinase inhibitors (IMPIs) de *Galleria mellonella*, qui sont impliqués dans l'inhibition de facteurs de virulence microbiens (Vilcinskas *et al.*, 2002). Seuls les gènes immunitaires codant le récepteur Toll et la protéine de synthèse de la mélanine Yellow f ont été identifiés parmi les gènes surexprimés dans les catégories spécifiques au corps gras et aux hémocytes, respectivement.

Peu de gènes immunitaires DE ont été retrouvés dans les catégories comprenant l'intestin moyen. Ils incluent le régulateur négatif Cactus de la voie Toll, le facteur de transcription Relish de la voie Imd et le facteur associé à la mélanisation et à la nodulation Hdd23 (Qiao *et al.*, 2014), qui sont surexprimés dans les trois tissus. Dans la catégorie spécifique à l'intestin moyen, ils incluent également un gène surexprimé (Hsp68) et un gène sous-exprimé (E3 ubiquitine ligase Siah1), dont les variations d'expression pourraient participer à un processus de renouvellement de l'épithélium intestinal en réponse à des dommages (Biteau *et al.*, 2010 ; Dimitrova *et al.*, 2010 ; Liu and Jin, 2017).

En dehors de la modulation de l'expression de ces gènes immunitaires ou potentiellement immunitaires, nous avons principalement été interpellés par une surexpression très forte dans les trois tissus à 15 heures de 4 gènes de fonctions inconnues. Ces gènes sont répartis dans



deux clusters au niveau du génome de l'insecte. Le premier, celui des *Unknowns (UNKs)*, comprend 5 gènes non-homologues entre eux, et est localisé à proximité du gène *tamozhennic*, qui code une protéine impliquée dans la nucléarisation de Dorsal chez la *Drosophile* (Minakhina *et al.*, 2003). Ce cluster comprend les 4 gènes inconnus surexprimés dans le corps gras à 8 heures. Le second, celui des *Genes with bacterial homology (GBHs)*, comprend 3 gènes comportant des homologies de séquences et qui semblent coder des protéines dont des homologues ne sont retrouvés que chez les lépidoptères et diverses bactéries à Gram positive. Ce cluster est localisé au milieu d'un autre cluster comprenant des gènes codant des PAMs de la famille des Défensines.

### C. Conclusions

A l'issue de cette analyse, nos principales conclusions sont tout d'abord qu'aucune réponse immunitaire ne semble être induite à 8 heures, ainsi qu'à 15 heures dans l'intestin moyen. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse émise par une autre équipe d'une absence de reconnaissance du nématode *S. carpocapsae* par le système immunitaire de ses hôtes (Mastore *et al.*, 2015 ; Binda-Rossetti *et al.*, 2016). Elles nécessiteraient toutefois d'être confirmées par des études complémentaires, telles qu'une analyse des réponses transcriptionnelles des hémocytes à 8 heures, des analyses transcriptionnelles indépendantes des réponses des différents segments de l'intestin moyen (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018), ainsi que des travaux de caractérisation fonctionnelle des gènes *UNKs* et *GBHs*.

En revanche et en accord avec les études transcriptomiques réalisées sur d'autres modèles (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017 ; An *et al.*, 2017), nos résultats montrent que des réponses antimicrobiennes diversifiées sont induites à 15 heures, aussi bien dans le corps gras que dans les hémocytes. Malgré leurs spécificités fonctionnelles, les deux tissus produisent des réponses très similaires, ce qui suggère qu'ils perçoivent les mêmes stimuli. L'intensité de ces réponses indique que la stratégie précédemment identifiée chez *X. nematophila* de suppression transcriptionnelle de l'expression des PAMs (Ji and Kim, 2004 ; Park *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Darsouei *et al.*, 2017) ne peut expliquer à elle seule l'échec des réponses antimicrobiennes de *S. frugiperda* dans le cadre de l'infection par le CNB. Enfin, nos résultats ont révélé une puissante induction transcriptionnelle de l'expression de deux clusters de gènes inconnus, les *UNKs* et les *GBHs*, dont les localisations génomiques

suggèrent qu'ils pourraient appartenir à l'immunité. Les homologies entre les séquences protéiques correspondant aux *GBHs* et celles de protéines bactériennes nous ont conduits à l'hypothèse d'une potentielle acquisition par transfert horizontal de gènes bactériens, ce qui n'a jamais été rapporté chez les insectes pour des gènes immunitaires.

#### **D. Article 1**

OPEN

# *Spodoptera frugiperda* transcriptional response to infestation by *Steinernema* *carpocapsae*

Louise Huot<sup>1</sup>, Simon George<sup>1</sup>, Pierre-Alain Girard<sup>1</sup>, Dany Severac<sup>2</sup>, Nicolas Nègre<sup>1</sup> & Bernard Duvic<sup>1</sup> 

*Steinernema carpocapsae* is an entomopathogenic nematode (EPN) used in biological control of agricultural pest insects. It enters the hemocoel of its host via the intestinal tract and releases its symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. In order to improve our knowledge about the physiological responses of its different hosts, we examined the transcriptional responses to EPN infestation of the fat body, the hemocytes and the midgut in the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*. The tissues poorly respond to the infestation at an early time post-infestation of 8 h with only 5 genes differentially expressed in the fat body of the caterpillars. Strong transcriptional responses are observed at a later time point of 15 h post-infestation in all three tissues. Few genes are differentially expressed in the midgut but tissue-specific panels of induced metalloprotease inhibitors, immune receptors and antimicrobial peptides together with several uncharacterized genes are up-regulated in the fat body and the hemocytes. Among the most up-regulated genes, we identified new potential immune effectors, unique to Lepidoptera, which show homology with bacterial genes of unknown function. Altogether, these results pave the way for further functional studies of the responsive genes' involvement in the interaction with the EPN.

There is a growing desire in Europe to reduce the use of chemical pesticides on agricultural land, because of their toxicity for the environment and human health (European Directive EC91/414). Also, the development of alternative methods for the control of crop pests is encouraged. These methods include the use of predators and pathogens of insect pests such as viruses, bacteria, fungi, parasitoid wasps and entomopathogenic nematodes (EPNs).

EPNs of the genus *Steinernema* associated with the symbiotic bacterium *Xenorhabdus* are among the most widely used and studied biological control agents<sup>1</sup>. They pose little threat to human health and non-target species<sup>2</sup>, but are capable of killing a broad spectrum of insect pests including the moth *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)<sup>3,4</sup>. The infestation cycle of the nematode *Steinernema carpocapsae* has been well described. It starts with the entry of infective juvenile larvae (IJ) into the insect intestinal tract via the natural orifices<sup>5</sup>. Once the intestinal epithelium is crossed, EPNs are found in the hemocoel where they release their symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophila*. There, both the nematodes and their symbiotic bacteria cause the death of the insect in less than 48 h, thanks to a multitude of immunosuppressive virulence factors<sup>6–15</sup>. Then, EPNs multiply by feeding on the insect tissues, reassociate with their symbiotic bacteria<sup>16</sup> and finally go back to the environment in search for a new prey<sup>17</sup>.

Insects live in environments containing microorganisms (bacteria, fungi or viruses) potentially pathogenic for them. To defend themselves against these aggressors, insects have developed a powerful and diversified immune system essentially based on innate immunity but also on an adaptive-like immunity<sup>18,19</sup>. While the adaptive-like immunity is essentially directed against viruses, the innate immunity is the main mechanism involved in defense against bacteria and eukaryotic pathogens. Innate immunity has been well described in the *Drosophila* model<sup>20</sup>. Its main mechanisms and pathways seem to be conserved in different orders of insects<sup>21–23</sup> even though some insects, such as *Apis mellifera* or *Acyrtosiphon pisum*, have reduced immune repertoire<sup>24,25</sup>. The first line of

<sup>1</sup>DGIMI, Univ Montpellier, INRA, Montpellier, France. <sup>2</sup>MGX, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.N. (email: [nicolas.negre@umontpellier.fr](mailto:nicolas.negre@umontpellier.fr)) or B.D. (email: [bernard.duvic@umontpellier.fr](mailto:bernard.duvic@umontpellier.fr))

defense are physical barriers, including the cuticle, which covers almost all insects' interfaces with the environment, and the peritrophic matrix, which replaces the cuticle in the midgut<sup>26</sup>. The cuticle is a thick exoskeleton made of wax, chitin and sclerotized proteins that confers mechanical protection against wounds and invaders<sup>27</sup>, while the midgut peritrophic matrix is a thinner network of chitin and proteins that allows the uptake of nutrients but which has a low permeability to microorganisms and toxins<sup>28</sup>. The intestinal epithelium can produce several immune molecules such as antimicrobial peptides (AMP) or reactive oxygen species depending on the location<sup>26</sup>. Once into the hemolymph, parasites are facing circulating hemocytes, which are the immune blood cells of insects. Hemocytes participate in sclerotization, coagulation as well as in the elimination of small pathogens (bacteria and yeasts) by phagocytosis and nodulation, and of large pathogens (parasitoid wasp eggs, nematodes) by encapsulation<sup>29</sup>. Encapsulation, nodulation and coagulation also involve a process of melanisation, which results in the formation of melanin and toxic chemicals that help to sequester and to kill the pathogen<sup>30</sup>. Melanisation is activated by an extracellular proteolytic cascade, the pro-phenoloxidase system, following the recognition of microbial determinants or danger signals<sup>31</sup>. Finally, the systemic response of insects relies mainly on the massive secretion of AMP by the fat body into the hemolymph, after activation of the IMD and/or Toll pathways. The IMD pathway is primarily activated by peptidoglycan recognition proteins (PGRP) in response to Gram-negative bacteria and the Toll pathway by PGRP and Gram negative binding proteins (GNBP) in response to Gram-positive bacteria and fungi<sup>32</sup>. The Toll pathway may also be activated by exogenous proteases from pathogens<sup>33</sup>.

Recently, different studies performed in the model insect, *Drosophila melanogaster*, described the responses of this insect to two EPNs, *Steinernema carpocapsae* or *Heterorhabditis bacteriophora*<sup>34–36</sup>. By the use of transcriptomic approaches on whole larvae or adult flies, the authors showed the overexpression of a large number of immune-related genes involved in defense responses such as coagulation, melanisation and the production of antimicrobial peptides, and in several immune and stress-reponse pathways (Toll, Imd, Jak/Stat or JNK).

Since EPNs can be used in biological control, we wished to study their effect in a crop pest against which they could be directed. *S. frugiperda* is an important pest of cultures such as maize, sorghum, rice and cotton and has recently become a worldwide menace since its invasion of Africa in 2016<sup>37</sup>. In this study, we carried out a transcriptomic analysis of the fat body, hemocytes and the midgut of 6<sup>th</sup> instar *S. frugiperda* larvae at two time points after infestation with the EPN *S. carpocapsae*. At 8 hours after infestation (hpi), we found only 5 genes that were differentially expressed in the fat body. However, at 15 hpi, we detected the significant expression modulation of 271 genes. Few genes were differentially expressed in the midgut whereas strong transcriptional responses were observed in the fat body and the hemocytes. These responses consisted mainly in the overexpression of induced metalloprotease inhibitors (IMPI), immune receptors (mostly PGRP) and AMP, indicating that the fat body as well as the hemocytes produce potent immune responses. Among the most up-regulated genes, we identified a cluster of new potential immune effectors, unique to Lepidoptera, which show homology with bacterial genes of unknown function. Finally, we identified a cluster of genes that are overexpressed in all tissues, but whose function is unknown and which are restricted to some noctuid species.

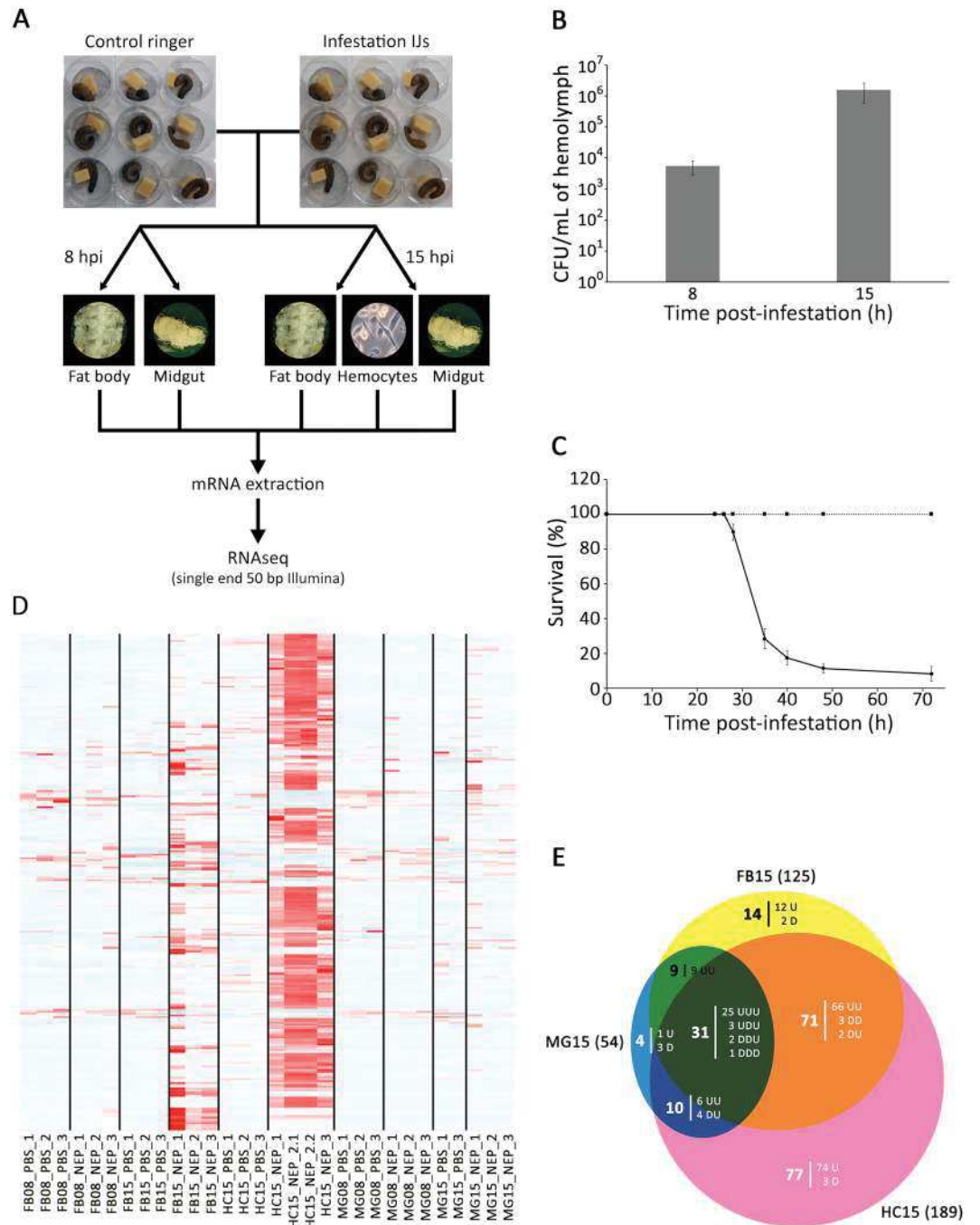
## Results and Discussion

**EPNs infestation and pathogenicity.** To measure how *S. frugiperda* larvae respond to entomopathogenic nematodes (EPNs), we performed infestation experiments where 6<sup>th</sup> instar larvae were individually put in contact with either Ringer solution (control experiment) or a solution of EPNs in Ringer (infestation condition) at time T = 0 (see Methods and Fig. 1A). We targeted two time points after infestation based on our previous knowledge of the mode of infestation<sup>16</sup>. Eight hours post infestation (hpi), nematodes are supposed to have travelled in the intestinal tract of *S. frugiperda* larvae, crossed the intestinal barrier and started releasing their symbiotic bacteria, *Xenorhabdus nematophila*, within the hemocoel of the caterpillar<sup>16</sup>. At 15 hpi, bacteria have multiplied and septicemia is supposed to be reached. In order to verify these assertions, we quantified the *X. nematophila* cells into the hemolymph by CFU counting on a selective medium. In parallel, the survival of the caterpillar to the EPNs infestation was monitored for 72 h. Our data show that bacterial growth has already started at 8 hpi, from few bacterial cells released to 10<sup>4</sup> cells/mL of hemolymph and up to 10<sup>6</sup> cells/mL at 15 hpi, which is considered septicemia (Fig. 1B). When we measured survival of the larvae following infestation, we observed that the first deaths occur at 28 hpi. At 72 hpi, 92% of treated larvae were dead (Fig. 1C) whereas no death was observed in the control experiments.

At 8 hpi and 15 hpi, we removed the larvae from either the control or the infestation plates and dissected three tissues: the midgut (MG), the fat body (FB) and the hemocytes (HC at 15 hpi only). From these tissues, RNA was extracted and processed to perform single end 50 bp Illumina sequencing on three biological replicates (Fig. 1A). We recovered between 10 and 100 million reads per sample, of which between 50 and 70% align onto the reference transcriptome for *S. frugiperda*<sup>38</sup> (see Methods and Table S1). After normalization with DESeq2<sup>39</sup>, we observed that gene expression datasets cluster by tissue (Supplementary Fig. S1) and that within tissues, condition replicates correlate well with each other.

**Overview of transcriptional response.** In midgut (MG) and fat body (FB), at 8 hpi, we detected a very small transcriptional response with only 5 statistically significant differentially expressed (DE) genes in FB and none in MG (Supplementary Fig. S2). From these, 4 genes are overexpressed in response to infestation and are also retrieved overexpressed at later time-points in all 3 tissues (Supplementary Fig. S3). They are annotated in the genome as unknown transcripts.

At 15 hpi, there is a dramatic transcriptional response with thousands of DE genes in all three tissues at padj < 0.01 (Supplementary Fig. S2), with in each case, more genes overexpressed than underexpressed. In order to detect the most significant genes responding to EPNs infestation at 15 h, we modeled the EPN effect across all datasets and identified 271 DE genes (Fig. 1D) which we intersected with all previous 1 on 1 comparison per conditions (see Methods). Of these, we identified a total of 216 DE genes at 15 hpi in the three different tissues



**Figure 1.** Tissue specific transcriptional response time series of *Spodoptera frugiperda* larvae to EPN infestation. **(A)** Overview of the experimental design. In three independent experiments, 9 infested and 9 control larvae from culture plates were dissected at 8 hpi and 15 hpi. Hemocytes, fat bodies and midguts were extracted and pooled by organ for each time and condition. Polyadenylated RNAs were purified from these pools and corresponding cDNA libraries were built. cDNA were sequenced on a single end by Illumina and RNAseq data were analyzed to identify the genes that are differentially expressed during *Steinernema carpocapsae* infestation. **(B)** Growth of *Xenorhabdus nematophila* following *S. frugiperda* infestation with 150 symbiotic *S. carpocapsae*. At 8 hpi and 15 hpi, the number of CFU per mL of hemolymph was estimated from three independent experiments with three technical replicates (three larvae per technical replicate). Error bars indicate standard errors of the means. **(C)** Survival curve. Larvae were infested with 150 nematobacterial IJ. Data represent means  $\pm$  SEs of four independent experiments, each containing 12 larvae. **(D)** Significantly differentially expressed genes in response to EPN. This heatmap shows z-score of expression variation across all RNAseq samples (red being overexpressed and blue under-expressed) for 271 genes with significant variations to EPN infestation. **(E)** Venn diagram showing the tissue specificity of the EPN responsive genes at 15 hpi. The response can be overexpression (Up:U) or under-expression (Down:D). For example, there are 71 genes varying significantly upon EPN infestation in both the fat body (FB) and the hemocytes (HC). Of these, 66 are up-regulated in both tissues (UU), 3 are down-regulated in both tissues (DD) and 2 are down-regulated in FB and up-regulated in HC (DU). By convention, the order of the U and D letters represent respectively MG, FB and HC tissues.

Tissue	Midgut (MG)	Fat body (FB)	Hemocytes (HC)
Differentially expressed genes (padj < 0.01)	54	125	189
Overexpressed genes (padj < 0.01, Log2FC > 0)	41 (75.9%)	115 (92.0%)	182 (96.3%)
Underexpressed genes (padj < 0.01, Log2FC < 0)	13 (24.1%)	10 (8.0%)	7 (3.7%)

**Table 1.** Differentially expressed genes per condition at 15 hpi.

(Fig. 1E). Most of the response occurred in FB and HC tissues (Fig. 1E, Table 1) with, again, a vast majority of overexpressed genes (Fig. 1D,E, Table 1).

The data obtained by RNAseq were confirmed by quantitative RT-PCR on a selection of DE genes in the three tissues (Supplementary Fig. S4).

**Functional response of the midgut at 15 hpi.** The first line of defense against *S. carpocapsae* EPN is the midgut barrier, which is also the main entry point of *Steinernema* nematodes in *S. frugiperda*<sup>6</sup>. This organ is known for its immune activity through the production of reactive oxygen species and anti-microbial peptides in response to pathogens<sup>40</sup>. It is not supposed to be directly confronted to *X. nematophila*<sup>16,41</sup> and therefore, we hypothesized that the genes, which would be overexpressed specifically in the midgut may identify anti-nematode factors. However, we did not find any DE genes in the midgut at 8 hpi and only 4 genes that were DE specifically in the midgut tissue at 15 hpi, with only 1 being overexpressed and 3 under-expressed (Fig. 2A). The overexpressed gene encodes a heat-shock protein of the hsp70 family (Supplementary Data S1). This superfamily of genes is usually upregulated in response to oxidative stress and in the midgut of *Drosophila*, Hsp68 promotes the proliferation of intestinal stem cells, and thus its regeneration<sup>42</sup>.

One of the under-expressed genes is an E3 ubiquitin-protein ligase of the Seven In Absentia family (SIAH). The mammalian homologue Siah1 cooperates with SIP (Siah-interacting protein), the F-box protein Ebi and the adaptor protein Skp1, to target beta-catenin, a multifunctional protein that plays an important role in the transduction of Wnt signals and in the intercellular adhesion by linking the cytoplasmic domain of cadherin, for ubiquitination and degradation via a p53-dependent mechanism. Thus, down-regulation of SIAH might increase levels of  $\beta$ -catenin, which favors proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*<sup>26</sup>.

The two other under-expressed genes are an ABC family transporter and an NT-C2 domain protein, for which no obvious link to infestation or to intestinal homeostasis can be established from the literature.

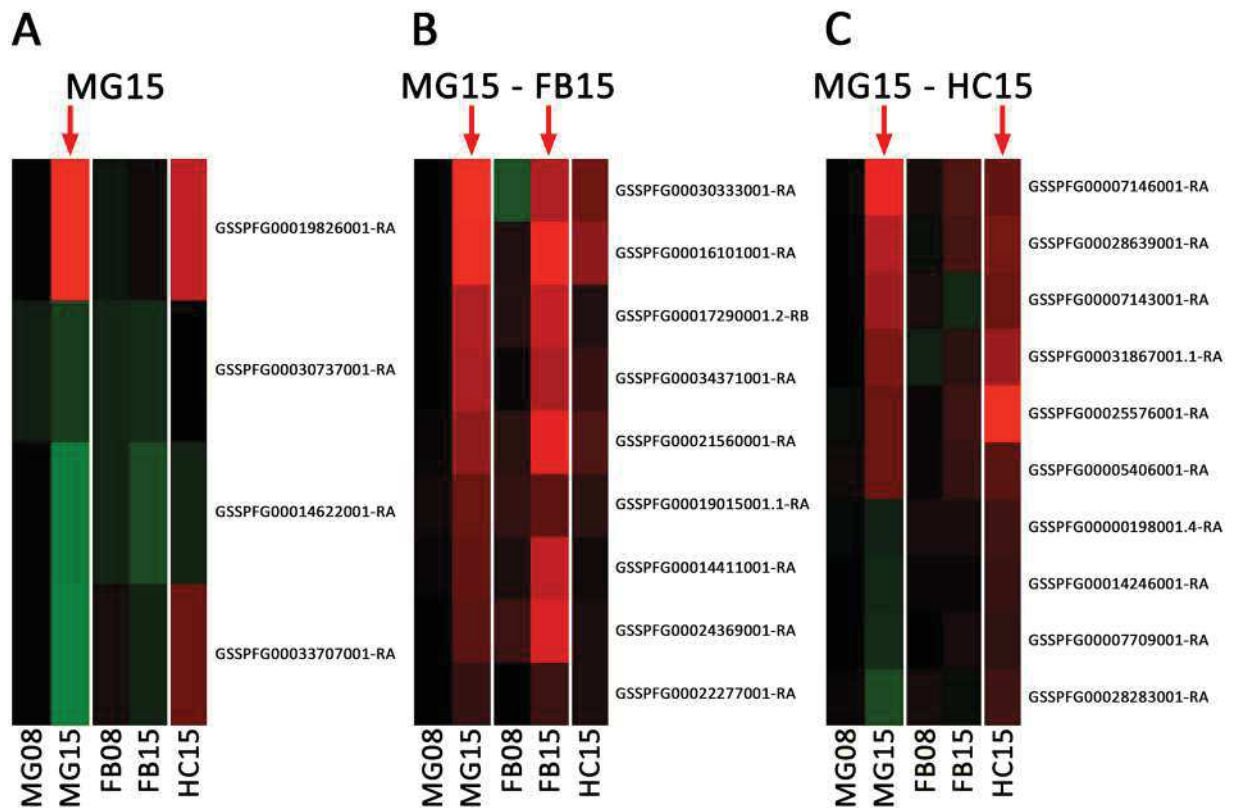
While we found no evidence of a direct response to EPNs specifically by the midgut, we investigated whether this tissue may share a common immune response with the fat body or the hemocytes.

We found nine common DE genes between the midgut and the fat body, which are all overexpressed in both tissues (Fig. 2B). Of those, three genes have no annotated structure or function. Four other genes with no clear homology have domains that can be associated to regulation (protein-kinase domain, calcium binding domain, amino-acid transporter and MADF domain transcription factor) (Supplementary Data S1). Interestingly, we found a cytochrome P450 gene encoding the CYP340L16. CYP genes are usually involved in detoxification of foreign chemicals such as plant xenobiotics and pesticides<sup>43</sup>. Finally, one trypsin inhibitor-like cysteine rich domain proteinase inhibitor was also overexpressed. There is no enrichment for a specific molecular function or biological process among those nine genes.

Similarly, 10 genes were found significantly differentially expressed in both the midgut and hemocytes, with 6 of them being overexpressed in both tissues and 4 being under-expressed in MG and upregulated in HC (Fig. 2C). Of the 6 overexpressed genes, 4 are small solute transporters of the Major Facilitator Superfamily (MFS), 1 is an antennal carboxylesterase and 1 is a proteinase inhibitor (Supplementary Data S1). No particular function of note has been identified for the 4 genes that were under-expressed in MG but overexpressed in HC, except for Iap2, which is an inhibitor of apoptosis and a member of the IMD pathway<sup>44</sup>.

From this comparison, it seems likely that the midgut is not specifically involved in the defense of the *S. frugiperda* larvae against EPNs infestation. There are few DE genes in this tissue, whether specific or in common with other tissues, and no specific functional pathway can be clearly identified. Rather, some of the genes identified may be reacting to oxidative stress and homeostasis maintenance of the intestinal epithelium, which might be consequences of the host infestation. The question remains whether the midgut is normally immunocompetent against EPNs in *S. frugiperda* or if this response is altered by EPNs. Indeed, several studies show that EPN can either evade detection by immune systems<sup>45–47</sup> or modulate it<sup>6,48</sup>. However, in this latter hypothesis, we would still observe an immune reaction at the transcriptional level, which is not the case.

**Specific response of the fat body at 15 hpi.** In insects, the adipocytes that compose the fat body are in direct contact with the hemolymph. The physiological function of this organ is to store energetic reserves, in the form of glycogen and lipids, and release them if needed<sup>49</sup>. It is also the main tissue involved in systemic immunity, since it produces AMP during immune challenge<sup>30</sup>. We found 14 DE genes specifically in the fat body, with 12 overexpressed and 2 under-expressed genes. Among the latter are 1 uncharacterized protein and 1 putative transposable element (TE). Among the 12 fat body-specific up-regulated genes, we found one major actor of immunity, the Toll receptor<sup>50</sup>, which recognizes the cleaved circulating cytokine Spätzle to induce the production of anti-microbial peptides<sup>51</sup>. It is noteworthy that Toll receptor is expressed in all three tissues, but overexpressed in response to EPNs in the fat body only (Fig. 3A). Among the 11 other overexpressed genes, we found one



**Figure 2.** Midgut Associated Response. Heatmaps of differential expression (in log<sub>2</sub>FoldChange - green, under-expression, red, overexpression according to values in Supplementary Data S1) across all experimental conditions of genes found significantly differentially expressed (A) specifically in the MG at 15 hpi (MG15 - 4 genes) (B) common to MG15 and FB15 (9 genes) and (C) common to MG15 and HC15 (10 genes).

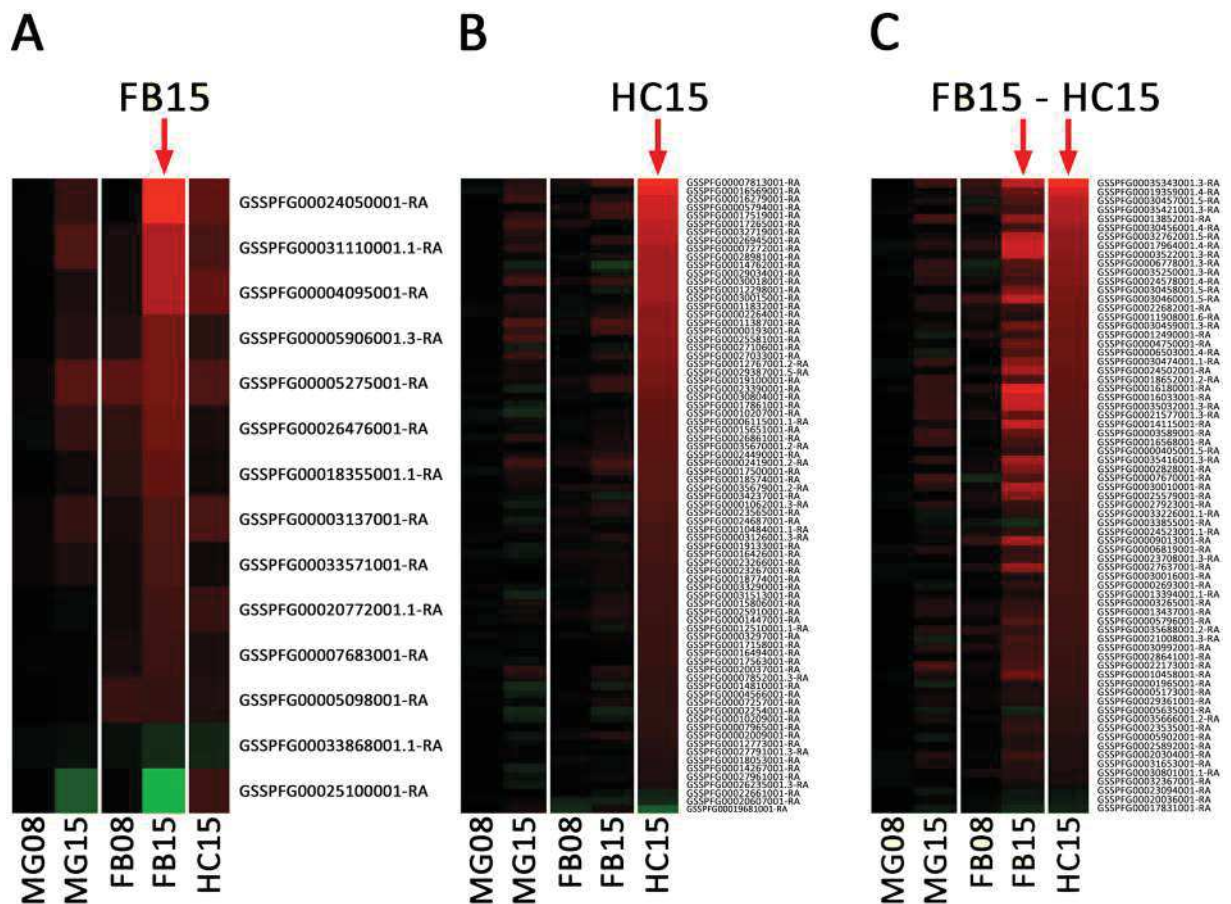
potential receptor of the arrestin family, several enzymes (lipase, carboxypeptidase and a GTPase co-factor), again a MADF-domain transcription factor and a dynein (Supplementary Data S1).

**Specific response of the hemocytes at 15 hpi.** In insects, hemocytes are the main actors of the cellular immune responses like phagocytosis or encapsulation<sup>52</sup>. They are also involved in other defense mechanisms such as coagulation<sup>53</sup>, and melanization<sup>54,55</sup>. In addition, different reports have shown that hemocytes are, as the fat body, capable of synthesis of AMP<sup>56-58</sup>. Therefore, we hypothesized that genes specifically induced in the hemocytes may be involved in coagulation and/or melanization along with cellular immune responses.

The largest number of DE genes is found specifically in the hemocytes with 77 genes (Fig. 1E), of which 74 are overexpressed in response to EPNs infestation (Fig. 3B). No enriched GO categories have been detected in this list. However, we noticed several categories of genes of interest. The most overexpressed gene encodes a serine protease without CLIP-domain (Supplementary Data S1) that is homologous to hemolymph proteinase 7 (HP7) and 10 (HP10) in *Manduca sexta*<sup>59</sup>. In the insect immune system, serine proteases participate in the activation of Toll-dependent response to infection as well as in the prophenoloxidase-dependent melanization cascade<sup>60</sup>. However, many serine-proteases, in particular without CLIP-domains such as HP7 & HP10, still have unknown function. They are regulated by protease inhibitors, a large family of small peptides, one of which is also found highly induced in our list (Supplementary Data S1) (log<sub>2</sub>FoldChange = 8.06). This induction suggests a role of HP7/HP10 in the specific activation of hemocytes after infestation by EPNs.

The molecular functions we found in the hemocytes specific gene list include MFS transporters, ubiquitin-conjugating enzymes, sina-like, antennal esterases, heat-shock proteins and several protein kinases. We also noticed several genes that may play a role in vacuolar trafficking and signaling, with several transmembrane domain proteins. The general molecular function of these genes makes it hard to link them to any biological process.

Surprisingly, we noticed that very few genes linked to immunity were present in this list. In particular, we have not found a deregulation of genes linked to the activation of the PPO pathway besides the above-mentioned serine proteases. The only gene that we could relate to melanization is homologous to the L-dopachrome tautomerase Yellow-f2 that is responsible for the conversion of DOPA into dopamine, a precursor of melanin. This observation suggests that the humoral immune response is not cellular autonomous in the hemocytes and implies a cooperation between the fat body and the hemocytes. However, the cellular response seems to be restricted to hemocytes.



**Figure 3.** Fat body and hemocytes associated responses. As in Fig. 2, heatmaps of differential expression for genes (A) specific to FB15 (14 genes), (B) specific to HC15 (77 genes) and (C) common to FB15 and HC15 (71 genes).

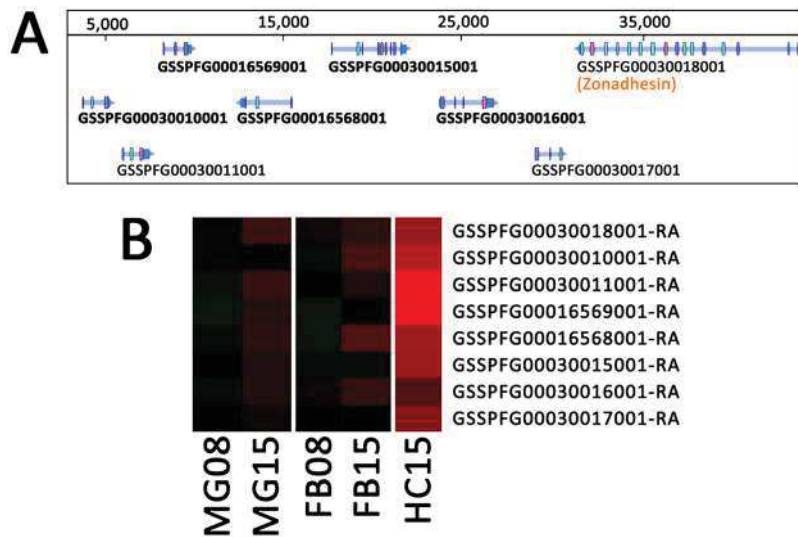
Three transcription factors are also found overexpressed in HC, including VriIle. VriIle is known to activate the serine protease Easter that, in turns, cleaves the Spätzle protein that is the ligand of Toll receptor, which we found overexpressed in the fat body (see above). Other genes involved in immunity are Pellino which might be either a negative regulator<sup>61</sup> or an enhancer<sup>62</sup> of the Toll pathway, and IMD which is a member of the IMD pathway.

**Common response of the fat body and the hemocytes at 15 hpi.** We identified 71 genes differentially expressed upon EPNs infestation in both FB and HC tissues (Fig. 1E), 66 of them being overexpressed in both tissues. The “immunity” ontology is the most enriched GO category (Supplementary Fig. S5). The most overexpressed genes correspond to a battery of anti-microbial peptides (attacins, cecropins, defensins, gloverins and moricins) (Supplementary Data S1). We identified by homology a repertoire of 40 AMP in the genome of *S. frugiperda*, classified in 7 different families<sup>38</sup>. The majority of AMP production is performed by the FB tissue with members of the attacins, cecropins, gloverins and lebcocins strongly overexpressed (Fig. 3C). These AMP are also significantly overexpressed in the HC but to a lesser extent (Fig. 3C). Defensins such as the gallerimycin<sup>63</sup> and Spod-x-tox<sup>64</sup> are overexpressed in both tissues. Remarkably, of the 10 moricins present in *S. frugiperda* genome, only Moricin 10 is strongly overexpressed in both tissues. The diapausin overexpression is less clear with low levels of expression.

Among the most overexpressed genes in both FB and HC tissues, we also identified several members of the peptidoglycan recognition proteins (PGRP) (Supplementary Data S1), a family of receptors, which are involved in the recognition of pathogens associated molecular patterns (PAMP) and in the subsequent activation of the Toll, Imd and PPO system pathways<sup>31,32</sup>. In the genome of *S. frugiperda*, we identified 10 PGRP (Supplementary Fig. S6) that were named according to *Bombyx mori* nomenclature<sup>21</sup>. Upon EPNs infestation, PGRP-S2, -S6 and -L3 are overexpressed in both FB and HC, with PGRP-S2 being the highest overexpressed (Supplementary Data S1). A phylogenetic analysis (Supplementary Fig. S6) shows that PGRP-S2 is closely related to *Drosophila melanogaster* PGRP-SA, which is involved in the induction of the Toll pathway<sup>65</sup>. Recently, it has also been reported that a PGRP-SA homolog may be responsible for the activation of the phenoloxidase system in the Chinese tussar moth *Antheraea pernyi*<sup>66</sup>.

This overexpression of AMP and PGRP upon EPNs infestation has been similarly observed in transcriptomic studies of *Drosophila melanogaster* larvae infested by *Heterorhabditis* sp. or *Steinernema* sp. nematodes<sup>34–36</sup>.





**Figure 4.** Inducible MetalloProtease Inhibitor. (A) WebApollo viewer showing the annotation of inducible metalloprotease inhibitors genes in cluster on the scaffold\_1741 in the genome of *Spodoptera frugiperda*. (B) As in Fig. 2, heatmap of differential expression for the identified IMPI genes.

Other immunity genes overexpressed in both tissues are implicated in the Toll pathway. This pathway is activated by PAMP recognition proteins or by proteases from pathogens<sup>33,67</sup>. Signal is transduced by an intracellular complex (MyD88/Tube/Pelle) that binds to the intracytoplasmic domain of Toll and is regulated by Pellino<sup>61,62</sup>. Signal transduction results in the phosphorylation of the ankyrin-repeat containing protein Cactus, which allows its dissociation from the transcription factor Dorsal. This dissociation promotes the translocation of Dorsal to the nucleus where it activates the production of AMP. Several members of this pathway are overexpressed in both FB and HC at 15 hpi, including Pelle, Pellino, and Cactus. Altogether, these results suggest that the Toll pathway is activated in both the fat body and the hemocytes.

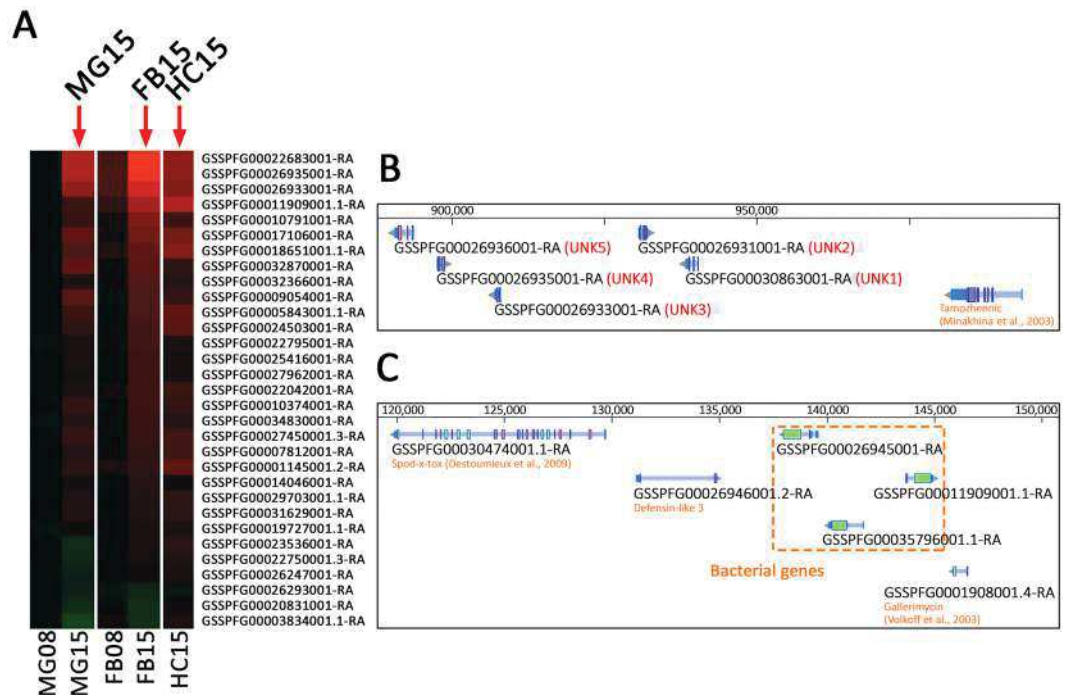
We also observed the overexpression of Hdd23 which mediates PPO activation<sup>68</sup> and of 3 putative transcription factors, one of them containing a zinc-finger domain (GATA4-like) known to mediate immune response in *Drosophila*<sup>69</sup>.

In addition to immune-related genes, this list contains 7 protease inhibitors. One is a serine protease inhibitor, which may be involved in the regulation of serine proteases cascades, such as the prophenoloxidase activating cascade<sup>60</sup> or the Toll activating cascade<sup>20</sup>, while another has homology with a tissue inhibitor of metalloproteases (TIMP). More interestingly, the 5 remaining protease inhibitors belong to the family of inducible metalloprotease inhibitors also called IMPI<sup>70</sup>. These 5 IMPI are present as a cluster of genes in the genome of *S. frugiperda* (Fig. 4A) and their expression is upregulated especially in the hemocytes (Fig. 4B). The first IMPI was purified from the hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*<sup>71</sup> and further cloned<sup>72</sup>. The expression of IMPI, along with antimicrobial peptides/proteins, is induced by metalloproteases released by damage tissue or metalloproteases from pathogens during the humoral immune response of *G. mellonella*<sup>70</sup>. It has been shown that nematodes of the genus *Steinernema* as well as *Xenorhabdus* bacteria establish their pathogenesis by secreting virulence factors among which metalloproteases<sup>7,9,73–76</sup>. Therefore, we may hypothesize that *S. frugiperda* induces the expression of IMPI to counteract the metalloproteases produced by nemato-bacterial complexes.

**Common response of the midgut, the fat body and the hemocytes at 15 hpi.** Finally, we identified 31 genes that are significantly differentially expressed in all three tissues (MG, FB and HC), 25 of them being overexpressed in all tissues (Fig. 1E, Supplementary Data S1). There is no enrichment for a specific molecular function or biological process among these 25 genes and only 3 of them could be related to the caterpillar defenses. They encode the previously cited Hdd23 and Cactus, plus Relish, the transcription factor of the Imd pathway, suggesting that this anti-Gram negative bacteria immune pathway<sup>77</sup> could also take part in the previously described humoral responses.

During the annotation of these genes, we noticed that the 4 most differentially expressed genes had no known function. Three of them were also among the few that were overexpressed in the FB at 8 hpi (Fig. 5A). We pursued the investigation on the potential origin of these genes, which led us to the identification of 2 previously uncharacterized clusters (Fig. 5B,C).

The first cluster (Fig. 5B) is composed of 5 genes for which we could not find any homology in sequence databases at the protein nor at the nucleotide level in any other organism than *Spodoptera frugiperda*. However, we could find the whole cluster in the Sf9 and Sf21 cell lines genomes recently published by other labs<sup>78,79</sup>. In addition, after careful exploration of the syntenic regions, this cluster was also identified in the genomes of two other noctuid species, *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera*<sup>80,81</sup>. Interestingly, the cluster is located close to a gene homolog of *D. melanogaster* tamozhennic, which has been reported to be involved in Dorsal nuclear translocation<sup>82</sup>. Their genomic localization, their organization in cluster, the presence of eukaryotic signal peptides in their predicted amino acid sequences, the fact that they were not only the most differentially expressed genes upon



**Figure 5.** Expression for the 31 genes common to midgut, the fat body and the hemocytes. (A) As in Figs 2 and 3, heatmap of differential expression for the 31 genes common to MG15, FB15 and HC15. (B) WebApollo viewer showing the annotation of unknown genes in cluster on the scaffold\_520. (C) WebApollo viewer showing the annotation of clustered genes of bacterial origin within a defensin cluster.

EPNs infestation but also the earliest differentially expressed, led us to the hypothesis that they might encode a new class of immune effectors restricted to some noctuid species.

A second intriguing category of genes in this list has homology to bacterial proteins of unknown function. They are a set of three genes in cluster (Fig. 5C), localized between several defensin encoding genes. They possess a eukaryotic signal peptide and two introns but their main coding sequence is homologous to genes from the *Lactococcus lactis* bacteria (Supplementary Fig. S7) and shares a homology with a cysteine peptidase domain of the papain family. Among insects, these genes are found only in the genomes of other Lepidoptera (Supplementary Fig. S7). This homology to bacteria could be due to convergence, if the bacterial and insect proteins share common molecular functions, or could indicate an ancient event of horizontal gene transfer (HGT). Acquisition of antimicrobial activity from bacteria to eukaryotes by HGT has been documented before<sup>83</sup>, but not in insects. We think it will be interesting to characterize further the function of these two clusters of genes and their role in immunity against EPNs.

## Conclusions

In this work, we have conducted a time-series analysis of tissue-specific transcriptomic response of the Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* larvae to the infestation by the EPN complex *Steinernema carpocapsae*/*Xenorhabdus nematophila*. We show that at 8 hours after infestation only a few genes are differentially expressed in the fat body and none in the midgut, despite the presence and amplification of the EPN symbiont *X. nematophila* in the hemocoel. However, we observed a strong response of the larvae at 15 hours post infestation. This response corresponds to a complementary activation of the immune system by the fat body and the hemocytes, resulting in the production of a large repertoire of humoral effectors and receptors.

When we compare our data to RNAseq analyses performed by other laboratories, albeit on different interaction systems, we observe a very similar response. For example, Castillo *et al.* (2015) report an activation of the immune system of *Drosophila melanogaster* larvae by the EPN complex *Heterorhabditis bacteriophora*/*Photorhabdus luminescens*, represented by several AMPs, several peptidase and protease inhibitors and also Yellow-F. This suggests that all potential hosts possess a conserved ability to fight EPNs complexes.

Despite this powerful response, *S. carpocapsae*/*X. nematophila* complex will be successful regardless of the system they will be confronted with. Anatomies of their host might differ but IJs will find their way inside the midgut and pierce it to enter the hemocoel. There, they will survive the inflammatory response of their host for a sufficient amount of time in order for their released bacterial symbionts to multiply within the insect and kill it<sup>16,17,84</sup>. It was proposed that the nematodes were able to camouflage themselves from the insect immune system<sup>85</sup>. The facts that we found very few responsive genes at the early time point of 8 hpi and that very few immune-related genes were found differentially expressed in the midgut at any time point support this idea. However, despite a previous study suggesting that *X. nematophila* could resist to the humoral immune responses by transcriptional

down-regulation<sup>11</sup>, our study and recent others<sup>36,86</sup> clearly show that, regardless of the host insect, the immune system is triggered and will react to the EPNs infestation.

Nothing in our data suggests a mechanism by which the EPNs bypass the insect defenses at 15 hpi. Indeed, at this time point, all signaling pathways seem activated in both the fat body and the hemocytes and 16 different AMP are produced. Several studies have evidenced a loss of hemolymph AMP and antimicrobial activity during infestation by the EPN or infection by *X. nematophila*<sup>10,87</sup>. A likely hypothesis might be that these AMP are degraded by *X. nematophila* virulence factors, as shown for the *X. nematophila* protease II in *Galleria mellonella* and *Pseudaletia unipuncta*<sup>73</sup>.

## Materials and Methods

**Insect rearing.** Corn variant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae were reared on a corn-based artificial diet<sup>88</sup>. They were maintained at 23 °C  $\pm$  1 °C with a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark) and a relative humidity of 40%  $\pm$  5%. *Galleria mellonella* (Lepidoptera: pyralidae) larvae were reared on honey and pollen at 28 °C in dark.

**Nematode production and storage.** Symbiotic *Steinernema carpocapsae* (strain SK27 isolated from Plougastel, France) were renewed on White traps<sup>89</sup> after infestation of the wax moth *Galleria mellonella* last larval stages. They were maintained in aerated Ringer sterile solution with 0.1% formaldehyde at 8 °C for two to four weeks to ensure optimal pathogenicity.

**Infestation.** Infestation experiments were processed at 23 °C in 12-well culture plates. In each well, one second-day sixth instar larva of *S. frugiperda* was placed on a filter paper (Whatman) with artificial corn-based medium. Nine larvae were used per experimental condition. For infested larvae, 150  $\mu$ L of Ringer sterile solution containing 150 *S. carpocapsae* IJs were introduced in each well. For control larvae, 150  $\mu$ L of Ringer sterile solution was used. In order to control the pathogenicity of the nematodes, 12 larvae were treated as described above, with or without nematodes, and their survival was monitored for 48 hours. The percentage of survival was the ratio of live larvae on the total larvae used in the experiment.

**Xenorhabdus nematophila quantification.** The concentration of *X. nematophila* in *S. frugiperda* hemolymph after infestation was estimated by CFU counting on NBTA (nutrient agar supplemented with 25 mg of bromothymol blue per liter and 40 mg of triphenyltetrazolium chloride per liter) with 15  $\mu$ g/mL of erythromycin. For 3 independent experiments and 3 technical replicates, hemolymph was collected by bleeding of 3 caterpillars in 200  $\mu$ L PBS buffer supplemented with phenylthiourea. The volumes of hemolymph were then estimated and serial dilutions of the samples were plated. CFU were counted after 48 h incubation at 28 °C and CFU numbers were then reported to the estimated hemolymph volumes in order to calculate the bacterial concentrations. The hemolymph of naive caterpillars was also plated to verify the absence of bacterial growth.

**RNA extraction.** *Spodoptera frugiperda* larvae were bled and hemolymph was collected in anti-coagulant buffer<sup>90</sup>. Hemocytes were recovered by a short centrifugation at 800 g for 1 min at 4 °C. The hemocyte pellet was immediately flash-frozen. Then, larvae were dissected and fat bodies and midguts were extracted, rinsed with PBS, flash-frozen with liquid nitrogen in eppendorf tubes and conserved at  $-80$  °C until use. After thawing, 1 mL of Trizol (Life technologies) was added and pooled organs were grounded with a TissueLyzer 85210 Rotator (Qiagen) with one stainless steel bead (3 mm diameter) at 30 Hz for 3 min. Grounded tissues were transferred in new eppendorf tubes and left at room temperature for 5 min then 200  $\mu$ L of chloroform (Interchim) were added. The preparations were homogenized and left at room temperature for 2 min. After a centrifugation at 15,000 g and 4 °C for 15 min, the aqueous phase was transferred in new eppendorf tubes. Four hundred  $\mu$ L of 70% ethanol were added and nucleic acid extraction was immediately done with the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Contaminating DNA was removed by the use of a Turbo DNA-free<sup>TM</sup> kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol.

RNA yield and preparation purity were analyzed with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) by the measure of the ratios  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$ , respectively. RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis. RNA preparations were then conserved at  $-80$  °C.

**Library preparation and Illumina sequencing.** Library preparation and RNA sequencing were conducted by MGX GenomiX (IGF, Montpellier, France). Libraries were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Sample preparation kit (Illumina). In brief, after a purification step with oligo(dT) magnetic beads, polyadenylated RNAs were chemically fragmented. A first cDNA strand was synthesized with random primers and SuperScript IV Reverse Transcriptase (Life Technologies) and the second strand was then synthesized. After the addition of single adenine nucleotides, indexed adapters were ligated to the cDNA ends. Adapters-ligated cDNAs were then amplified by PCR and libraries were validated on Fragment Analyzer with a Standard Sensitivity NGS kit (Advanced Analytical Technologies, Inc) and quantified by qPCR with a Light Cycler 480 thermal cycler (Roche Molecular diagnostics).

cDNAs were sequenced with the HiSeq 2500 system (Illumina) on 50 base pairs with a single-end protocol. In brief, libraries were equimolarly pooled and cDNAs were denatured, diluted to 8 pM and injected in the flow cell. The samples were multiplexed by 6 and a PhiX spike control was used. Clusters were generated with a cluster generation kit (Illumina), cDNAs were sequenced by synthesis. Image analysis and base calling were realized with the HiSeq Control Software (Illumina) and the RTA software (Illumina), respectively. After a demultiplexing step, the sequences quality and the absence of contaminant were verified with the FastQC software and the FastQ Screen

software, respectively. Raw data were submitted to a Purity Filter (Illumina) to remove overlapping clusters. FastQ files are available at ArrayExpress accession E-MTAB-7976.

**Alignment and counting.** For each sample, the reads were pseudoaligned on the *S. frugiperda* reference transcriptome version OGS2.2<sup>38</sup> using Bowtie2.2.3<sup>91</sup>. Processing of alignment files (.sam files) into sorted.bam files was performed by samtools view and samtools sort commands<sup>92</sup>. Read counts for each gene were obtained using samtools idxstats command.

**Differential expression analysis.** Differential expression was analyzed with the R package DESeq2<sup>39</sup>. Treated versus untreated samples of the same tissue + time conditions were analyzed using a classical method. An example is shown in Supplementary Data S2 for the analysis of differential expression in the fat body at 8 hpi identifying 5 DE genes at a p-value adjusted of 0.01, equivalent to 1% false discovery rate (Supplementary Fig. S2).

For the global analysis of the EPN effect, we used the Likelihood Ratio test function of DESeq2 as presented in Supplementary Data S3. At an adjusted p-value of 0.1, this method identified 271 DE genes associated to EPN treatment. We overlapped this list with the pair-wise comparisons above to define tissue-specific or common responses as shown in Fig. 1E.

Each sub list of DE genes has been analyzed with Blast2GO Pro software<sup>93</sup> to identify homolog sequences by blastx as well as GO categories. By using the full list of *S. frugiperda* OGS2.2 transcripts as reference<sup>38</sup>, the enriched GO terms were identified with a Fisher's exact test (one-tailed, FDR < 0.05).

Heatmaps were generated using the heatmap.2 function of the gplots R package such as this presented in Supplementary Data S4 that generated Fig. 1D.

**qPCR and primers.** Differential expression data were verified with control RT-qPCR on selected upregulated and downregulated genes on independently performed EPN infestation experiments. cDNA was synthesized with SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) from 1 µg of RNA sample, according to the manufacturer's protocol.

The primers (Supplementary Table S1) were designed with the Primer3Web tool<sup>94</sup>. Their efficiency was estimated by using serial dilutions of pooled cDNA samples and their specificity was verified with melting curves analysis. Amplification and melting curves were analyzed with the LightCycler 480 software (Roche Molecular diagnostics) version 1.5.0.

RT-qPCR were carried out in triplicate for each biological sample, with the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche Molecular diagnostics). For each couple of sample and primer, 1.25 µL of sample containing 50 ng/µL of cDNA and 1.75 µL of Master mix containing 0.85 µM of primers were distributed in multiwell plates by the Echo 525 liquid handler (Labcyte). After an enzyme activation step of 95 °C for 15 min, the amplification was monitored in the LightCycler 480 (Roche) thermal cycler for 45 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 15 s.

Crossing points were determined using the Second Derivative Maximum method with the LightCycler 480 software (Roche Molecular diagnostics) version 1.5.0. Relative expression quantifications were then processed with the REST 2009 software<sup>95</sup>, using the pairwise fixed randomization test with 2,000 permutations. Targets relative levels were normalized to RpL32 housekeeping gene relative levels and the EF1 gene was used as an internal control<sup>96–98</sup>.

## References

- Lacey, L. A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of invertebrate pathology* **132**, 1–41, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009> (2015).
- Ehlers, R. U. & Hokkanen, H. M. T. Insect biocontrol with non-endemic entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis* spp): Conclusions and recommendations of a combined OECD and COST Workshop on Scientific and Regulatory Policy Issues. *Biocontrol Science and Technology* **6**, 295–302, <https://doi.org/10.1080/09583159631280> (1996).
- Negrisoni, A. S., Garcia, M. S., Negrisoni, C. R. C. B., Bernardi, D. & da Silva, A. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops. *Crop Protection* **29**, 677–683, <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.002> (2010).
- Viteri, D. M., Linares, A. M. & Flores, L. Use of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in combination with low-toxicity insecticides to control fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *Florida Entomologist* **101**, 327–329, <https://doi.org/10.1653/024.101.0228> (2018).
- Koppenhofer, A. M., Grewal, P. S. & Fuzy, E. M. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into four white grub species. *Journal of invertebrate pathology* **94**, 184–195, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.10.005> (2007).
- Balasubramanian, N., Toubarro, D. & Simoes, N. Biochemical study and *in vitro* insect immune suppression by a trypsin-like secreted protease from the nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasite Immunology* **32**, 165–175, <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01172.x> (2010).
- Chang, D. Z., Serra, L., Lu, D., Mortazavi, A. & Dillman, A. R. A core set of venom proteins is released by entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema*. *PLoS Pathogens* **15**, e1007626, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007626> (2019).
- Crawford, J. M., Portmann, C., Zhang, X., Roeffaers, M. B. J. & Clardy, J. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 10821–10826, <https://doi.org/10.1073/pnas.1201160109> (2012).
- Dillman, A. R. *et al.* Comparative genomics of *Steinernema* reveals deeply conserved gene regulatory networks. *Genome Biology* **16**, <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0746-6> (2015).
- Duvic, B. *et al.* Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. *Journal of insect physiology* **58**, 881–888, <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.001> (2012).
- Ji, D. & Kim, Y. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of insect physiology* **50**, 489–496, <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.03.005> (2004).
- Kim, I. H. *et al.* The insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus innexi* has attenuated virulence in multiple insect model hosts yet encodes a potent mosquitocidal toxin. *BMC genomics* **18**, <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4311-4> (2017).

13. Lu, D. *et al.* Activated entomopathogenic nematode infective juveniles release lethal venom proteins. *PLoS Pathog* **13**, e1006302, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006302> (2017).
14. Toubarro, D. *et al.* A serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *PLoS one* **8**, e69161, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069161> (2013).
15. Walter, T. N., Dunphy, G. B. & Mandato, C. A. *Steinernema carpocapsae* DD136: metabolites limit the non-self adhesion responses of haemocytes of two lepidopteran larvae, *Galleria mellonella* (F. Pyralidae) and *Malacosoma disstria* (F. Lasiocampidae). *Experimental Parasitology* **120**, 161–174, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.07.001> (2008).
16. Sicard, M. *et al.* Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Applied and environmental microbiology* **70**, 6473–6480, <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004> (2004).
17. Dowsds, B. C. A. & Peters, A. In *Entomopathogenic Nematology* (ed R. Gaugler) 69–96 (CABI Publishing, 2002).
18. Sadd, B. M. & Schmid-Hempel, P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology* **16**, 1206–1210, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047> (2006).
19. Tassetto, M., Kunitomi, M. & Andino, R. Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. *Cell* **169**, 314–325, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.033> (2017).
20. Lemaitre, B. & Hoffmann, J. A. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**, 697–743, <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615> (2007).
21. Tanaka, H. *et al.* A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect biochemistry and molecular biology* **38**, 1087–1110, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.001> (2008).
22. Zou, Z. *et al.* Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. *Genome Biology* **8**, R177, <https://doi.org/10.1186/Gb-2007-8-8-R177> (2007).
23. Cao, X. *et al.* The immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology* **62**, 64–74, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.03.006> (2015).
24. Evans, J. D. *et al.* Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* **15**, 645–656, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x> (2006).
25. Gerardo, N. M. *et al.* Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biology* **11**, R21, <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r21> (2010).
26. Ferrandon, D. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Current opinion in immunology* **25**, 59–70, <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.11.008> (2013).
27. Kristensen, N. & Chauvin, G. In *Handbook of Zoology* Vol. IV (ed W. de Gruyter) 1–8 (W. de Gruyter, 2012).
28. Lehane, M. J. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* **42**, 525–550, <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525> (1997).
29. Strand, M. R. The insect cellular immune response. *Insect Science* **15**, 1–14, <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x> (2008).
30. Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L. & Soderhall, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* **211**, 213–236, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015> (2006).
31. Nakhleh, J., El Moussawi, L. & Osta, M. A. Chapter Three - The Melanization Response in Insect Immunity. In *Advances in Insect Physiology* Vol. 52 (ed Petros Ligoxygakis) 83–109 (Academic Press, 2017).
32. Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature reviews immunology* **7**, 862–874, <https://doi.org/10.1038/nri2194> (2007).
33. Issa, N. *et al.* The circulating protease Persephone is an immune sensor for microbial proteolytic activities upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Molecular Cell* **69**, 539–550 e536, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.029> (2018).
34. Arefin, B. *et al.* Genome-wide transcriptional analysis of *Drosophila* larvae infected by entomopathogenic nematodes shows involvement of complement, recognition and extracellular matrix proteins. *Journal of Innate Immunity* **6**, 192–204, <https://doi.org/10.1159/000353734> (2014).
35. Castillo, J. C. *et al.* *Drosophila* anti-nematode and antibacterial immune regulators revealed by RNA-Seq. *BMC genomics* **16**, 519, <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1690-2> (2015).
36. Yadav, S., Daugherty, S., Shetty, A. C. & Eleftherianos, I. RNAseq analysis of the *Drosophila* response to the entomopathogenic nematode *Steinernema G3 (Bethesda)* 7, 1955–1967, <https://doi.org/10.1534/g3.117.041004> (2017).
37. Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A. & Tamo, M. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm Spodoptera frugiperda (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS one* **11**, e0165632, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632> (2016).
38. Gouin, A. *et al.* Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific reports* **7**, 11816, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10461-4> (2017).
39. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**, 550, <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> (2014).
40. Zhang, L., Wang, Y. W. & Lu, Z. Q. Midgut immune responses induced by bacterial infection in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **16**, 875–882, <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500060> (2015).
41. Poinar, G. O. & Himsforth, P. T. Neoptectana parasitism of larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Journal of invertebrate pathology* **9**, 241–246 (1967).
42. Biteau, B. *et al.* Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genetics* **6**, e1001159, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001159> (2010).
43. Feyereisen, R. Insect P450 enzymes. *Annual Reviews of Entomology* **44**, 507–533, <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507> (1999).
44. Kleino, A. *et al.* Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *EMBO Journal* **24**, 3423–3434, <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600807> (2005).
45. Brivio, M. F., Mastore, M. & Moro, M. The role of *Steinernema feltiae* body-surface lipids in host-parasite immunological interactions. *Molecular and Biochemical Parasitology* **135**, 111–121 (2004).
46. Liu, H. *et al.* *Steinernema glaseri* surface enolase: molecular cloning, biological characterization, and role in host immune suppression. *Molecular and Biochemical Parasitology* **185**, 89–98, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.06.006> (2012).
47. Toubarro, D., Avila, M. M., Montiel, R. & Simoes, N. A pathogenic nematode targets recognition proteins to avoid insect defenses. *PLoS one* **8**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075691> (2013).
48. Balasubramanian, N., Hao, Y. J., Toubarro, D., Nascimento, G. & Simoes, N. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *International Journal for Parasitology* **39**, 975–984, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.012> (2009).
49. Arrese, E. L. & Soulages, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* **55**, 207–225, <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356> (2010).
50. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
51. Weber, A. N. *et al.* Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology* **4**, 794–800, <https://doi.org/10.1038/ni955> (2003).

52. Lavine, M. D. & Strand, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* **32**, 1295–1309 (2002).
53. Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U. & Dushay, M. S. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Developmental and Comparative Immunology* **29**, 669–679, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.11.007> (2005).
54. Kanost, M. R. & Gorman, M. J. Phenoloxidases in insect immunity. In *Insect Immunology* (ed Nancy E. Beckage) 69–96 (Academic Press, 2008).
55. Lu, A. *et al.* Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Frontiers in Physiology* **5**, 252–252, <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252> (2014).
56. Bartholomay, L. C. *et al.* Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infection and immunity* **72**, 4114–4126, <https://doi.org/10.1128/iai.72.7.4114-4126.2004> (2004).
57. Dimopoulos, G. *et al.* Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 8814–8819, <https://doi.org/10.1073/pnas.092274999> (2002).
58. Irving, P. *et al.* New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiology* **7**, 335–350, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x> (2005).
59. Jiang, H. *et al.* Molecular identification of a bevy of serine proteinases in *Manduca sexta* hemolymph. *Insect biochemistry and molecular biology* **35**, 931–943, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.03.009> (2005).
60. Kanost, M. R. & Jiang, H. Clip-domain serine proteases as immune factors in insect hemolymph. *Current Opinion in Insect Science* **11**, 47–55, <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.09.003> (2015).
61. Haghayeghi, A., Sarac, A., Czerniecki, S., Grosshans, J. & Schock, F. Pellino enhances innate immunity in *Drosophila*. *Mechanisms of Development* **127**, 301–307, <https://doi.org/10.1016/j.mod.2010.01.004> (2010).
62. Ji, S. *et al.* Cell-surface localization of Pellino antagonizes Toll-mediated innate immune signalling by controlling MyD88 turnover in *Drosophila*. *Nature. Communications* **5**, 3458, <https://doi.org/10.1038/ncomms4458> (2014).
63. Volkoff, A. N. *et al.* Characterization and transcriptional profiles of three *Spodoptera frugiperda* genes encoding cysteine-rich peptides. A new class of defensin-like genes from lepidopteran insects? *Gene* **319**, 43–53 (2003).
64. Destoumieux-Garzon, D. *et al.* *Spodoptera frugiperda* X-tox protein, an immune related defensin rosary, has lost the function of ancestral defensins. *PLoS one* **4**, e6795, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006795> (2009).
65. Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. & Royet, J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**, 756–759, <https://doi.org/10.1038/414756a> (2001).
66. Zhao, S. *et al.* A novel peptidoglycan recognition protein involved in the prophenoloxidase activation system and antimicrobial peptide production in *Antheraea pernyi*. *Developmental and Comparative Immunology* **86**, 78–85, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.009> (2018).
67. Krautz, R., Arefin, B. & Theopold, U. Damage signals in the insect immune response. *Frontiers in Plant Science* **5**, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342> (2014).
68. Qiao, C. *et al.* SRP gene is required for *Helicoverpa armigera* prophenoloxidase activation and nodulation response. *Developmental and Comparative Immunology* **44**, 94–99, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.016> (2014).
69. Senger, K., Harris, K. & Levine, M. GATA factors participate in tissue-specific immune responses in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**, 15957–15962, <https://doi.org/10.1073/pnas.0607608103> (2006).
70. Vilcinskis, A. & Wedde, M. Insect inhibitors of metalloproteinases. *IUBMB life* **54**, 339–343, <https://doi.org/10.1080/15216540216040> (2002).
71. Wedde, M., Weise, C., Kopacek, P., Franke, P. & Vilcinskis, A. Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *European journal of biochemistry* **255**, 535–543 (1998).
72. Clermont, A. *et al.* Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *The Biochemical Journal* **382**, 315–322, <https://doi.org/10.1042/bj20031923> (2004).
73. Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A. & Simões, N. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Applied and environmental microbiology* **68**, 1297–1304, <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1297-1304> (2002).
74. Jing, Y. J., Toubarro, D., Hao, Y. J. & Simoes, N. Cloning, characterisation and heterologous expression of an astacin metalloprotease, Sc-AST, from the entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **174**, 101–108, <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.004> (2010).
75. Massaoud, M. K., Marokhazi, J. & Venekei, I. Enzymatic characterization of a serralyisin-like metalloprotease from the entomopathogen bacterium, *Xenorhabdus*. *Biochimica et biophysica acta* **1814**, 1333–1339, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.008> (2011).
76. Schmidt, T. M., Bleakley, B. & Neelson, K. H. Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and environmental microbiology* **54**, 2793–2797 (1988).
77. Mylymaki, H., Valanne, S. & Ramet, M. The *Drosophila* imd signaling pathway. *Journal of immunology* **192**, 3455–3462, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309> (2014).
78. Kakumani, P. K., Malhotra, P., Mukherjee, S. K. & Bhatnagar, R. K. A draft genome assembly of the army worm, *Spodoptera frugiperda*. *Genomics* **104**, 134–143, <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.06.005> (2014).
79. Nandakumar, S., Ma, H. & Khan, A. S. Whole-genome sequence of the *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cell line. *Genome announcements* **5**, <https://doi.org/10.1128/genomeA.00829-17> (2017).
80. Cheng, T. *et al.* Genomic adaptation to polyphagy and insecticides in a major East Asian noctuid pest. *Nature ecology & evolution* **1**, 1747–1756, <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0314-4> (2017).
81. Pearce, S. L. *et al.* Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species. *BMC biology* **15**, 63, <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0402-6> (2017).
82. Minakhina, S., Yang, J. & Steward, R. Tamo selectively modulates nuclear import in *Drosophila*. *Genes to Cells* **8**, 299–310, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00634.x> (2003).
83. Chou, S. *et al.* Transferred interbacterial antagonism genes augment eukaryotic innate immune function. *Nature* **518**, 98–101, <https://doi.org/10.1038/nature13965> (2015).
84. Aymeric, J. L., Givaudan, A. & Duvic, B. Imd pathway is involved in the interaction of *Drosophila melanogaster* with the entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*. *Molecular Immunology* **47**, 2342–2348, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.05.012> (2010).
85. Mastore, M., Arizza, V., Manachini, B. & Brivio, M. F. Modulation of immune responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida). *Insect Science* **22**, 748–760, <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12141> (2015).
86. Pena, J. M., Carrillo, M. A. & Hallem, E. A. Variation in the susceptibility of *Drosophila* to different entomopathogenic nematodes. *Infection and Immunity* **83**, 1130–1138, <https://doi.org/10.1128/IAI.02740-14> (2015).
87. Binda-Rossetti, S., Mastore, M., Protasoni, M. & Brivio, M. F. Effects of an entomopathogen nematode on the immune response of the insect pest red palm weevil: Focus on the host antimicrobial response. *Journal of invertebrate pathology* **133**, 110–119, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.001> (2016).

88. Poitout, S. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Annales de Zoologie et Ecologie Animale* **2**, 79–91 (1970).
89. White, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* **66**, 302–303, <https://doi.org/10.1126/science.66.1709.302-a> (1927).
90. van Sambeek, J. & Wiesner, A. Successful parasitism of locusts by entomopathogenic nematodes is correlated with inhibition of insect phagocytes. *Journal of invertebrate pathology* **73**, 154–161, <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4823> (1999).
91. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* **9**, 357–359, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923> (2012).
92. Li, H. *et al.* The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 2078–2079, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> (2009).
93. Conesa, A. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 3674–3676, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610> (2005).
94. Untergasser, A. *et al.* Primer3 - New capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* **40**, e115, <https://doi.org/10.1093/nar/gks596> (2012).
95. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* **30**, e36 (2002).
96. Le, S. Q. & Gascuel, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 1307–1320, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067> (2008).
97. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution; international journal of organic evolution* **39**, 783–791, <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> (1985).
98. Kanost, M. R. *et al.* Multifaceted biological insights from a draft genome sequence of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. *Insect biochemistry and molecular biology* **76**, 118–147, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.07.005> (2016).

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the French Institut National de la Recherche Agronomique to BD & NN, of Institut Universitaire de France to NN. DS acknowledge financial support from France Génomique National infrastructure, funded as part of “Investissement d’avenir” program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contract ANR-10-INBS-09). We thank the quarantine insect platform (PIQ), member of the Vectopole Sud network, for providing the infrastructure needed for pest insect experimentations. We are also grateful to Clotilde Gibard and Gaëtan Clabots for maintaining the insect collections of the DGIMI laboratory in Montpellier.

## Author Contributions

N.N. and B.D. conceived and directed this study. L.H. and P.-A.G. performed the infestation experiments. L.H., P.-A.G., N.N. and B.D. performed dissections. L.H. and P.-A.G. extracted and purified the RNA. D.S. performed the RNAseq. L.H., S.G. and N.N. analyzed the data. L.H. and S.G. performed the qPCRs. L.H., N.N. and B.D. wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49410-8>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher’s note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## Supplementary informations

*Spodoptera frugiperda* transcriptional response to infestation by *Steinernema carpocapsae*

Louise Huot<sup>1</sup>, Simon George<sup>1</sup>, Pierre-Alain Girard<sup>1</sup>, Dany Severac<sup>2</sup>, Nicolas Nègre<sup>1,\*</sup> and Bernard Duvic<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> DGIMI, Univ Montpellier, INRA, Montpellier, France

<sup>2</sup> MGX, Univ Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

\* Co-corresponding authors

E-mail: [nicolas.negre@umontpellier.fr](mailto:nicolas.negre@umontpellier.fr) (NN) ; [bernard.duvic@umontpellier.fr](mailto:bernard.duvic@umontpellier.fr) (BD)



### **Supplementary Table S1: RNAseq statistics**

### **Supplementary Table S2: Primers sequences and genes investigated in qPCR**

### **Supplementary Data S1: Differentially Expressed (DE) genes at 15 hpi**

This table presents the genes that are found differentially expressed upon EPN infestation at 15 hpi. The baseMean column represents the DESeq2 normalized mean expression levels of a particular gene across all experiments. The log2FoldChange and padj columns provided are given by the DESeq2 'results' command from pair-wise comparisons between (Midgut: MG, Fat Body: FB, Hemocytes: HC). On the right hand of the table, we present the best blastp homolog of each gene as well as our manual annotation of each gene based on this homology and protein domain analyses or on previous annotation<sup>38</sup> (in bold). Genes have been grouped by tissues where the differential expression false discovery rate (padj) was less than 0.01.

### **Supplementary Data S2: Script used for the analysis of differential expression in the fat body at 8 hpi.**

### **Supplementary Data S3: Script for global analysis of the EPN effect.**

### **Supplementary Data S4: Heatmaps were generated using the heatmap.2 function of the gplots R package such as below that generated Fig. 1D.**

### **Supplementary Figure S1: Dataset quality control**

**A:** Heatmap of pair-wise correlation between all RNAseq samples. Hierarchical clustering of samples shows the grouping of experiments mostly by tissues then by time-point and by condition. **B:** Principal Component analysis of RNAseq samples showing the grouping of experiments mostly by tissue then by time-point and by condition.

### **Supplementary Figure S2: DESeq2 analysis**

MA plots showing the log2FoldChange in function of mean expression (measured in reads coverage) of total *S. frugiperda* transcripts in a pairwise DESeq2 analysis of EPN vs PBS in every Tissue\*Time-point conditions. Indicated on each plot is the number of genes significantly overexpressed (red box) or under-expressed (blue box) upon EPN infestation. For experiments at 15 hpi, the total number of DE genes is also indicated on the right side of the plot.

### **Supplementary Figure S3: DE genes in fat body at 8 hpi**

At 8 hpi, 5 genes are significantly differentially expressed in the fat body (FB08). This heatmap of log<sub>2</sub>FoldChange shows that the 4 unknown genes significantly overexpressed in the FB08 condition are also overexpressed at 15 hpi in all 3 tissues. On the right hand side, this table indicates the DESeq2 results for these genes, showing that the 4 overexpressed genes are of unknown function and correspond to the gene cluster presented in **Fig. 5B**.

#### **Supplementary Figure S4: Validation of RNAseq data using quantitative RT-PCR**

Selected genes were analyzed by quantitative PCR using RNA samples from tissues of naïve or infected larvae. The relative expression level (ratio infected/naïve larvae) is shown as log<sub>2</sub>FoldChange mean from 3 independent experiments.

#### **Supplementary Figure S5: Fat Body and Hemocytes Gene Ontology enrichment**

The DE genes common to FB and HC at 15 hpi (**Fig. 3C**) show an enrichment of Gene Ontology terms associated to immunity. The same analysis conducted on the other gene lists, in particular the 77 genes associated to HC15, did not produce significant GO term enrichments.

#### **Supplementary Figure S6: Structures and phylogeny of *Spodoptera frugiperda* peptidoglycan recognition proteins**

**A:** Structures of *Sf*PGRP. In red, signal peptide and in blue, transmembrane domain. **B:** The phylogeny of 105 PGRP domain amino acid sequences was determined by using the Maximum Likelihood method<sup>96</sup> in MEGA7<sup>97</sup>. The bootstrap consensus tree was built from 1000 replicates and branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates were collapsed. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. Branches colors: green, Lepidopteran (Bm: *Bombyx mori*, Dp: *Danaus plexippus*, Hm: *Heliconius melpomene*, Ms: *Manduca sexta*, Px: *Papilio xuthus*, Sf: *Spodoptera frugiperda*), blue, Dipteran (Aa: *Aedes aegypti*, Ag: *Anopheles gambiae*, Dm: *Drosophila melanogaster*) and orange, Hymenopteran (Am: *Apis mellifera*, Nv: *Nasonia vitripennis*). *Manduca sexta* amino acid sequences were retrieved at <ftp://ftp.bioinformatics.ksu.edu/pub/Manduca/OGS2/><sup>98</sup>. \*\*\* Sequence from<sup>21</sup>.

#### **Supplementary Figure S7: Phylogenetic analysis of genes from bacterial origin**

The 100 first best hits after blastp on nr NCBI were retrieved and the phylogenetic tree was constructed using the method described as in **Supplementary Fig. S6**. Sequences are grouped in two main clades, one with bacteria only and the second with Lepidoptera only.

**S1 Table:** RNAseq statistics

<b>Tissue</b>	<b>Condition</b>	<b>Sample</b>	<b>Total reads</b>	<b>Mapped reads</b>	<b>% Mapped reads</b>
<b>Fat body</b>	Control 8 h	3FBn8	29 360 077	16 556 358	56.4
		5FBn8	28 766 960	16 431 320	57.1
	Control 15 h	1FBn15	8 160 217	5 760 726	70.6
		3FBn15	31 182 081	21 405 010	68.7
	Infected 8 h	5FBn15	101 295 028	67 865 194	67.0
		3FBi8	18 680 946	10 924 308	58.5
		5FBi8	27 084 597	13 484 897	49.8
		1FBi15	38 001 141	22 705 073	59.8
		3FBi15	25 680 693	15 233 458	59.3
		5FBi15	17 018 902	9 757 977	57.3
<b>Midgut</b>	Control 8 h	1MGn8	40 762 942	26 432 615	64.8
		3MGn8	37 701 095	24 444 804	64.8
		5MGn8	39 108 039	23 913 146	61.2
	Control 15 h	1MGn15	53 104 319	33 125 675	62.4
		5MGn15	56 673 439	35 116 354	62.0
	Infected 8 h	1MGi8	39 503 925	25 273 765	64.0
		3 MGi8	45 389 710	29 365 492	64.7
		5MGi8	33 930 844	21 504 374	63.4
		1MGi15	46 822 381	28 888 031	61.7
		3MGi15	40 929 947	25 691 178	62.8
5MGi15	42 270 370	26 081 101	61.7		
<b>Hemocytes</b>	Control 15 h	1HCn15	36 819 698	20 610 325	56.0
		3HCn15	41 399 767	23 008 997	55.6
		5HCn15	30 657 274	17 119 548	55.8
	Infected 15 h	1HCi15	32 486 507	18 101 920	55.7
		3HCi15	73 456 056	40 045 769	54.5
		5HCi15	33 712 769	18 309 356	54.3

*Samples abbreviations:* MG, midgut ; FB, fat body ; HC, hemocytes ; n, naive larvae ; i, infected larvae ; Number at the end (8 or 15) corresponds to the time of tissue extraction after infestation with nematodes.

**S2 Table:** Primers sequences and genes investigated in qPCR.

Gene	Annotation	Primer	Sequence
GSSPFG00022277001-RA	TF Adf-1	Adf1-F	CCGGAAGAGGAGGAAAAGTT
		Adf1-R	CTAAGCGTTTGATGCGAGTG
GSSPFG00001145001.2-RA	Cactus	Cactus-F	ACTGACACACAGACCCCA
		Cactus-R	TCATCACAGCGAGGTGTAGC
GSSPFG00018355001.1-RA	Carboxy-peptidase D	CarboD-F	GGAGCGCATTGGTATTCTGT
		CarboD-R	CGTTGCCTTCGATTTTGATT
GSSPFG00011909001.1-RA	Orf43(GB3)	GB3-F	GGTGTTCGAGTTGGGAATCAT
		GB3-R	TTCGTTGGAACATGGACTCA
GSSPFG00010207001-RA	Rab5 GEF	GEFRab5-F	ATCACCATCCAGCCAGAAAC
		GEFRab5-R	GTCGGGAGTCATCAGTTCGT
GSSPFG00000179001.3-RA	GNBP3	GNBP3-F	CCAAGGTGCCCTCATCTTTA
		GNBP3-R	TGATGCATAGCTTCCGTCAG
GSSPFG00027637001-RA	IMPI(27637)	IMPI27637-F	TTGCAAGGAGATGCAGAATG
		IMPI27637-R	TAGCGGTAGCCACAATTTGA
GSSPFG00005843001.1	J-dom cont. protein	JDomProt-F	TGCAGTACCACCCTGACAAG
		JDomProt-R	ATGCGATCCTTGGTGTTAGG
GSSPFG00023266001-RA	LITAF	LITAF-F	AACAGCAACACCAGCAACAG
		LITAF-R	AAACAAAGCCCAAGAGCAAA
GSSPFG00006503001.4-RA	PGRP-S6	PGRPS6-F	TCCCTACAACCTCCCATTCG
		PGRPS6-R	CAGCCGTGGTCATCAATATG
GSSPFG00035420001.3-RA	Relish	Relish-F	TATGGCACCAACAAAACGAA
		Relish-R	CGATACCACCGAACCTGACT
GSSPFG00007143001-RA	Sialin	Sialin-F	AGTCACCACCATTCTTTTCG
		Sialin-R	CAGGGTCCTACTCAGGGTCA
GSSPFG00026933001-RA	Unk3	UNK3-F	AGGAGACACCAATCGCAAAG
		UNK3-R	CCAGCAGCAAGAATGTTGAA
GSSPFG00026935001-RA	Unk4	UNK4-F	ACTAATGGGCTCCCTCCTGT
		UNK4-R	GTAGTTGGGGATCCTGCTGA
GSSPFG00032366001-RA	Zonadhesin	Zona-F	TGCTTGCCTGGTTGTATCTG
		Zona-R	CTGTGTGCATCTTCGCAACT
GSSPFG00020532001-RA	RpL32	RpL32-F	TACAATCGTCAAAAAGAGGACGA
		RpL32-R	AAACCATTGGGTAGCATGTG
GSSPFG00002766001-RA	EF1 $\alpha$	EF1a-F	GACGTATACAAAATCGGTGGTATT
		EF1a-R	GATTTGATGGATTTAGGGTTGTCT

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00019826001-RA	29,35	3,48	6,80E-03	0,18	9,44E-01	2,63	3,09E-02	Heat-shock protein 68-like	>XP_022816120.1 Heat-shock protein 68-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030737001-RA	1207,42	-0,81	1,13E-03	-0,53	2,39E-02	-0,03	9,75E-01	E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1-like	>XP_022830612.1 E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00014622001-RA	2628,14	-1,68	1,20E-04	-0,97	1,80E-02	-0,45	4,16E-01	ATP-binding cassette sub-family G member 4	>XP_022814310.1 ATP-binding cassette sub-family G member 4-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00033707001-RA	1543,13	-1,77	2,97E-03	-0,39	5,71E-01	1,44	1,01E-02	NA	>XP_022818925.1 uncharacterized protein LOC111351296 [Spodoptera litura]
GSSPFG00030333001-RA	70,19	5,68	7,11E-05	3,90	9,05E-05	2,50	1,01E-02	Proteinase inhibitor	>XP_022826229.1 venom peptide BmKAPI-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00016101001-RA	12,36	5,57	2,61E-03	5,44	1,13E-03	3,14	6,75E-02	NA	>XP_021184774.1 uncharacterized protein LOC110372414 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00017290001.2-RB	38,29	3,91	1,42E-11	4,35	4,25E-15	0,75	2,67E-01	<b>CYP340L1-CTERM</b>	>AGO62010.1 cytochrome P450 CYP340L1 [Spodoptera frugiperda]
GSSPFG00034371001-RA	58,28	3,81	2,61E-09	3,83	1,47E-12	1,28	3,38E-02	Multiple C2 and transmembrane domain-containing protein	>XP_022837348.1 multiple C2 and transmembrane domain-containing protein isoform X4 [Spodoptera litura]
GSSPFG00021560001-RA	753,52	3,22	5,89E-06	5,05	2,43E-16	1,82	1,14E-02	PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase	>XP_021200468.1 PAS domain-containing serine/threonine-protein kinase [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00019015001.1-RA	558,08	2,43	1,10E-03	2,21	1,85E-03	0,87	2,75E-01	Calcium and integrin-binding protein 1-like	>XP_022835540.1 calcium and integrin-binding protein 1-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00014411001-RA	180,34	2,32	2,06E-05	4,22	8,18E-18	0,34	6,74E-01	NA	/
GSSPFG00024369001-RA	107,05	2,07	1,54E-06	4,80	3,59E-30	0,60	2,10E-01	NA	/
GSSPFG0002277001-RA	1466,63	1,15	5,28E-04	1,38	1,18E-06	0,52	1,49E-01	Transcription factor Adf-1	>KPI98809.1 Transcription factor Adf-1 [Papilio xuthus]
GSSPFG00007146001-RA	257,76	7,41	7,98E-06	2,56	7,00E-02	3,26	4,09E-03	Sialin-like (Major Facilitator Superfamily)	>XP_022822670.1 sialin [Spodoptera litura]
GSSPFG00028639001-RA	252,44	5,63	7,35E-05	2,18	1,34E-01	3,74	1,51E-03	Sialin-like (Major Facilitator Superfamily)	>XP_022822670.1 sialin [Spodoptera litura]
GSSPFG00007143001-RA	256,94	4,74	2,29E-03	-1,11	5,22E-01	3,43	5,73E-03	Sialin-like (Major Facilitator Superfamily)	>XP_022822670.1 sialin [Spodoptera litura]
GSSPFG00031867001.1-RA	321,84	3,83	4,99E-04	1,27	2,57E-01	4,86	1,57E-07	<b>Carboxylesterase 5</b>	>XP_022837491.1 venom carboxylesterase-6-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00025576001-RA	357,98	3,38	6,63E-04	1,90	4,52E-02	7,94	3,72E-21	Metalloprotease inhibitor	>XP_022816599.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00005406001-RA	53,71	3,33	1,00E-03	1,61	9,64E-02	2,90	2,13E-04	Sialin-like (Major Facilitator Superfamily)	>XP_022823138.1 sialin [Spodoptera litura]
GSSPFG00000198001.4-RA	391,59	-0,87	6,59E-03	0,61	6,37E-02	2,05	1,18E-16	<b>IAP2</b>	>XP_022828237.1 E3 ubiquitin-protein ligase XIAP isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00014246001-RA	1784,98	-1,06	3,37E-03	0,27	5,03E-01	1,74	5,78E-09	Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta	>XP_022815255.1 mannose-1-phosphate guanyltransferase beta [Spodoptera litura]

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00007709001-RA	1205,91	-1,36	2,14E-05	0,68	3,07E-02	1,46	1,80E-07	DCN1-like protein 3	>XP_022834843.1 DCN1-like protein 3 [Spodoptera litura]
GSSPFG00028283001-RA	29,71	-2,27	5,26E-03	-0,28	8,43E-01	2,09	2,46E-04	LIM domain transcription factor LMO4	>XP_022820666.1 LIM domain transcription factor LMO4 isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00024050001-RA	11,69	1,22	4,43E-01	5,76	1,74E-06	2,21	1,10E-01	Dynein heavy chain	>XP_022830602.1 dynein heavy chain 3, axonemal [Spodoptera litura]
GSSPFG00031110001.1-RA	230,63	1,81	8,54E-02	4,00	6,14E-06	1,74	4,76E-02	Arrestin	>XP_022814807.1 arrestin domain-containing protein 2-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00004095001-RA	13,83	0,53	7,92E-01	3,98	4,81E-04	2,32	5,12E-02	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)	>AD161825.1 endonuclease-reverse transcriptase [Bombyx mori]
GSSPFG00005906001.3-RA	4374,29	0,79	2,80E-01	2,71	4,16E-08	0,91	1,59E-01	Toll_900	>XP_004927316.1 protein toll isoform X2 [Bombyx mori]
GSSPFG00005275001-RA	1354,33	1,99	8,57E-02	2,63	4,22E-03	1,91	5,06E-02	Lipase	>XP_022831164.1 lipase member H-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00026476001-RA	179,32	1,12	3,53E-02	2,56	8,59E-11	0,51	3,39E-01	Carboxypeptidase D	>XP_022831650.1 carboxypeptidase D-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00018355001.1-RA	720,84	0,38	5,54E-01	2,34	2,52E-09	0,37	5,45E-01	Carboxypeptidase D	>XP_022831650.1 carboxypeptidase D-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00003137001-RA	651,33	1,22	1,72E-01	1,85	7,52E-03	1,70	2,33E-02	Alcohol dehydrogenase transcription factor	>YP_008003807.1 unknown similar to AMEV266 [Mythimna separata entomopoxvirus 'L']
GSSPFG00033571001-RA	144,21	0,62	1,80E-01	1,76	9,53E-07	0,38	4,43E-01	NA	>XP_022830534.1 uncharacterized protein LOC111359290 [Spodoptera litura]
GSSPFG00020772001.1-RA	785,18	-0,07	9,43E-01	1,55	1,60E-03	1,30	1,29E-02	Ral guanine nucleotide dissociation stimulator	>XP_022820461.1 ral guanine nucleotide dissociation stimulator isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00007683001-RA	271,89	0,07	9,40E-01	1,42	1,12E-03	0,53	3,60E-01	NA	>XP_022823592.1 uncharacterized protein LOC111354385 [Spodoptera litura]
GSSPFG00005098001-RA	686,50	0,07	9,24E-01	1,21	1,45E-03	0,65	1,53E-01	Pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11	>XP_022823595.1 LOW QUALITY PROTEIN: pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00033868001.1-RA	119,87	-0,29	5,65E-01	-0,93	8,41E-03	-0,65	8,59E-02	NA	>XP_022831482.1 uncharacterized protein LOC111359968 isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00025100001-RA	9,37	-1,96	1,02E-01	-4,02	7,05E-03	1,43	1,44E-01	Reverse transcriptase	>BAD82946.1 non-LTR retrotransposon R1Bmks ORF2 protein [Bombyx mori]
GSSPFG00007813001-RA	147,94	1,35	7,31E-01	3,41	2,31E-01	9,98	5,68E-05	Serine protease (w/o CLIP domain)	>XP_022837507.1 serine protease 7-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00016569001-RA	1643,36	1,67	9,31E-02	-0,08	9,55E-01	9,01	3,35E-35	Metalloproteinase inhibitor	XP_022816599.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00016279001-RA	3259,31	2,39	3,54E-02	1,12	3,16E-01	8,31	3,37E-22	Annulin (Transglutaminase)	>XP_022820864.1 annulin isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00005794001-RA	78,51	0,00	1,00E+00	2,77	3,49E-01	8,09	1,11E-03	Serine protease (w/o CLIP domain)	>XP_022837507.1 serine protease 7-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00017519001-RA	5547,52	1,46	4,59E-01	2,43	1,01E-01	8,06	2,55E-10	Protease inhibitor	>OWR52979.1 protease inhibitor protein [Danaus plexippus plexippus]

	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP	
	baseMean	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange			padj
GSSPFG00017265001-RA	12,47	2,62	2,25E-01	-0,14	9,51E-01	7,40	2,35E-07	Fork head domain-containing protein FD4 (TF)	>XP_022822176.1 fork head domain-containing protein FD4-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00032719001-RA	13,18	1,51	6,15E-01	0,00	1,00E+00	7,22	2,61E-04	NA	/
GSSPFG00026945001-RA	44,90	0,95	7,27E-01	1,86	4,46E-01	7,16	1,04E-05	Hypothetical protein	>WP_015427086.1 hypothetical protein [Lactococcus lactis]
GSSPFG00007272001-RA	34,60	1,57	5,91E-01	-0,25	9,46E-01	6,42	8,92E-06	NA	/
GSSPFG00028981001-RA	518,70	0,49	7,32E-01	1,06	2,97E-01	6,33	1,82E-16	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	>XP_022826101.1 synaptic vesicle glycoprotein 2C-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00014762001-RA	6,47	-1,02	6,41E-01	-2,19	1,84E-01	6,28	2,34E-05	Tyrosine-protein kinase receptor Torso	tyrosine-protein kinase receptor torso-like isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00029034001-RA	81,22	1,18	6,85E-01	-0,65	8,07E-01	6,23	2,48E-10	NA	/
GSSPFG00030018001-RA	312,34	2,86	1,08E-02	2,16	4,17E-02	6,23	9,98E-13	Zonadhesin (cysteine rich domain containing trypsin inhibitor like)	>XP_022816590.1 zonadhesin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00012298001-RA	97,75	0,46	7,42E-01	-0,71	5,31E-01	6,18	1,33E-23	Synaptic vesicle glycoprotein 2C	>XP_022826101.1 synaptic vesicle glycoprotein 2C-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030015001-RA	18,27	1,46	4,22E-01	-0,28	9,07E-01	6,15	1,24E-06	Metalloprotease inhibitor	>XP_022816591.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00011832001-RA	5188,77	1,28	6,17E-02	0,84	1,79E-01	5,67	4,63E-35	Sluggish A	>XP_022831783.1 proline dehydrogenase 1, mitochondrial [Spodoptera litura]
GSSPFG00002264001-RA	1700,44	0,72	5,30E-01	1,27	1,41E-01	5,51	2,94E-18	Sluggish A	>XP_022831783.1 proline dehydrogenase 1, mitochondrial [Spodoptera litura]
GSSPFG00011387001-RA	6,45	3,46	7,86E-02	3,12	2,92E-02	5,42	6,49E-05	Fife	>XP_022830112.1 regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00000193001-RA	21,74	1,96	3,09E-01	2,46	1,05E-01	5,38	1,95E-04	Class E vacuolar protein-sorting machinery protein HSE1	>KPJ11455.1 SH3 and cysteine-rich domain-containing protein [Papilio machaon]
GSSPFG00025581001-RA	6,83	2,74	2,60E-01	0,01	1,00E+00	5,32	5,53E-03	Zonadhesin (cysteine rich domain containing trypsin inhibitor like)	>XP_022816590.1 zonadhesin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00027106001-RA	27,15	-0,90	2,68E-01	-0,63	6,34E-01	5,18	4,99E-16	Graves disease carrier protein	>XP_022823012.1 graves disease carrier protein homolog [Spodoptera litura]
GSSPFG00027033001-RA	77,12	2,29	1,43E-01	1,34	2,55E-01	5,14	2,78E-08	Mucin-5AC	>XP_012550215.1 mucin-5AC isoform X1 [Bombyx mori]
GSSPFG00012767001.2-RA	111,38	0,69	7,92E-01	0,44	8,57E-01	4,93	1,37E-03	<b>Heat shock protein cognate 1</b>	>ACQ78180.1 heat shock protein 70 [Spodoptera exigua]
GSSPFG00029387001.5-RA	101,84	0,86	7,20E-01	0,36	8,86E-01	4,70	1,95E-03	<b>Heat shock protein 70-6</b>	>ACQ78180.1 heat shock protein 70 [Spodoptera exigua]
GSSPFG00019100001-RA	178,54	0,52	7,12E-01	2,27	1,58E-02	4,58	2,35E-08	NA	/
GSSPFG00023390001-RA	196,24	-1,07	2,96E-01	1,95	1,18E-02	4,51	1,82E-11	Serine protease (CLIP domain containing)	>XP_022837546.1 proclotting enzyme-like [Spodoptera litura]

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00030804001-RA	170,55	0,15	9,42E-01	-0,27	8,85E-01	4,17	1,40E-05	Gremlin-1	>XP_022814796.1 gremlin-1-like isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00017861001-RA	7,33	-0,72	7,29E-01	0,00	1,00E+00	4,07	1,02E-04	NA	/
GSSPFG00010207001-RA	2256,46	-1,64	3,53E-02	0,62	4,35E-01	3,87	1,22E-10	Vacuolar sorting protein 9	>XP_022820289.1 rab5 GDP/GTP exchange factor isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00006115001.1-RA	136,14	0,65	5,20E-01	0,34	7,18E-01	3,86	6,09E-10	LDL receptor	>XP_021195066.1 uncharacterized protein LOC110379640 isoform X2 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00015651001-RA	11204,55	-0,39	7,31E-01	0,66	4,13E-01	3,81	1,13E-09	NA	>XP_021186764.1 uncharacterized protein LOC110373722 isoform X4 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00026861001-RA	269,85	1,69	1,03E-01	0,76	4,54E-01	3,74	2,12E-06	<b>Yellow-F2</b>	>XP_022816607.1 L-dopachrome tautomerase yellow-f2-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00035670001.2-RA	71,61	-0,08	9,43E-01	0,88	1,66E-01	3,58	2,47E-14	<b>Pellino-like (Part 3)</b>	>XP_022834504.1 protein pellino isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00024490001-RA	274,10	0,56	4,51E-01	1,29	2,25E-02	3,57	3,27E-14	IL1 receptor accessory protein	>OWR52649.1 putative interleukin 1 receptor accessory protein 2 [Danaus plexippus plexippus]
GSSPFG00002419001.2-RA	28,79	2,55	5,73E-02	2,75	2,51E-02	3,49	4,32E-04	<b>carboxylesterase 12</b>	>APD13874.1 putative carboxylesterase CXE12, partial [Spodoptera litura]
GSSPFG00017500001-RA	79,33	1,15	1,97E-01	1,79	1,01E-02	3,41	2,22E-07	LDL receptor	>XP_021195066.1 uncharacterized protein LOC110379640 isoform X2 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00018574001-RA	241,16	0,85	2,52E-01	0,37	6,08E-01	3,39	6,33E-14	c-Maf-inducing protein	>XP_022821363.1 C-Maf-inducing protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00035679001.2-RA	53,46	0,62	5,21E-01	1,06	1,40E-01	3,38	2,09E-09	<b>Pellino-like (Part 2)</b>	>OWR54226.1 Pellino [Danaus plexippus plexippus]
GSSPFG00034237001-RA	1266,65	-0,37	6,42E-01	-0,92	7,21E-02	3,36	7,15E-15	NA	>XP_022818003.1 trichohyalin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00001062001.3-RA	12,89	-0,80	6,59E-01	1,24	5,94E-01	3,21	8,98E-05	<b>Odorant-binding protein 16</b>	>ALD65890.1 odorant binding protein 16 [Spodoptera litura]
GSSPFG00023565001-RA	2389,42	-0,22	8,62E-01	1,49	1,37E-02	3,19	1,76E-12	Eater	>XP_022825513.1 fibrillin-2-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00024687001-RA	56,68	-0,87	7,38E-02	-0,50	4,07E-01	3,06	1,04E-18	Serta	>XP_021201441.1 uncharacterized protein LOC110384473 isoform X1 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00010484001.1-RA	104,16	0,65	6,42E-01	0,22	8,84E-01	2,85	8,62E-04	Sialin-like (Major Facilitator Superfamily)	>XP_022823138.1 sialin [Spodoptera litura]
GSSPFG00003126001.3-RA	3680,40	-0,03	9,86E-01	1,29	6,75E-02	2,83	1,15E-05	<b>Vrille</b>	>AJB84657.1 vrille, partial [Spodoptera frugiperda]
GSSPFG00019133001-RA	1214,45	-0,67	1,33E-01	-0,47	2,34E-01	2,83	6,09E-20	Translation initiation factor 3	>XP_013185950.1 PREDICTED: translation initiation factor IF-3 [Amyelois transitella]
GSSPFG00016426001-RA	120,48	-0,66	3,24E-01	0,87	1,18E-01	2,72	1,59E-09	DNA oxidative demethylase	>XP_021188487.1 DNA oxidative demethylase ALKBH2-like [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00023266001-RA	1215,25	-0,11	9,45E-01	0,63	5,16E-01	2,53	1,29E-03	LITAF homolog	>XP_022829448.1 lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog [Spodoptera litura]



	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00023267001-RA	1232,59	-0,06	9,73E-01	0,56	5,70E-01	2,51	1,45E-03	LITAF homolog	>XP_022829448.1 lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog [Spodoptera litura]
GSSPFG00018774001-RA	205,57	0,02	9,83E-01	0,80	6,65E-02	2,48	2,41E-12	NA	/
GSSPFG00033290001-RA	1107,55	-0,50	4,44E-01	-0,38	4,91E-01	2,47	2,33E-09	Maltase	>XP_022817463.1 neutral and basic amino acid transport protein rBAT isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00031513001-RA	350,77	-1,11	2,24E-01	0,78	3,49E-01	2,36	7,39E-04	GTP-binding protein	>XP_021194100.1 GTP-binding protein 2-like [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00015806001-RA	71,40	0,97	2,49E-01	0,96	1,71E-01	2,34	6,31E-05	NA	/
GSSPFG00025910001-RA	86,31	-0,37	8,05E-01	1,24	1,92E-01	2,34	7,00E-03	NA	/
GSSPFG00001447001-RA	1976,03	0,59	5,13E-01	0,74	2,89E-01	2,32	9,87E-05	Monocarboxylate transporter 14	>XP_022830596.1 monocarboxylate transporter 14-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00012510001.1-RA	160,84	0,09	8,94E-01	-0,52	2,67E-01	2,28	3,77E-12	Homeodomain Transcription Factor	>XP_022830805.1 putative homeodomain transcription factor 2 isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00003297001-RA	137,85	-0,24	7,86E-01	0,33	6,24E-01	2,25	1,05E-06	NA	/
GSSPFG00017158001-RA	347,13	-0,12	9,28E-01	0,14	8,87E-01	2,16	8,09E-04	NA	/
GSSPFG00016494001-RA	490,33	-0,04	9,33E-01	-0,07	8,78E-01	2,14	3,39E-20	Rabenosyn 5	>XP_022819682.1 rabenosyn-5 [Spodoptera litura]
GSSPFG00017563001-RA	124,23	-0,31	6,83E-01	-0,03	9,74E-01	2,12	7,79E-07	NA	/
GSSPFG00020037001-RA	163,70	1,67	1,97E-02	1,29	5,34E-02	2,02	1,04E-03	Insulin receptor substrate 1	>XP_022116016.1 insulin receptor substrate 1 isoform X5 [Pieris rapae]
GSSPFG00007852001.3-RA	90,24	1,09	1,15E-01	0,77	2,25E-01	1,86	5,16E-04	<b>Mitogen activated protein kinase kinase kinase 5 (mapkkk5)</b>	>XP_022814392.1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15 [Spodoptera litura]
GSSPFG00014810001-RA	28,24	-1,63	1,42E-02	-1,08	1,81E-01	1,85	1,88E-04	Serine/threonine-protein kinase minibrain	>XP_022114715.1 serine/threonine-protein kinase minibrain isoform X4 [Pieris rapae]
GSSPFG00004566001-RA	2045,57	-0,82	2,71E-01	0,50	4,63E-01	1,83	1,07E-03	Mutant cadherin	>ACY69027.1 mutant cadherin [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00007257001-RA	1122,61	-0,23	8,25E-01	0,97	1,13E-01	1,82	1,48E-03	NA	>XP_022815396.1 uncharacterized protein LOC111348788 [Spodoptera litura]
GSSPFG00002254001-RA	355,56	-1,48	3,38E-02	-1,12	8,33E-02	1,81	2,55E-03	Haspin	>XP_012549826.1 putative serine/threonine-protein kinase haspin homolog [Bombyx mori]
GSSPFG00010209001-RA	387,18	-0,76	8,80E-02	-0,66	1,12E-01	1,73	1,37E-07	SIAH	>XP_022820294.1 E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00007965001-RA	1393,96	0,19	7,58E-01	0,24	6,05E-01	1,59	2,37E-06	Glutathione synthetase	>XP_022818198.1 glutathione synthetase-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00002009001-RA	111,14	-0,56	5,01E-01	1,35	2,44E-02	1,53	9,96E-03	NA	/

	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
	baseMean	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange		
GSSPFG00012773001-RA	365,20	-0,30	2,36E-01	0,44	4,17E-02	1,39	1,46E-17	Zinc carboxypeptidase >XP_022820265.1 zinc carboxypeptidase-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00027791001.3-RA	876,58	0,23	5,18E-01	0,03	9,47E-01	1,34	2,14E-09	Immune deficiency (IMD) >AFK75934.1 IMD-like protein [Spodoptera exigua]
GSSPFG00018053001-RA	109,07	0,22	7,64E-01	-0,27	6,71E-01	1,20	3,49E-03	Dystrophin >XP_023949282.1 dystrophin, isoforms A/C/F/G/H-like [Bicyclus anynana]
GSSPFG00014267001-RA	1773,67	-0,95	3,79E-02	-0,11	8,50E-01	1,18	2,73E-03	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9 >XP_022824891.1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00027961001-RA	1133,89	-0,40	3,88E-01	0,67	5,43E-02	1,16	3,93E-04	NA >XP_022822565.1 disks large homolog 5 [Spodoptera litura]
GSSPFG00026235001.3-RA	1008,37	-0,60	1,34E-01	0,23	5,68E-01	1,06	9,42E-04	autophagy-related gene 101 >XP_022814112.1 autophagy-related protein 101 [Spodoptera litura]
GSSPFG00022661001-RA	359,80	0,00	9,98E-01	-0,39	2,48E-01	-0,94	9,83E-04	Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 homolog >XP_022831140.1 cytosolic Fe-S cluster assembly factor NUBP2 homolog [Spodoptera litura]
GSSPFG00020607001-RA	45,30	0,42	5,59E-01	-0,94	8,51E-02	-1,41	6,58E-03	Structural maintenance of chromosomes protein >XP_022837441.1 structural maintenance of chromosomes protein 4 [Spodoptera litura]
GSSPFG00019681001-RA	12,41	0,86	3,27E-01	0,80	3,24E-01	-0,02	1,72E-03	Mucin-5AC-like >XP_021194028.1 mucin-5AC-like isoform X1 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00035343001.3-RA	25589,80	2,17	5,86E-02	10,89	1,84E-38	4,61	3,16E-07	Gloverin 2 >XP_022837404.1 gloverin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00019359001.4-RA	589,13	1,39	4,17E-01	9,61	1,56E-16	6,69	8,99E-07	PGRP-S6 >XP_022832121.1 peptidoglycan-recognition protein LB-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030457001.5-RA	741,58	0,50	8,26E-01	9,44	3,87E-14	6,53	1,04E-07	Cecropin C >XP_022827532.1 cecropin [Spodoptera litura]
GSSPFG00035421001.3-RA	39201,22	2,41	4,64E-02	9,31	1,58E-25	4,50	3,54E-06	Lebocin 2 >XP_022834102.1 lebocin-4-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00013852001-RA	39093,76	2,39	4,33E-02	9,26	4,10E-26	4,48	2,63E-06	Lebocin 2 >XP_022834102.1 lebocin-4-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030456001.4-RA	7955,00	1,08	5,31E-01	8,97	8,72E-18	4,37	1,64E-04	Cecropin D >AKJ54504.1 cecropin C [Spodoptera exigua]
GSSPFG00032762001.5-RA	13219,79	1,36	2,95E-01	8,87	6,92E-26	5,44	2,09E-09	putative Attacin B2 >XP_022837464.1 attacin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00017964001.4-RA	1779,56	2,84	1,45E-02	8,82	1,83E-20	11,95	7,69E-48	PGRP-S2 >XP_022825626.1 peptidoglycan recognition protein-like isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00003522001.3-RA	40795,35	0,67	7,25E-01	8,64	5,83E-17	6,84	1,50E-10	Gloverin 3 >XP_022837648.1 gloverin-like isoform X3 [Spodoptera litura]
GSSPFG00006778001.3-RA	25698,26	1,76	1,17E-01	8,00	5,03E-24	3,85	8,88E-06	Cecropin A >AKJ54503.1 cecropin B [Spodoptera exigua]
GSSPFG00035250001.3-RA	13024,92	0,56	7,43E-01	7,83	1,02E-17	4,79	9,25E-07	Gloverin 2 >XP_022837404.1 gloverin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00024578001.4-RA	18830,78	-0,16	9,18E-01	7,77	1,13E-30	3,45	3,03E-06	putative Attacin B1 >AKJ54492.1 attacin 2 [Spodoptera exigua]

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00030458001.5-RA	18144,89	1,97	2,57E-02	7,73	3,12E-32	4,19	1,25E-09	Cecropin B3	>AKJ54505.1 cecropin D [Spodoptera exigua]
GSSPFG00030460001.5-RA	15400,85	-0,15	9,29E-01	6,83	9,71E-20	3,34	5,93E-05	Cecropin B1	>AKJ54505.1 cecropin D [Spodoptera exigua]
GSSPFG00022682001-RA	36,14	3,39	7,95E-02	6,55	5,68E-07	8,11	1,38E-11	Unk3	/
GSSPFG00011908001.6-RA	4191,12	2,52	4,05E-02	6,24	3,86E-11	5,04	2,41E-07	Gallerimycin	>AAQ18896.1 gallerimycin [Spodoptera frugiperda]
GSSPFG00030459001.3-RA	25608,12	-0,05	9,81E-01	5,97	1,09E-16	3,78	9,01E-07	Cecropin B2	>AKJ54505.1 cecropin D [Spodoptera exigua]
GSSPFG00012490001-RA	39,09	-0,08	9,71E-01	5,90	2,79E-09	4,13	1,49E-06	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)	>XP_013201040.1 PREDICTED: RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey isoform X1 [Amyeloid transitella]
GSSPFG00004750001-RA	2940,29	0,12	9,64E-01	5,73	1,42E-07	5,55	2,41E-07	Spaetzle ???	>XP_022825729.1 uncharacterized protein LOC111355862 isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00006503001.4-RA	1432,31	1,25	2,63E-01	5,40	9,16E-13	2,52	3,86E-03	PGRP-S6	>XP_022832121.1 peptidoglycan-recognition protein LB-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030474001.1-RA	14198,35	0,91	5,62E-01	5,35	2,57E-08	5,19	1,09E-07	Spod-x-tox	>AFC87713.1 Spod-11-tox b protein [Spodoptera frugiperda]
GSSPFG00024502001-RA	2426,58	0,46	7,04E-01	5,16	4,59E-15	5,14	2,66E-15	NA	/
GSSPFG00018652001.2-RA	24274,11	-0,26	8,72E-01	5,01	1,75E-10	10,11	3,35E-40	Moricin 10	>AAT38873.1 moricin [Spodoptera exigua]
GSSPFG00016180001-RA	314,32	2,62	2,08E-01	4,91	1,07E-06	4,38	1,51E-05	Krueppel-like (TF)	>XP_022824898.1 Krueppel-like factor 6 [Spodoptera litura]
GSSPFG00016033001-RA	107,31	2,56	2,67E-01	4,86	2,06E-03	4,33	3,36E-04	NA	/
GSSPFG00035032001.3-RA	569,37	2,18	1,20E-01	4,09	2,67E-04	6,35	7,38E-10	Hdd23-like protein	>AHA43054.1 Hdd23-like protein [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00021577001.3-RA	796,83	3,24	3,06E-02	3,96	1,42E-03	3,87	3,32E-03	Diapausin 2	>ABU96713.1 diapausin precursor [Spodoptera litura]
GSSPFG00014115001-RA	190,21	1,30	5,05E-01	3,89	2,43E-03	8,81	2,15E-17	carboxypeptidase A1	>OWR51415.1 molting carboxypeptidase A [Danaus plexippus plexippus]
GSSPFG00003589001-RA	8,83	0,17	9,58E-01	3,81	1,25E-05	3,06	5,64E-05	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	>XP_022820461.1 ral guanine nucleotide dissociation stimulator isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00016568001-RA	99,39	2,10	5,86E-02	3,71	1,42E-04	6,33	8,51E-13	Metalloprotease inhibitor	>XP_022816604.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00000405001.5-RA	117,97	-0,99	4,22E-01	3,55	4,26E-03	5,10	8,01E-11	Heat Shock Protein 20.4	>XP_022837101.1 protein lethal(2)essential for life-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00035416001.3-RA	625,01	2,50	8,55E-02	3,50	3,41E-03	4,73	3,89E-05	Hdd23-like protein	>AHA43054.1 Hdd23-like protein [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00002828001-RA	65,52	3,60	1,01E-02	3,50	6,64E-05	2,67	5,66E-03	NA	>XP_022817093.1 PTB domain-containing adapter protein ced-6 isoform X2 [Spodoptera litura]

	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
	baseMean	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange		
GSSPFG00007670001-RA	1717,50	-1,12	1,85E-01	3,46	9,28E-09	3,00	1,51E-06	Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha >XP_022837269.1 growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha [Spodoptera litura]
GSSPFG00030010001-RA	135,75	0,04	9,82E-01	3,31	4,05E-04	7,14	3,47E-25	Metalloprotease inhibitor >XP_022816592.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00025579001-RA	854,55	2,39	5,99E-02	3,19	2,51E-03	4,22	3,21E-05	Metalloprotease inhibitor >XP_022816594.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00027923001-RA	16,95	0,31	8,59E-01	3,09	1,10E-03	2,67	5,16E-03	Endonuclease-reverse transcriptase >ADI61825.1 endonuclease-reverse transcriptase [Bombyx mori]
GSSPFG00033226001.1-RA	1218,25	1,45	3,33E-02	3,00	3,79E-09	1,52	9,43E-03	Serine protease inhibitor >NP_001036857.1 serine protease inhibitor 12 [Bombyx mori]
GSSPFG00033855001-RA	401,12	1,71	5,17E-02	2,97	5,76E-06	2,88	2,42E-05	Ced6-like >XP_022817093.1 PTB domain-containing adapter protein ced-6 isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00024523001.1-RA	306,06	-0,07	9,71E-01	2,96	3,31E-04	8,12	1,61E-25	Lipase >XP_022816521.1 pancreatic triacylglycerol lipase-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00009013001-RA	562,36	1,60	1,52E-01	2,92	7,94E-04	5,97	3,72E-21	Proline dehydrogenase >XP_022831783.1 proline dehydrogenase 1, mitochondrial [Spodoptera litura]
GSSPFG00006819001-RA	17,76	0,20	9,25E-01	2,91	4,10E-03	3,37	1,03E-03	RNA-dependent DNA polymerase >ADI61825.1 endonuclease-reverse transcriptase [Bombyx mori]
GSSPFG00023708001.3-RA	732,73	1,46	1,70E-02	2,72	1,12E-08	3,09	6,66E-11	<b>Pelle</b> >XP_022827677.1 serine/threonine-protein kinase pelle [Spodoptera litura]
GSSPFG00027637001-RA	1593,74	1,43	1,05E-01	2,52	2,77E-04	3,42	2,73E-07	Metalloprotease inhibitor >XP_022816594.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00030016001-RA	1953,95	1,57	8,06E-02	2,40	9,56E-04	3,68	5,16E-08	Metalloprotease inhibitor >XP_022816594.1 inducible metalloproteinase inhibitor protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00002693001-RA	839,94	0,35	6,57E-01	2,40	1,88E-07	1,85	1,54E-04	NA /
GSSPFG00013394001.1-RA	311,29	-0,98	2,64E-01	2,40	3,35E-04	5,15	4,23E-18	Metalloprotease inhibitor >XP_022816184.1 tissue inhibitor of metalloproteinase isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00003265001-RA	99,46	1,55	2,85E-01	2,36	8,54E-03	5,28	7,33E-13	J domain-containing protein >XP_022814365.1 J domain-containing protein [Spodoptera litura]
GSSPFG00013437001-RA	4183,28	1,57	1,27E-01	2,25	2,40E-03	3,11	1,03E-06	Papilin >XP_022817382.1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00005796001-RA	1404,65	1,62	8,53E-02	2,18	6,66E-03	3,03	7,13E-07	HP7 (w/o CLIP domain) >XP_022837257.1 serine protease easter-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00035688001.2-RA	3569,89	-0,75	2,25E-01	2,03	3,00E-06	3,29	4,48E-15	<b>Pellino-like (Part 4)</b> >XP_021196073.1 protein pellino isoform X1 [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00021008001.3-RA	211,54	0,70	3,88E-01	2,02	3,33E-04	3,45	2,48E-11	<b>Pellino-like (Part 1)</b> >KP192436.1 Protein pellino [Papilio xuthus]
GSSPFG00030992001-RA	135,38	0,93	1,09E-01	2,01	6,92E-05	2,01	4,76E-06	Inositol phosphatase >XP_022820172.1 tumor protein p63-regulated gene 1-like protein isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00028641001-RA	196,01	0,20	7,47E-01	1,96	2,56E-07	4,19	7,63E-37	Graves disease carrier protein >XP_022823012.1 graves disease carrier protein homolog [Spodoptera litura]

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00022173001-RA	39,29	-0,72	3,76E-01	1,95	2,31E-03	3,67	2,88E-11	NA	/
GSSPFG00010458001-RA	48,30	0,99	1,35E-01	1,69	4,45E-05	1,34	1,49E-04	TF GATA-4	>XP_022834873.1 uncharacterized protein LOC111362432 isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00001965001-RA	76,96	0,23	7,11E-01	1,60	2,76E-04	1,23	7,95E-04	PGRP-L3	>XP_022832999.1 peptidoglycan-recognition protein SB2-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00005173001-RA	248,37	-1,15	1,64E-02	1,47	6,03E-04	2,48	8,58E-12	NA	/
GSSPFG00029361001-RA	486,52	0,24	7,61E-01	1,46	1,09E-03	3,30	7,11E-16	Arrestin	>XP_022814527.1 arrestin domain-containing protein 5-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00005635001-RA	618,76	0,68	1,23E-01	1,43	2,63E-05	2,34	1,28E-13	Syntenin	>XP_022819933.1 syntenin-1-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00035666001.2-RA	14146,73	0,36	6,52E-01	1,41	3,97E-03	5,24	5,91E-34	Cactus	>XP_022814345.1 NF-kappa-B inhibitor cactus [Spodoptera litura]
GSSPFG00023535001-RA	2282,57	0,75	2,00E-01	1,38	1,70E-03	2,06	1,17E-06	Serine/threonine protein kinase	>XP_022829845.1 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00005902001-RA	497,80	0,35	4,01E-01	1,36	1,04E-05	1,52	1,04E-09	NA	/
GSSPFG00025892001-RA	3566,22	-0,62	2,77E-01	1,35	1,01E-03	1,54	2,25E-04	NA	>XP_022834008.1 transmembrane and coiled-coil domains protein 2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00020304001-RA	466,23	0,51	3,97E-01	1,21	6,18E-03	3,15	1,10E-16	AN1-type zinc finger protein	>XP_022823839.1 AN1-type zinc finger protein 2A [Spodoptera litura]
GSSPFG00031653001-RA	172,80	-0,10	8,95E-01	1,21	2,75E-03	1,09	6,27E-03	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9	>XP_022824891.1 tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 9-like isoform X2 [Spodoptera litura]
GSSPFG00030801001.1-RA	1243,39	0,51	9,28E-02	-0,70	4,06E-03	-0,73	3,56E-03	ELYS	>XP_022829773.1 protein ELYS isoform X3 [Spodoptera litura]
GSSPFG00032367001-RA	506,35	-0,70	1,44E-02	-0,78	2,29E-03	-0,70	6,80E-03	mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta-like	>XP_022825144.1 mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta-like isoform X1 [Spodoptera litura]
GSSPFG00023094001-RA	142,79	-0,96	4,19E-02	-1,65	2,46E-05	-1,32	1,00E-03	Transmembrane protein 104 homolog	>XP_022830839.1 transmembrane protein 104 homolog [Spodoptera litura]
GSSPFG00020036001-RA	202,84	-0,77	2,80E-01	-1,67	4,25E-03	2,02	7,13E-05	Insulin receptor substrate 1	>XP_022116016.1 insulin receptor substrate 1 isoform X5 [Pieris rapae]
GSSPFG00017831001-RA	461,92	-0,40	4,76E-01	-1,86	9,31E-06	3,49	7,71E-29	C-Maf-inducing protein-like	>XP_022821363.1 C-Maf-inducing protein-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00022683001-RA	10475,46	9,64	1,67E-08	14,00	4,10E-26	7,82	3,76E-07	Unk4	/
GSSPFG00026935001-RA	8676,18	9,53	2,85E-08	13,91	1,77E-26	7,59	5,57E-06	Unk4	/
GSSPFG00026933001-RA	29668,27	7,84	1,35E-11	11,50	1,51E-34	7,11	1,82E-10	Unk3	/
GSSPFG00011909001.1-RA	7589,77	3,34	8,45E-03	8,97	2,27E-13	9,66	3,22E-24	Homologous to the highly conserved bacterial gene orf43	/

	baseMean	MG15		FB15		HC15		Annotation	Best BlastP
		log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj		
GSSPFG00010791001-RA	4876,22	3,05	5,06E-04	6,96	5,49E-24	3,40	4,68E-06	NA	/
GSSPFG00017106001-RA	1398,43	5,28	1,40E-03	6,35	7,04E-09	6,62	1,37E-16	NA	/
GSSPFG00018651001.1-RA	1305,24	4,11	1,66E-04	5,51	1,31E-11	7,48	2,23E-22	NA	>PCG79527.1 hypothetical protein B5V51_227 [Heliothis virescens]
GSSPFG00032870001-RA	13,94	5,43	3,07E-05	5,04	2,54E-07	2,48	3,63E-05	NA	/
GSSPFG00032366001-RA	13631,07	1,84	4,10E-03	4,61	1,79E-20	2,03	3,00E-04	Zonadhesin (cysteine rich domain containing trypsin inhibitor like)	>XP_022826186.1 zonadhesin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00009054001-RA	16,23	5,08	3,76E-03	4,37	5,17E-05	3,02	9,64E-03	NA	/
GSSPFG00005843001.1-RA	325,67	3,29	2,37E-05	4,12	1,14E-11	5,33	2,34E-20	J domain-containing protein	>XP_022814365.1 J domain-containing protein [Spodoptera litura]
GSSPFG00024503001-RA	1107,35	2,42	5,40E-03	3,81	2,92E-08	5,02	7,46E-14	NA	/
GSSPFG00022795001-RA	214,88	1,52	1,15E-05	3,73	5,53E-37	1,47	8,68E-07	Adenylate cyclase type 8-like	>XP_022823732.1 adenylate cyclase type 8-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00025416001-RA	868,98	1,28	1,90E-03	3,46	1,62E-25	1,11	3,79E-03	NA	/
GSSPFG00027962001-RA	406,47	1,15	3,80E-03	3,41	2,74E-26	1,07	3,74E-03	NA	>XP_022822823.1 uncharacterized protein LOC111353857 [Spodoptera litura]
GSSPFG00022042001-RA	269,25	1,61	6,34E-03	3,36	1,54E-12	3,48	5,17E-14	Pellino-like	>KPJ18070.1 Protein pellino [Papilio machaon]
GSSPFG00010374001-RA	195,69	2,97	1,09E-16	3,30	2,69E-24	2,96	6,30E-19	neuroglobin-like	>XP_022827113.1 neuroglobin-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00034830001-RA	103,19	2,07	2,29E-03	3,16	1,44E-09	1,85	5,51E-04	GTPase-activating protein CdGAPr	>XP_022823995.1 GTPase-activating protein CdGAPr [Spodoptera litura]
GSSPFG00027450001.3-RA	2514,54	3,08	9,77E-03	3,08	2,33E-03	3,72	6,43E-05	<b>Hdd23-like protein</b>	>AHA43054.1 Hdd23-like protein [Helicoverpa armigera]
GSSPFG00007812001-RA	9716,15	2,11	1,22E-03	2,52	7,37E-06	3,69	2,43E-13	Easter-like (w/o clip domain)	>XP_022837257.1 serine protease easter-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00001145001.2-RA	10747,64	2,39	5,26E-07	2,49	1,83E-09	5,37	5,35E-42	<b>Cactus</b>	>XP_022814345.1 NF-kappa-B inhibitor cactus [Spodoptera litura]
GSSPFG00014046001-RA	146,91	1,19	1,05E-03	1,90	6,17E-09	0,93	5,74E-03	NA	/
GSSPFG00029703001.1-RA	648,78	1,66	3,52E-03	1,75	3,70E-04	2,63	2,78E-08	CCAAT/enhancer-binding protein gamma-like ( <b>TF</b> )	>XP_022818278.1 CCAAT/enhancer-binding protein gamma-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00031629001-RA	366,69	1,75	3,70E-05	1,61	2,32E-05	2,16	1,62E-09	/ <b>(TF)</b>	>XP_022817465.1 uncharacterized protein LOC111350237 [Spodoptera litura]
GSSPFG00019727001.1-RA	595,50	0,92	5,46E-04	1,51	1,17E-10	1,29	5,26E-09	Sorting nexin-12	>XP_022827944.1 sorting nexin-12 [Spodoptera litura]

		MG15		FB15		HC15			
	baseMean	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	log2FoldChange	padj	Annotation	Best BlastP
GSSPFG00023536001-RA	2817,80	-1,65	2,12E-03	1,34	4,72E-03	2,31	2,98E-07	NA	/
GSSPFG00022750001.3-RA	2872,25	-1,53	1,28E-08	1,02	3,66E-05	1,69	6,88E-13	Putative Relish	>AIA24468.1 relish 1a [Spodoptera litura]
GSSPFG00026247001-RA	775,33	-0,95	5,02E-04	0,93	1,18E-04	1,54	2,54E-12	Zinc finger SWIM domain-containing protein 4-like	>XP_022826715.1 zinc finger SWIM domain-containing protein 4-like [Spodoptera litura]
GSSPFG00026293001-RA	400,13	-0,76	3,21E-04	-1,38	2,87E-13	-0,58	4,20E-03	Nucleoporin NUP188 homolog	>XP_022821782.1 nucleoporin NUP188 homolog [Spodoptera litura]
GSSPFG00020831001-RA	460,18	-1,62	2,27E-05	-1,86	1,38E-07	0,96	9,02E-03	Phospholipid-transporting ATPase IA	>XP_022829308.1 phospholipid-transporting ATPase IA [Spodoptera litura]
GSSPFG0003834001.1-RA	368,40	-3,15	5,41E-12	-2,09	7,66E-05	1,48	7,98E-04	Sortilin-related receptor-like	>XP_021201439.1 sortilin-related receptor isoform X4 [Helicoverpa armigera]

## S2 Data: Script used for the analysis of differential expression in the fat body at 8 hpi

```
#Importing read counts
> CG08.counts <- read.table("FB_08.counts.txt", header=T, row.names=1)
> head(CG08.counts)
                FB08_PBS_1  FB08_PBS_2  FB08_PBS_3  FB08_NEP_1  FB08_NEP_2  FB08_NEP_3
GSSPFG00034586001-RA           0           0           0           0           0           0
GSSPFG00034587001-RA          256          294          222          232          165          201
GSSPFG00034588001-RA          209          204          137          104          101          145
GSSPFG00034589001-RA           79           71           39           39           35           49
GSSPFG00034590001-RA          148           77           43          187           66           39
GSSPFG00034591001-RA           16           11           15           15            7           15

#Assigning metadata to each sample
> FB08.meta <- read.table("FB_08_meta.txt", header=T, row.names=1)
> FB08.meta
                Tissue  Condition  Time  Platform
FB08_PBS_1      FatBody      PBS    08H      MGX
FB08_PBS_2      FatBody      PBS    08H      MGX
FB08_PBS_3      FatBody      PBS    08H      MGX
FB08_NEP_1      FatBody      NEP    08H      MGX
FB08_NEP_2      FatBody      NEP    08H      MGX
FB08_NEP_3      FatBody      NEP    08H      MGX

#Creating a DESeq2 dataset object
> library(DESeq2)
> dds.FB08 <- DESeqDataSetFromMatrix(countData=CG08.counts,FB08.meta, design=~Condition)
> dds.FB08$Condition <- relevel(dds.FB08$Condition, ref = "PBS")
#Performing differential analysis expression
> dds.FB08 <- DESeq(dds.FB08)
> res.FB08 <- results(dds.FB08)
> res.FB08
log2 fold change (MAP): Condition PBS vs NEP
Wald test p-value: Condition PBS vs NEP
DataFrame with 21779 rows and 6 columns
                BaseMean  log2FoldChange  lfcSE  stat  pvalue  padj
<numeric>      <numeric> <numeric> <numeric> <numeric> <numeric>
GSSPFG00034586001-RA    0.00000          NA      NA      NA      NA      NA
```



```

GSSPFG00034587001-RA  226.12105      -0.09167128  0.2563811  -0.3575587  0.7206736  0.9999365
GSSPFG00034588001-RA  146.89507       0.16170379  0.3390730  0.4768996  0.6334336  0.9999365
GSSPFG00034589001-RA   50.82056       0.12751588  0.4220970  0.3021009  0.7625752  0.9999365
GSSPFG00034590001-RA   92.22889      -0.48799757  0.5859347  -0.8328532  0.4049275  0.9999365
...
GSSPFG00017764001-RA   0.1530537       0.08952471  0.7413174  0.1207644  0.9038777  NA
GSSPFG00002544001-RA   8.1074389       0.12156989  0.7613174  0.1596836  0.8731303  0.9999365
GSSPFG00002545001-RA  83.5576439       0.26476578  0.3550677  0.7456770  0.4558626  0.9999365
GSSPFG00002546001-RA   3.0554269       0.18693003  0.8997145  0.2077659  0.8354117  0.9999365
GSSPFG00002547001-RA   0.1383452       0.08952471  0.7413174  0.1207644  0.9038777  NA
> sum(res.FB08$padj < 0.01, na.rm=T)
[1] 5
#Generating MA plots
> plotMA(res.FB08, ylim=c(-10,10))
> quartz.save("MA_FB08.tiff", type="tiff", dpi=720)
> dev.off()

```

### S3 Data: Script for global analysis of the NEP effect

```
> NEP.FULL.meta
```

	Tissue	Condition	Time	Platform
FB08_PBS_1	FatBody	PBS	08H	MGX
FB08_PBS_2	FatBody	PBS	08H	MGX
FB08_PBS_3	FatBody	PBS	08H	MGX
FB08_NEP_1	FatBody	NEP	08H	MGX
FB08_NEP_2	FatBody	NEP	08H	MGX
FB08_NEP_3	FatBody	NEP	08H	MGX
FB15_PBS_1	FatBody	PBS	15H	GATC
FB15_PBS_2	FatBody	PBS	15H	GATC
FB15_PBS_3	FatBody	PBS	15H	GATC
FB15_NEP_1	FatBody	NEP	15H	MGX
FB15_NEP_2	FatBody	NEP	15H	MGX
FB15_NEP_3	FatBody	NEP	15H	MGX
HC15_PBS_1	Hemocytes	PBS	15H	GATC
HC15_PBS_2	Hemocytes	PBS	15H	GATC
HC15_PBS_3	Hemocytes	PBS	15H	GATC
HC15_NEP_1	Hemocytes	NEP	15H	GATC
HC15_NEP_2.1	Hemocytes	NEP	15H	GATC
HC15_NEP_2.2	Hemocytes	NEP	15H	GATC
HC15_NEP_3	Hemocytes	NEP	15H	GATC
MG08_PBS_1	MidGut	PBS	08H	MGX
MG08_PBS_2	MidGut	PBS	08H	MGX
MG08_PBS_3	MidGut	PBS	08H	MGX
MG08_NEP_1	MidGut	NEP	08H	MGX
MG08_NEP_2	MidGut	NEP	08H	MGX
MG08_NEP_3	MidGut	NEP	08H	MGX
MG15_PBS_1	MidGut	PBS	15H	GATC
MG15_PBS_3	MidGut	PBS	15H	GATC
MG15_NEP_1	MidGut	NEP	15H	MGX
MG15_NEP_2	MidGut	NEP	15H	MGX
MG15_NEP_3	MidGut	NEP	15H	MGX

```
> dds.FullNEP <- DESeqDataSetFromMatrix(countData=Counts.allNEP, NEP.FULL.meta, design =  
~Platform+Tissue+Time+Condition)
```

```

> design(dds.FullNEP) <- ~ Platform + Condition
> dds.FullNEP <- DESeq(dds.FullNEP)
> dds.FullNEP <- DESeq(dds.FullNEP, test="LRT", reduced=~Platform)
> res.NEP.LRT <- results(dds.FullNEP)
> res.NEP.LRT

```

log2 fold change (MLE): Condition PBS vs NEP

LRT p-value: '~ Platform + Condition' vs '~ Platform'

DataFrame with 21779 rows and 6 columns

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
GSSPFG00034586001-RA	0.00000	NA	NA	NA	NA	NA
GSSPFG00034587001-RA	397.16106	-0.63382359	0.2725597	4.887725886	0.02704829	0.2803752
GSSPFG00034588001-RA	239.01600	-0.63090704	0.2599847	5.633063087	0.01762481	0.2365014
GSSPFG00034589001-RA	51.20187	0.02851923	0.4314123	0.004343166	0.94745529	0.9798495
GSSPFG00034590001-RA	215.78401	1.59117230	0.7122354	2.202168787	0.13781672	0.4972546
...	...	...	...	...	...	...
GSSPFG00017764001-RA	0.5151814	-0.2097926	2.2026076	0.0395469	0.8423691	NA
GSSPFG00002544001-RA	23.8805964	-0.2642303	0.2908762	0.8449198	0.3579935	0.6863636
GSSPFG00002545001-RA	96.6551035	-0.3146891	0.2146926	2.2883293	0.1303502	0.4876959
GSSPFG00002546001-RA	2.8121936	-1.0511276	0.7431343	1.5893673	0.2074165	0.5660697
GSSPFG00002547001-RA	0.5012959	1.6010805	2.3033557	0.4597224	0.4977537	NA

```

> summary(res.NEP.LRT.Sig)

```

out of 271 with nonzero total read count

adjusted p-value < 0.1

LFC > 0 (up) : 22, 8.1%

LFC < 0 (down) : 249, 92%

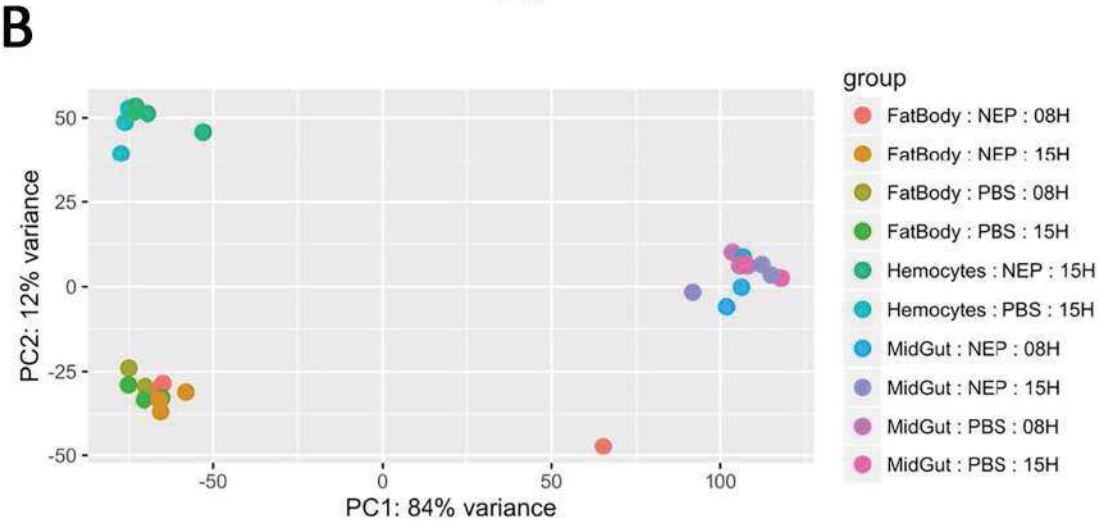
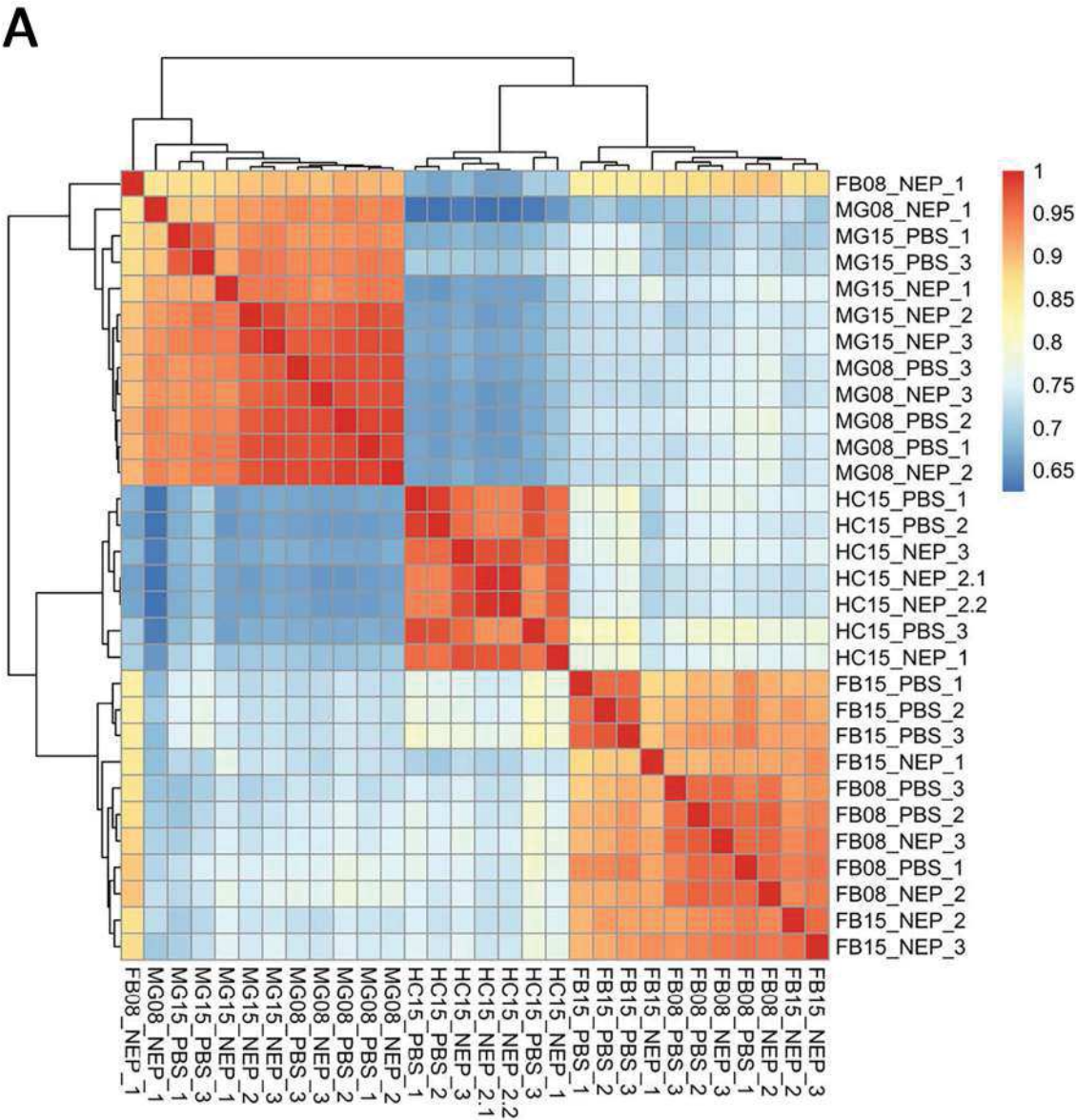
outliers [1] : 0, 0%

low counts [2] : 0, 0%

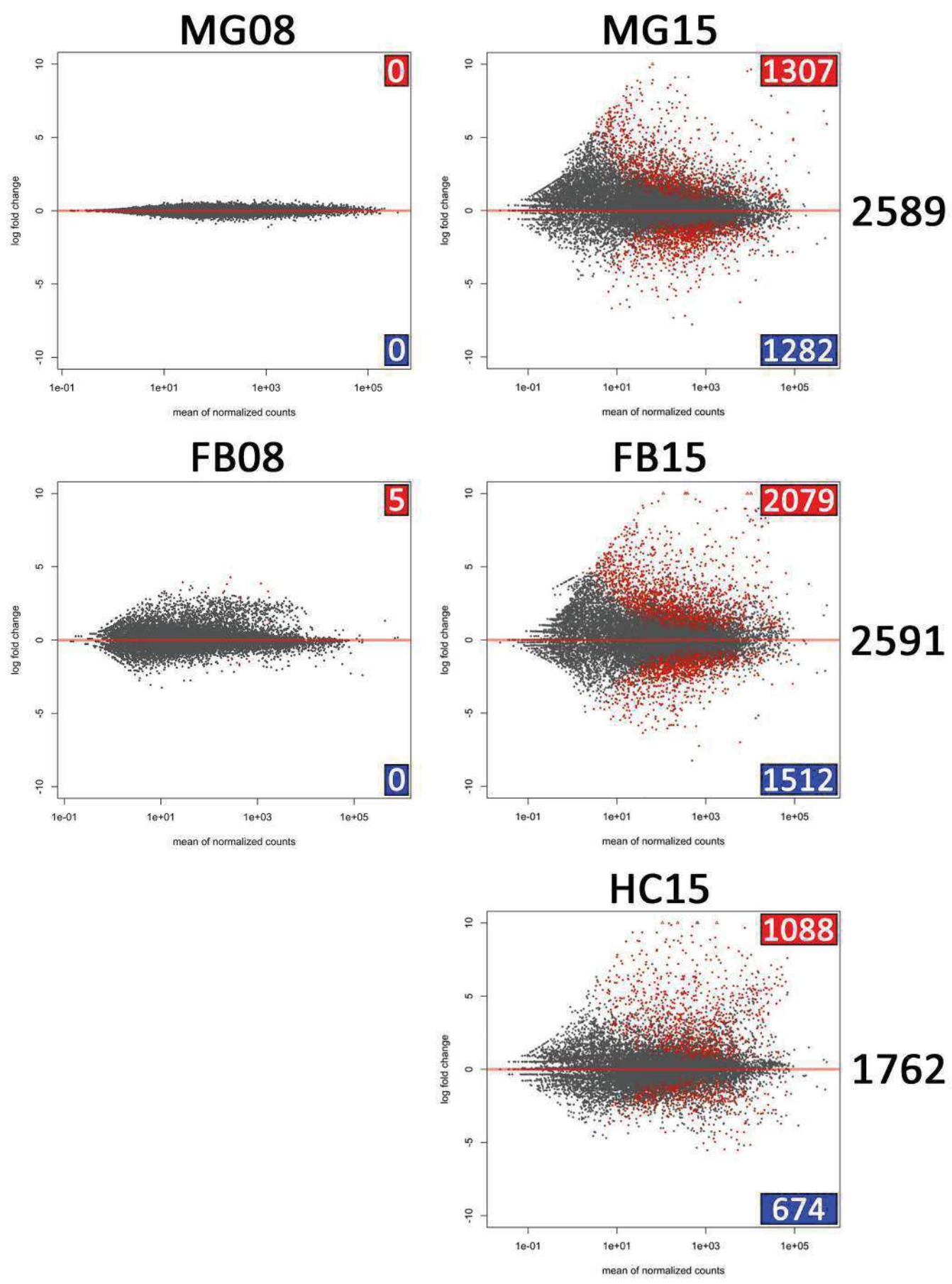
#### S4 Data: Heatmaps were generated using the heatmap.2 function of the gplots R package such as below that generated Fig 1D

```
> LRTGenes.normcounts <- read.table("LRT_NEP_genes_normcounts", header=T, row.names=1)
> head(LRTGenes.normcounts)
      FB08_PBS_1 FB08_PBS_2 FB08_PBS_3 FB08_NEP_1 FB08_NEP_2 FB08_NEP_3 FB15_PBS_1 FB15_PBS_2 FB15_PBS_3
GSSPFG00016231001-RA 128.32836 199.96122 257.85743 154.97011 258.37224 229.76859 129.77399 266.22693 251.08681
GSSPFG00032367001-RA 434.72475 377.93718 416.35695 422.32312 434.06536 348.40728 589.39020 640.86586 537.98631
GSSPFG00004566001-RA 425.77161 386.31251 542.92000 348.97849 492.62974 887.53751 805.68018 1114.31066 840.00673
GSSPFG00021577001.3-RA 251.68275 203.10197 16.55965 36.67232 48.22948 21.02458 156.81024 63.12597 101.86723
GSSPFG00006115001.1-RA 44.76571 42.92361 69.78710 36.67232 24.11474 69.08075 113.55224 104.29509 64.86078
GSSPFG00017500001-RA 65.65637 70.14346 67.42144 36.67232 115.40627 87.10182 37.85075 71.35980 33.42518
      FB15_NEP_1 FB15_NEP_2 FB15_NEP_3 HC15_PBS_1 HC15_PBS_2 HC15_PBS_3 HC15_NEP_1 HC15_NEP_2.1
GSSPFG00016231001-RA 418.8384 266.2224 282.8820 600.61412 201.39679 470.80267 468.7684 698.9269
GSSPFG00032367001-RA 256.5578 401.3204 386.4371 639.86995 685.26384 827.54095 468.7684 426.9121
GSSPFG00004566001-RA 2282.7466 731.1183 914.3152 1265.34610 1270.15100 1969.71587 3454.7344 6986.7507
GSSPFG00021577001.3-RA 5457.2635 162.9122 202.0586 146.55508 137.05277 97.22266 1734.4429 3169.7281
GSSPFG00006115001.1-RA 129.8245 123.1775 103.5550 30.75040 30.24169 29.09025 328.1379 702.7049
GSSPFG00017500001-RA 143.7342 176.8194 191.9557 12.43101 12.22536 13.01406 107.9052 222.9010
      HC15_NEP_2.2 HC15_NEP_3 MG08_PBS_1 MG08_PBS_2 MG08_PBS_3 MG08_NEP_1 MG08_NEP_2 MG08_NEP_3 MG15_PBS_1
GSSPFG00016231001-RA 796.4090 593.33708 174.79963 269.15742 187.500895 209.51486 274.24550 221.835168 241.27936
GSSPFG00032367001-RA 457.0192 397.22708 494.66119 425.11040 404.882411 430.78468 354.78847 436.086228 550.76849
GSSPFG00004566001-RA 7118.8299 5731.41923 753.59675 716.43372 892.683545 752.31738 793.44814 813.395616 3053.15104
GSSPFG00021577001.3-RA 3181.7795 1566.37651 36.99079 30.08230 7.470155 24.20139 15.97547 1.896027 33.59586
GSSPFG00006115001.1-RA 717.9894 317.11405 44.24389 42.74853 50.050040 44.94543 34.61351 31.284447 32.57780
GSSPFG00017500001-RA 210.1903 99.30677 58.75008 58.58132 66.484381 52.55158 27.95707 45.504650 28.50558
      MG15_PBS_3 MG15_NEP_1 MG15_NEP_2 MG15_NEP_3
GSSPFG00016231001-RA 334.154738 291.7330 288.23084 250.52902
GSSPFG00032367001-RA 683.271629 375.2607 447.19451 322.35304
GSSPFG00004566001-RA 1107.199282 1240.6329 1187.86043 1113.27231
GSSPFG00021577001.3-RA 1.870269 492.5681 34.93707 111.15622
GSSPFG00006115001.1-RA 42.392765 128.9767 18.34196 33.34687
GSSPFG00017500001-RA 28.677459 137.5751 23.58252 34.20191
> library(gplots)
> heatmap.2(as.matrix(LRTGenes.normcounts), Rowv=T, Colv=NA, dendrogram="none", cexRow=0.1, key=FALSE,
keysize= 0.75, symkey=FALSE, density.info="none", col=colorpanel(99, low="skyblue", mid="white",
high="red"), scale="row", colsep = c(3,6,9,12,15,19,22,25,27), sepcolor="black", labRow = NULL,
trace="none", margins = c(7,7), na.color="lightgray")
```

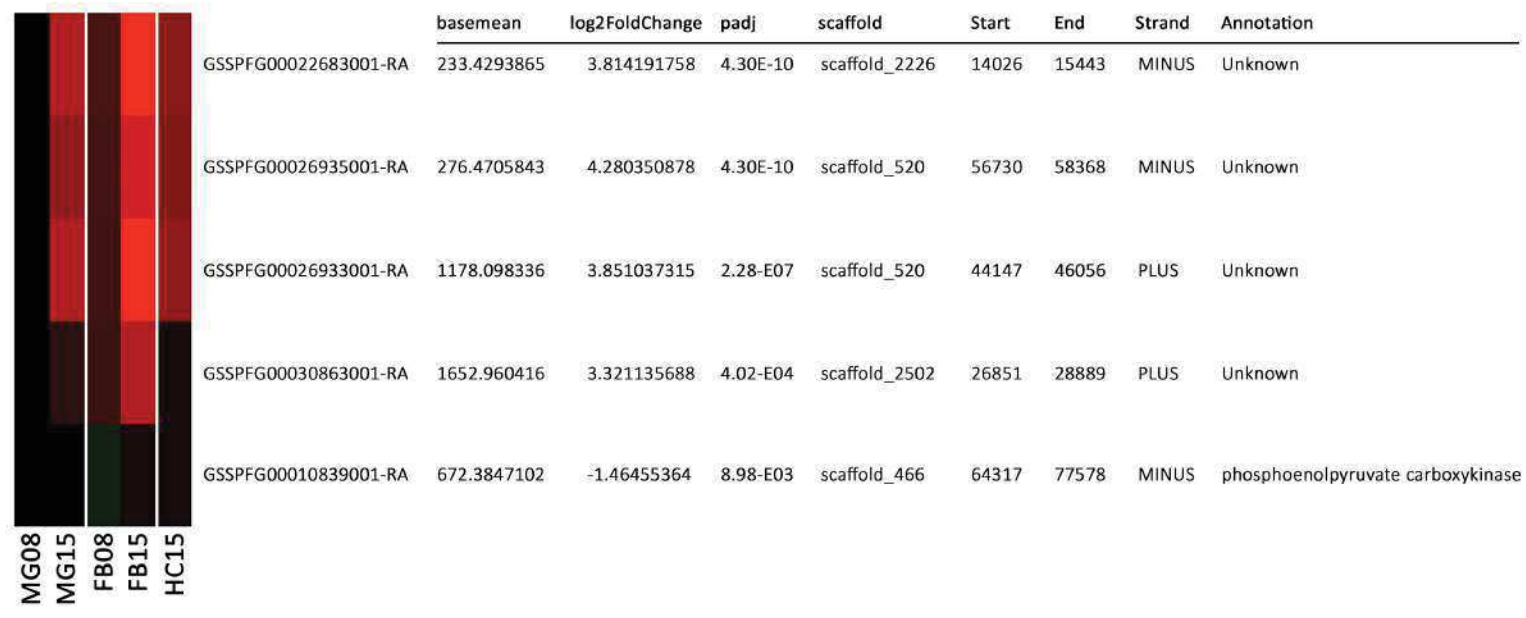
S1 Fig



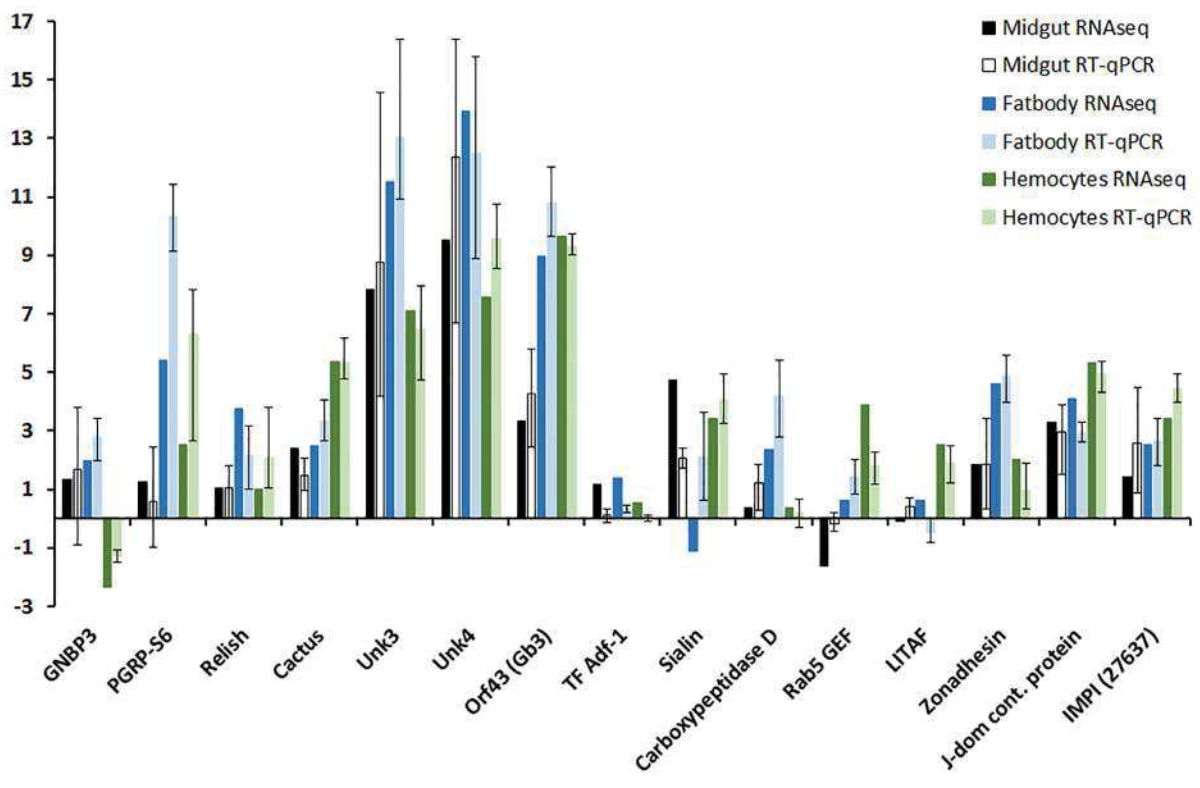
S2 Fig



S3 Fig

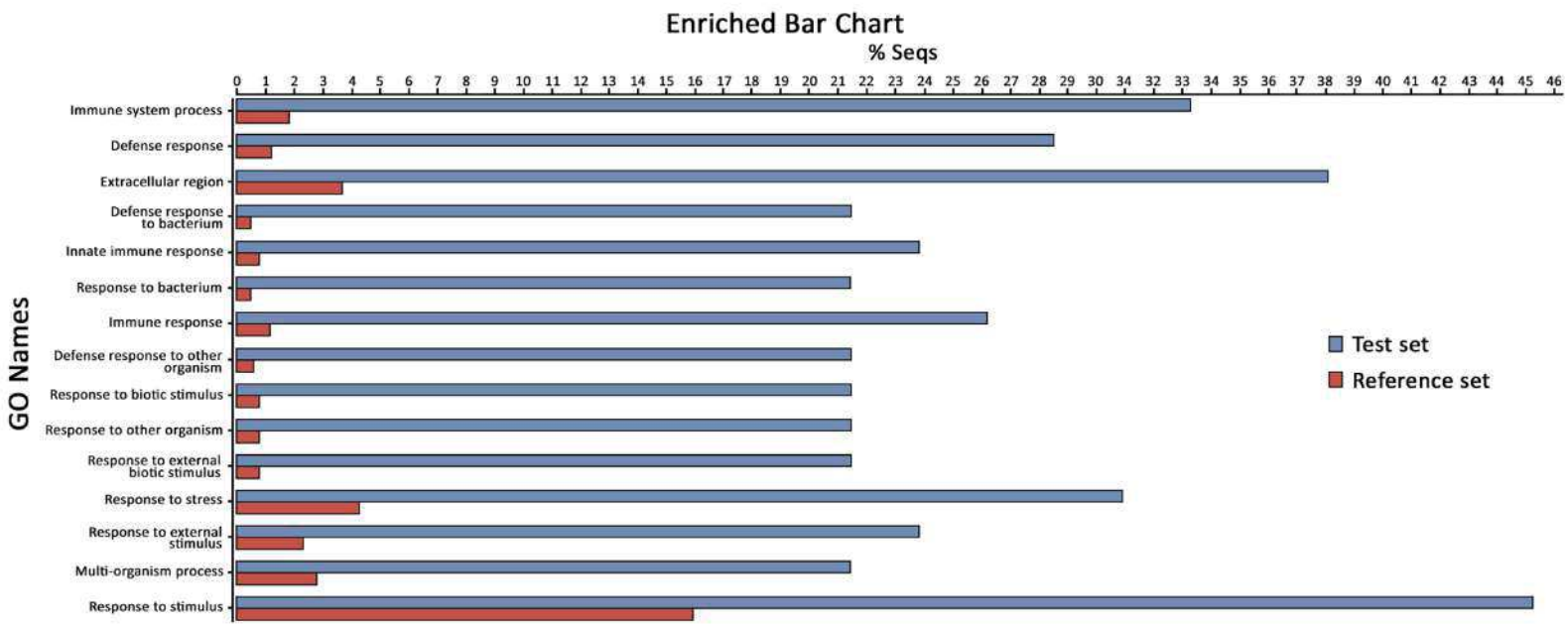


S4 Fig

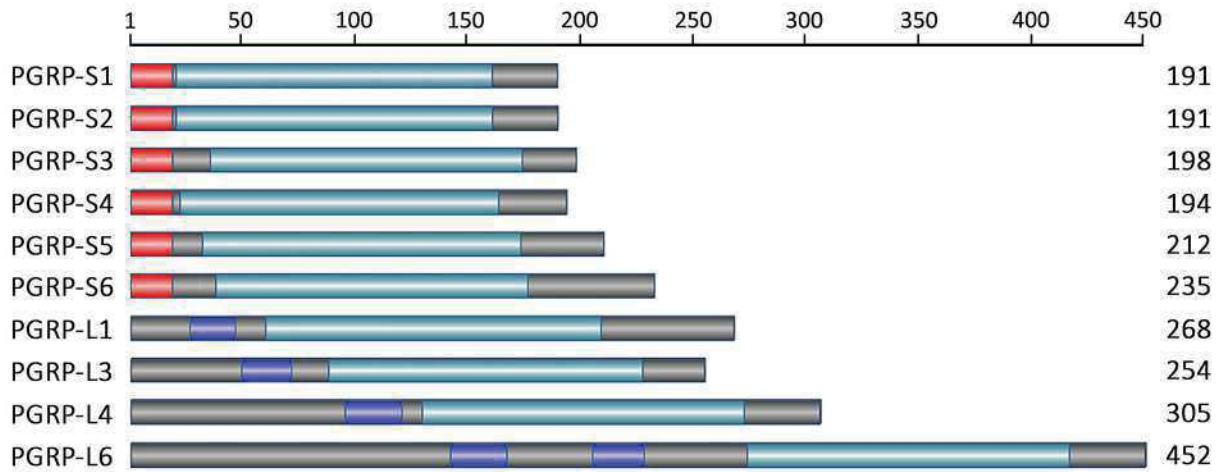




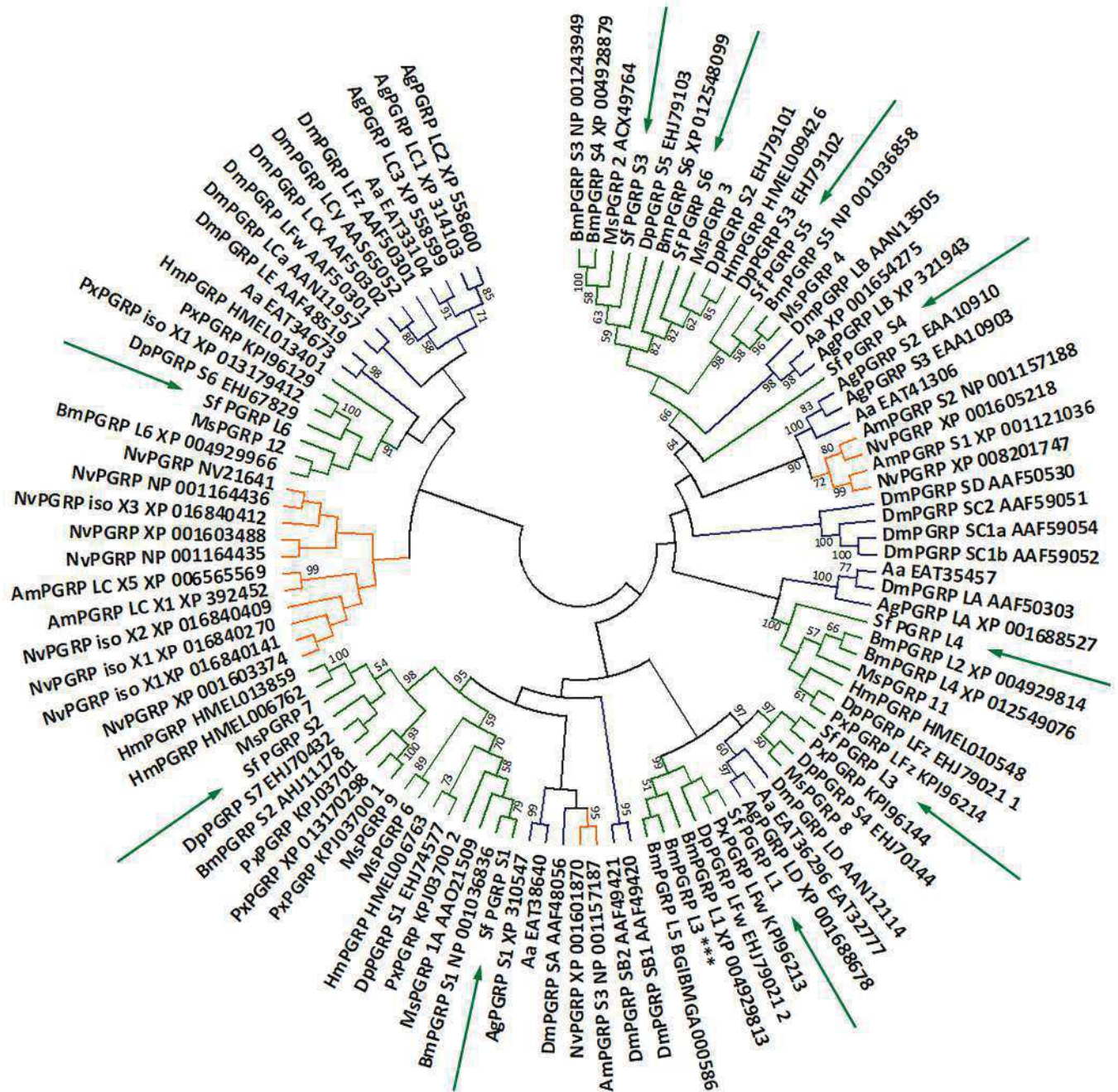
S5 Fig



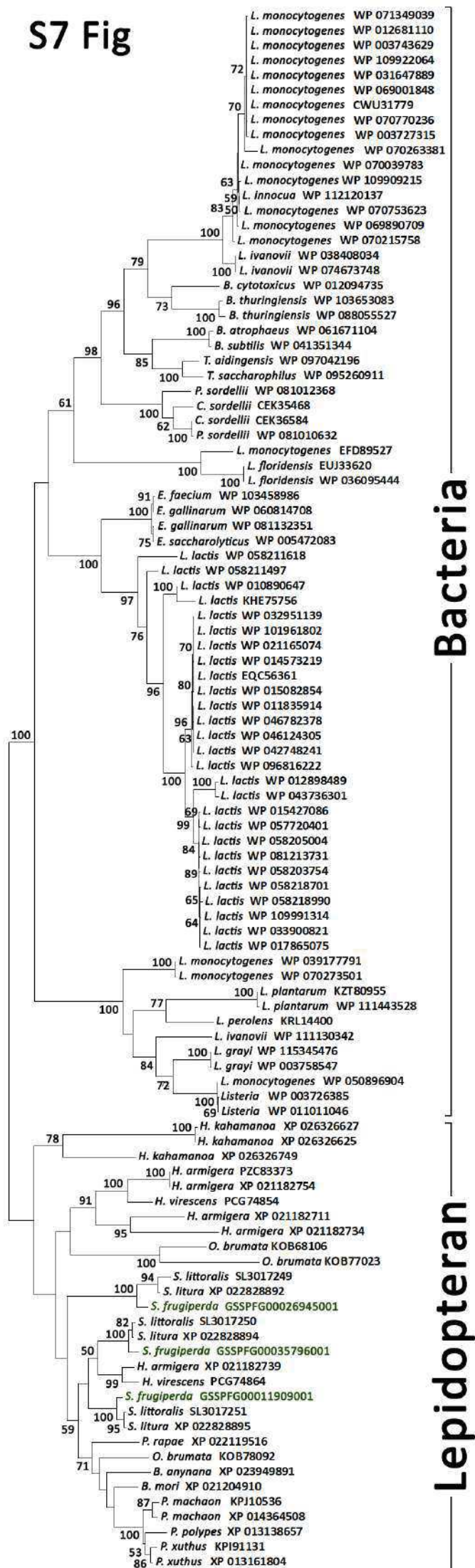
A



B



# S7 Fig



## II. Analyse détaillée des réponses immunitaires à l'infection par le CNB et identification de réponses partenaire-spécifiques

L'étude de la dynamique temporelle des réponses immunitaires à l'infection par le CNB, ainsi que des effets de chaque partenaire du complexe sur ces réponses ont fait l'objet de notre second article « Partner-specific induction of *Spodoptera frugiperda* immune genes in response to the entomopathogenic nematobacterial complex *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* ». Cet article a été accepté pour publication dans le journal *Developmental & Comparative Immunology* le 11 mars 2020 et ses principaux éléments sont résumés ci-dessous.

### A. Approche expérimentale

L'analyse transcriptomique réalisée dans l'article 1 a permis d'obtenir un aperçu topologique de la réponse immunitaire de l'insecte à l'infection par le CNB, tout en limitant les nombres de faux positifs au sein des listes de gènes DE dans le corps gras et l'intestin moyen. Toutefois, cette analyse très stringente ne nous a permis d'identifier que les gènes immunitaires fortement surexprimés. Avant d'aborder les questions spécifiques au papier 2, nous avons voulu produire une analyse plus inclusive des données de RNAseq, exclusivement focalisée sur les gènes de l'immunité. Cette analyse a été réalisée à l'aide des logiciels Kallisto et Sleuth, sous la forme de comparaisons deux à deux pour chaque tissu et chaque temps. Pour détecter un éventuel effet plateforme, nous avons vérifié manuellement si les profils d'expression des gènes immunitaires DE dans le corps gras et l'intestin moyen des larves contrôles au temps 15 heures étaient similaires à ceux des larves contrôles au temps 8 heures. Tandis qu'aucun effet de ce type n'a été détecté pour les gènes immunitaires DE dans le corps gras à 15 heures, un potentiel effet plateforme a été détecté pour la majorité des gènes immunitaires identifiés comme DE dans l'intestin moyen. Par ailleurs, l'analyse des réponses de l'intestin moyen et du corps gras au temps 8 heures n'a révélé aucune information supplémentaire par rapport à l'article 1. Nous avons donc débuté ce second article avec une analyse plus exhaustive des réponses immunitaires induites dans les hémocytes et dans le corps gras à 15 heures. Pour l'interprétation biologique des données, les gènes DE ont cette fois-ci été regroupés par type de réponse immunitaire et par fonction probable.

A partir de cette analyse, nous avons effectué des sélections de gènes représentatifs des réponses immunitaires des deux tissus. Nous avons ensuite utilisé ces sélections pour examiner, par RT-qPCR, l'évolution des réponses immunitaires de l'insecte au cours du temps après exposition au CNB. Une expérience préliminaire a permis de montrer que les premières libérations de *X. nematophila* ont lieu entre 4 et 6 heures après mise en contact avec les CNBs. Nous avons donc commencé la cinétique à 5 heures dans le but d'identifier les premières réponses induites par l'entrée du nématode dans l'hémocœle, et nous l'avons poursuivie jusqu'à 20 heures, soit environ 9 heures avant les premières mortalités.

En second lieu, nous avons cherché à identifier les participations relatives de chaque partenaire du CNB à l'induction des réponses immunitaires des deux tissus. Pour cela, nous avons utilisé un protocole d'infection plus standardisé, par injections indépendantes du CNB, de *X. nematophila* et du nématode axénique dans l'hémocœle de l'insecte. Notre objectif était ici de limiter les effets parasites, tels qu'une entrée de microorganismes intestinaux dans l'hémocœle, sur les réponses immunitaires de l'insecte. Après avoir vérifié que les cinétiques de mortalité et de croissance de *X. nematophila* étaient similaires après injection du CNB et de la bactérie seule, nous avons mesuré par RT-qPCR les niveaux d'induction des gènes sélectionnés dans les trois conditions à 13 heures post-injection.

Dans l'article 1, nous avons identifié 2 clusters de gènes inconnus, celui de *UNKs* et celui des *GBHs*, dont plusieurs membres sont fortement surexprimés dans les 3 tissus à 15 heures. Notre principale hypothèse étant que ces gènes participent à la réponse immunitaire au CNB, nous les avons également considérés dans les analyses de ce second article. Nous avons tout d'abord examiné les données de RNAseq correspondant à l'ensemble des gènes de ces clusters dans les hémocytes et le corps gras. Nous avons ensuite observé, comme précédemment, leurs variations d'expression au cours du temps post-infection, ainsi que leurs profils d'expression en réponse à chaque partenaire du CNB.

## **B. Principaux résultats**

L'analyse des données de RNAseq a permis d'identifier un total de 132 gènes immunitaires DE dans les hémocytes et le corps gras à 15 heures, regroupés dans 4 catégories principales : les réponses humorales antimicrobiennes, la mélanisation, les réponses cellulaires et « divers ». Les gènes surexprimés dans la catégorie réponses humorales antimicrobiennes avaient pour

la plupart été identifiés dans l'article 1. Toutefois, la présente analyse a révélé l'induction de quelques gènes supplémentaires, incluant des gènes codant des GNBPs et des membres des voies Imd et Toll dans les deux tissus. Elle a également mis en évidence l'existence de spécificités tissulaires, dont la plus notable est une induction hémocyte-spécifique de la majorité des PAMs de la famille des Moricines. Plusieurs protéases à sérine à domaine CLIP et Serpines ont aussi pu être ajoutées à la catégorie mélanisation dans les deux tissus, avec de plus une surexpression hémocyte-spécifique d'enzymes de synthèse de la mélanine. Dans la catégorie réponses cellulaires, qui n'avait pas été identifiée précédemment, l'analyse a révélé la surexpression de nombreux gènes de reconnaissance et d'adhérence, tels que des récepteurs Scavengers, une Intégrine, des Immunoglobulines ou encore des Tétraspaines dans les hémocytes. Elle a également montré l'induction de gènes impliqués dans la coagulation, l'activation des hémocytes et la phagocytose. La catégorie « divers » était surtout caractérisée par une surexpression d'IMPIs, majoritairement surexprimés dans les hémocytes, et de lectines, majoritairement surexprimés dans le corps gras. Enfin, cette analyse a permis de mettre en évidence une sous-expression de quelques gènes immunitaires, tels que des cofacteurs de Relish ou encore des membres des voies JNK et du TGF- $\beta$ .

L'étude de la dynamique temporelle de ces différentes réponses a ensuite montré que l'expression des gènes de l'immunité est induite entre 0 et 10 heures après exposition au CNB, et qu'elle reste ensuite stable jusqu'à 20 heures dans les deux tissus. Cette expérience n'a révélé aucune chronologie particulière dans l'induction des différentes catégories et sous-catégories de gènes immunitaires.

L'analyse des réponses induites après injections indépendantes du CNB, de *X. nematophila* et de *S. carpocapsae* a montré que les hémocytes et le corps gras répondent tous deux à la présence du nématode et de la bactérie. Au sein des réponses des deux tissus, la bactérie est la principale responsable de l'induction de gènes classiquement impliqués dans les réponses immunitaires contre les bactéries à Gram négative, tels que des membres de la voie Imd, des PAMs des familles des Attacines, Cécropines et Glovérines, ou encore l'opsonine sécrétée Hémoline. Les gènes principalement surexprimés en réponse au nématode incluent quant à eux des lectines, une protéase à sérine à domaine CLIP, une Tétraspaine probablement impliquée dans l'encapsulation, ainsi que des membres de la voie Toll dans le corps gras.

Les analyses réalisées sur les gènes inconnus ont tout d'abord montré qu'alors que les *UNKs* sont principalement exprimés dans le corps gras, les *GBHs* le sont principalement dans les hémocytes. Dans ces tissus, l'analyse de leurs variations d'expression au cours du temps post-exposition au CNB a montré que les *UNKs* et les *GBHs* sont surexprimés à partir de 5 ou 10 heures et que leurs niveaux d'induction restent ensuite très stables jusqu'à 20 heures, comme dans le cas des gènes de l'immunité. L'analyse de leurs profils d'expression en réponse à chaque membre du CNB a quant à elle révélé qu'alors que les *UNKs* sont spécifiquement induits en réponse au partenaire nématode, les *GBHs* sont principalement induits en réponse au partenaire bactérien.

### C. Conclusions

Cette étude a tout d'abord permis d'établir que l'infection par le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* induit des réponses humorales et cellulaires variées, qui se maintiennent de façon stable jusqu'à la fin du processus infectieux. Elle a également permis de montrer que les hémocytes et le corps gras répondent de façon adaptée à la présence de chacun des deux partenaires du complexe. Au sein des réponses au CNB, *X. nematophila* est en effet la principale responsable de l'induction de membres de la voie Imd, ainsi que de PAMs et d'opsonines classiquement impliqués dans les réponses aux bactéries à Gram négative. *S. carpocapsae* induit quant à lui une surexpression de lectines, qui ont déjà été impliquées dans la reconnaissance de nématodes chez le modèle *Manduca sexta* (Yu and Kanost, 2004), ainsi que de gènes impliqués dans la mélanisation et l'encapsulation, les deux réponses connues pour être produites face à ce type de pathogène (Eleftherianos *et al.*, 2017).

Du point de vue du CNB, nos résultats montrent que les stratégies immunosuppressives et immunoévasives de *X. nematophila* et de *S. carpocapsae* n'ont pas d'impact global sur l'induction transcriptionnelle des différentes composantes de l'immunité à des temps avancés de l'infection. Toutefois, un éventuel lien entre la sous-expression de cofacteurs de Relish, ainsi que de membres des voies JNK, Jak-Stat et du TGF- $\beta$  et les stratégies immunosuppressives du CNB reste à explorer.

Un autre résultat particulièrement intéressant du point de vue de l'étude des bases moléculaires des réponses immunitaires des insectes aux CNBs est l'induction partenaire-spécifique des gènes *UNKs* et *GBHs*. Ce résultat suggère que ces gènes fortement surexprimés

ont bien des fonctions spécifiques dans la réponse au CNB, ce qui ouvre la voie pour leurs caractérisations fonctionnelles.

## **D. Article 2**



1 Partner-specific induction of *Spodoptera frugiperda* immune genes in  
2 response to the entomopathogenic nematobacterial complex *Steinernema*  
3 *carpocapsae-Xenorhabdus nematophila*

4

5 Louise Huot<sup>1</sup>, Audrey Bigourdan<sup>1</sup>, Sylvie Pagès<sup>1</sup>, Jean-Claude Ogier<sup>1</sup>, Pierre-Alain  
6 Girard<sup>1</sup>, Nicolas Nègre<sup>1,\*</sup> and Bernard Duvic<sup>1,\*</sup>

7 <sup>1</sup> DGIMI, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier, France

8

9 \* Co-corresponding authors

10 E-mail: [nicolas.negre@umontpellier.fr](mailto:nicolas.negre@umontpellier.fr) (NN) ; [bernard.duvic@umontpellier.fr](mailto:bernard.duvic@umontpellier.fr) (BD)

## 11 **Abstract**

12 The *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* association is a nematobacterial complex used  
13 in biological control of insect crop pests. The infection success of this dual pathogen strongly depends on  
14 its interactions with the host's immune system. Here, we used the lepidopteran pest *Spodoptera*  
15 *frugiperda* to analyze the respective impact of each partner in the induction of its immune responses.  
16 First, we used previously obtained RNAseq data to construct the immunome of *S. frugiperda* and analyze  
17 its induction. We then selected representative genes to study by RT-qPCR their induction kinetics and  
18 specificity after independent injections of each partner. We showed that both *X. nematophila* and *S.*  
19 *carpocapsae* participate in the induction of stable immune responses to the complex. While *X.*  
20 *nematophila* mainly induces genes classically involved in antibacterial responses, *S. carpocapsae* induces  
21 lectins and genes involved in melanization and encapsulation. We discuss putative relationships between  
22 these differential inductions and the pathogen immunosuppressive strategies.

## 23 **Keywords**

24 *Steinernema carpocapsae*, *Xenorhabdus nematophila*, *Spodoptera frugiperda*, nematobacterial complex,  
25 immunome, transcriptional response

## 26 **Abbreviations<sup>1</sup>**

### 27 **1. Introduction**

28 The *Steinernema-Xenorhabdus* nematobacterial complexes (NBCs) are natural symbiotic associations  
29 between nematodes and enterobacteria that are pathogenic for insects. The soil-living nematodes infest  
30 insects through the respiratory and/or the intestinal tract (Dowds and Peters, 2002) and reach the  
31 hemocoel, the internal body cavity, where they release their intestinal symbionts. The bacteria then grow  
32 extracellularly in the hemolymph, the insect equivalent of blood, and improve the nematodes'  
33 pathogenicity as well as their ability to reproduce in the host dead body (Forst and Clarke, 2002). Until  
34 now, about 90 species of *Steinernema* have been identified, among which several are usable as biological  
35 control agents against diverse insect crop pests (Labaude and Griffin, 2018; Lacey et al., 2015). In  
36 consequence, their interactions with insects have been extensively studied for about 50 years (Poinar and  
37 Grewal, 2012). These studies have shown that in addition to ecological and morphological parameters  
38 (Labaude and Griffin, 2018), the NBCs' interactions with the host's immune system is one of the most

---

<sup>1</sup> NBC: nematobacterial complex; AMP: antimicrobial peptides; NBTA: Nutrient bromothymol blue agar;  
PBS: phosphate buffered saline; CFU: Colony-forming unit; GNBP: Gram-negative binding protein;  
PGRP: Peptidoglycan recognition protein; LLP: Lysozyme-like protein; PPAE: Prophenoloxidase-  
activating enzyme; IMPI: Insect metalloproteinase inhibitor protein; TEP: Thiol-ester protein

39 crucial factors influencing their ability to infest and kill a given insect (Li et al., 2007; Thurston et al.,  
40 1994; Wang et al., 1994).

41 Insects possess an elaborate immune system, which is able to respond appropriately to diverse types of  
42 pathogens and of infections. Firstly, this system involves protective external barriers such as the cuticle,  
43 or the peritrophic matrix in the midgut (Kristensen and Chauvin, 2012; Lehane, 1997). It then relies on  
44 local defenses of the surface epithelia, which repair efficiently (Ferrandon, 2013; Galko and Krasnow,  
45 2004; Rowley and Ratcliffe, 1978) and produce toxic factors such as antimicrobial peptides (AMPs)  
46 (Brey et al., 1993; Tingvall et al., 2001; Tzou et al., 2000; Wu et al., 2010) and reactive oxygen species  
47 (Ha et al., 2009). The third line of defense of insects is provided by the hemocytes, which are the  
48 circulating immune cells. They can produce diverse types of immune responses, including AMP  
49 synthesis, phagocytosis, nodulation, encapsulation, coagulation and melanization (Strand, 2008).  
50 Nodulation and encapsulation are cellular immune responses respectively consisting in the engulfment of  
51 bacterial aggregates and of large invaders via hemocytes aggregation (Strand, 2008). Together with  
52 coagulation, these responses are coupled with a melanization process consisting of series of phenolic  
53 compounds oxidations resulting in synthesis of reactive molecules and melanin that participate in  
54 pathogens trapping and killing (Jiravanichpaisal et al., 2006; Nappi and Christensen, 2005). Finally, the  
55 fat body, a functional equivalent of the mammalian liver, produces potent systemic humoral immune  
56 responses involving a massive secretion of AMP cocktails in the hemolymph. These responses can be  
57 induced by two major signaling pathways of insect immunity; the Imd pathway, which is mainly  
58 activated by Gram negative bacteria, and/or the Toll pathway, which is mainly activated by Gram positive  
59 bacteria, fungal organisms and by proteases released by pathogens (Ferrandon et al., 2007; Issa et al.,  
60 2018).

61 The *Steinernema-Xenorhabdus* NBC whose interactions with the immune system have been the most  
62 extensively studied is the *S. carpocapsae-X. nematophila* association. These interactions have firstly been  
63 studied from the NBC point of view, which allowed the identification of a multitude of immunoevasive  
64 and immunosuppressive strategies. For instance, studies in *Rhynchophorus ferrugineus* and *Galleria*  
65 *mellonella* have respectively shown that the cuticle of *S. carpocapsae* is not recognized by the host's  
66 immune system (Binda-Rossetti et al., 2016; Mastore et al., 2015) and that the nematode secretes protease  
67 inhibitors impairing the coagulation responses (Toubarro et al., 2013a; Toubarro et al., 2013b). Studies in  
68 diverse insect models have also shown that both partners produce factors impairing melanization  
69 (Balasubramanian et al., 2009; Balasubramanian et al., 2010; Crawford et al., 2012; Eom et al., 2014),  
70 hemocyte's viability (Brivio et al., 2018; Kim et al., 2005; Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2003;  
71 Vigneux et al., 2007) and the production of cellular immune responses by several ways (Balasubramanian  
72 et al., 2009; Balasubramanian et al., 2010; Eom et al., 2014; Park and Kim, 2000; Park and Stanley, 2006;  
73 Toubarro et al., 2013b). Finally, both *X. nematophila* and *S. carpocapsae* secrete proteolytic factors

74 degrading cecropin AMPs (Caldas et al., 2002; Gotz et al., 1981) and the bacterium has also been shown  
75 to reduce more globally the hemolymph antimicrobial activity, as well as AMP transcription in  
76 lepidopteran models (Binda-Rossetti et al., 2016; Caldas et al., 2002; Duvic et al., 2012; Ji and Kim,  
77 2004).

78 On the other hand, the description of these interactions from the hosts' points of view is at its beginning.  
79 This aspect has mainly been studied in the *Drosophila melanogaster* model, with a first transcriptomic  
80 analysis of the whole larva responses to infestations by entire NBCs and by axenic nematodes (Yadav et  
81 al., 2017). This analysis has shown that several immune processes are induced by both pathogens at the  
82 transcriptional level. For instance, the authors found in each case an overexpression of genes related to  
83 the Imd and Toll pathways that was accompanied by the induction of a few AMP genes. They also found  
84 an upregulation of genes related to melanization, coagulation, or involved in the regulation of cellular  
85 immune responses (Yadav et al., 2017). Complementary gene knockout experiments in this model  
86 demonstrated an involvement of the Imd pathway in the response against *X. nematophila* (Aymeric et al.,  
87 2010) and revealed a possible involvement of the Imaginal Disc Growth Factor-2, the intestinal serine  
88 protease Jonah 66Ci (Yadav and Eleftherianos, 2019) as well as TGF- $\beta$  and JNK pathways members in  
89 the regulation of anti-nematode immunity (Yadav and Eleftherianos, 2018; Yadav et al., 2018).

90 In order to improve our understanding of the dialogue that takes place between this NBC and its host, we  
91 recently published a topologic transcriptomic analysis of the response of the lepidopteran model  
92 *Spodoptera frugiperda* to the infestation (Huot et al., 2019). This analysis was focused on the three main  
93 immunocompetent tissues that are confronted to the NBC, which are the midgut (the main entry site in  
94 the hemocoel), the hemocytes and the fat body. The RNAseq experiment showed that there was no potent  
95 or well-defined transcriptional response in the midgut. However, we observed dramatic transcriptional  
96 responses in the fat body and the hemocytes at 15 h post-infestation, which is a middle time point of the  
97 infection. In agreement with the results obtained in *D. melanogaster* whole larvae (Yadav et al., 2017),  
98 global analysis of these responses showed they are dominated by immune processes. The objective of the  
99 present study is to go further in the analysis of these induced immune responses. In order to describe them  
100 with high accuracy, we first examine the expression variations of all the immune genes that have been  
101 identified in the insect's genome. We then use tissue RT-qPCR experiments to analyze the temporal  
102 dynamics and the relative contribution of each NBC partner in the identified immune responses. Our  
103 results show that a large number of immune genes are responsive in either one or the two tissues during  
104 the infestation, with activation of antimicrobial and cellular immunities, of melanization, coagulation and  
105 of metalloprotease inhibition. These responses were found to be stable over the time post-infestation and  
106 to consist in combinations of *X. nematophila*-induced and *S. carpocapsae*-induced responses in each  
107 tissue. The *X. nematophila*-induced responses mainly correspond to genes that are classically involved in  
108 antibacterial immunity, whereas the *S. carpocapsae*-induced ones mainly include lectins and genes

109 potentially involved in melanization and encapsulation. In addition, our RT-qPCR experiments show that  
110 two previously identified candidate clusters of uncharacterized genes (Huot et al., 2019) also present  
111 partner-specific induction profiles. Our hypothesis is that they may correspond to new types of anti-  
112 nematode and antibacterial immune factors found in *Spodoptera* genus and lepidopteran species,  
113 respectively.

## 114 **2. Materials and Methods**

### 115 **2.1. Insect rearing**

116 Corn-strain *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) were fed on corn-based artificial diet  
117 (Poitout and Buès, 1970). They were reared at 23°C +/- 1°C with a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark)  
118 and a relative humidity of 40 % +/- 5 %. *Galleria mellonella* (Lepidoptera : Pyralidae) were reared on  
119 honey and pollen at 28°C in dark.

### 120 **2.2. Production and storage of nematobacterial complexes**

121 *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* complexes (strain SK27 isolated from Plougastel,  
122 France) were renewed by infestation of one month-old *Galleria mellonella* larvae. They were collected on  
123 White traps (White, 1927) and stored at 8°C in aerated Ringer sterile solution with 0.1 % formaldehyde.  
124 The maximal time of storage was limited to 4 weeks to avoid pathogenicity losses.

### 125 **2.3. Production of axenic nematodes**

126 Gravid *S. carpocapsae* females were extracted from *G. mellonella* dead bodies at day 4 to 6 after  
127 infestation by nematobacterial complexes (NBCs). After 5 washing steps in Ringer sterile solution, the  
128 females were surface-sterilized by 20 min incubation in 0.48 % (wt/vol) sodium hypochlorite and 3 h  
129 incubation in Ringer sterile solution supplemented with antibiotics (150 µg/mL polymyxin, 50 µg/mL  
130 colistin, 50 µg/mL nalidixic acid). The eggs were extracted by female crushing with sterile glass pestles  
131 and then washed by centrifugation (2 min, 16000 g) in Ringer sterile solution, disinfected by incubation  
132 in 0.48 % sodium hypochlorite for 5 min, and washed again twice. After microscopic observation, the  
133 intact eggs were placed on liver-agar (40 g/L Tryptycase Soja Agar [BioMérieux], 5 g/L Yeast Extract  
134 [Difco], 100 g/L porc liver) plates supplemented with antibiotics (150 µg/mL polymyxin, 50 µg/mL  
135 colistin and 50 µg/mL nalidixic acid). The plates were maintained inside a dark humid chamber for 1  
136 month to allow nematodes development. The nematodes were then suspended in Ringer sterile solution  
137 and infective juvenile stages (IJs) were sorted by pipetting under a microscope (Leica). The IJs were  
138 rinsed twice by centrifugation (2 min, 3000 g) in 1 mL Ringer sterile solution and used within minutes for  
139 experimental infection.

140 Nematodes' axenicity was verified by DNA extraction and PCR amplification. Nematodes were  
141 suspended in 200  $\mu$ L milliQ water supplemented with 200  $\mu$ L glass beads ( $\text{\O} \leq 106 \mu\text{m}$ ) (Sigma). They  
142 were ground for 2 x 40 sec at 4.5 ms speed with a FastPrep homogenizer (MP Biomedicals). The debris  
143 were discarded by centrifugation (2 min, 16000 g) and 150  $\mu$ L supernatant were mixed with 200  $\mu$ L lysis  
144 buffer (Quick extract kit, Epi-centre) for a second grinding. To ensure bacterial cell lysis, the samples  
145 were incubated at room temperature for 48 h with 2  $\mu$ L Ready-Lyse Lysozyme solution at 30000 U/ $\mu$ L  
146 (Epi-centre). Protein denaturation was then performed by 10 min incubation at 90°C, and RNA was  
147 removed by 10 min incubation at 37°C with 20  $\mu$ L RNase A (20 mg/mL) (Invitrogen). DNA was  
148 extracted by successive addition of 500  $\mu$ L phenol-chloroform-isoamyl alcohol and 500  $\mu$ L chloroform,  
149 followed by centrifugations (10 min, 16000 g) and aqueous phase collections. DNA was precipitated with  
150 500  $\mu$ L 100% ethanol supplemented with 20  $\mu$ L sodium acetate and by freezing at -80°C for 2 h. After  
151 defrosting, DNA was concentrated by centrifugation (30 min, 16000 g) and the precipitates were washed  
152 twice by centrifugation (15 min, 16000 g) in 500  $\mu$ L 70% ethanol. DNA was finally suspended in 50  $\mu$ L  
153 sterile milliQ water and left at room temperature for a few hours to ensure precipitate dissolution. After  
154 DNA quantification with a Qubit fluorometer (Invitrogen), *X. nematophila* presence was assessed by PCR  
155 amplification with *Xenorhabdus*-specific primers (Xeno\_F: 5'-ATG GCG CCA ATA ACC GCA ACT A-  
156 3'; Xeno\_R: 5'-TGG TTT CCA CTT TGG TAT TGA TGC C-3'), which target a region of the  
157 XNC1\_0073 gene encoding a putative TonB-dependent heme-receptor (Cambon et al., 2020). The  
158 presence of other bacteria was assessed by 16S rRNA gene amplification with universal primers (Tailliez  
159 et al., 2006). Thirty cycles of PCR were performed using Taq polymerase (Invitrogen) in a Biorad  
160 thermocycler, with hybridization temperatures of 55°C and 50°C respectively. PCR products were then  
161 analyzed by agarose gel electrophoresis with DNAs from *X. nematophila*, *Pseudomonas protegens* and *S.*  
162 *carpocapsae-X. nematophila* complexes as controls (Supplementary Fig. 1).

#### 163 **2.4. Experimental infections**

164 Experimental infestations with NBCs were carried out on individual 2<sup>nd</sup> day 6<sup>th</sup> instar *S. frugiperda* larvae  
165 according to Huot et al. (2019). Briefly, 12-well plates were coated with pieces of filter paper (Whatman)  
166 and larvae were individually introduced in each well with a cube of artificial diet (Poitout and Buès,  
167 1970). For infestations, 150 +/- 20 NBCs in 150  $\mu$ L Ringer sterile solution were poured in each well and  
168 the plates were then maintained at 23°C. 150  $\mu$ L Ringer sterile solution were used for control  
169 experiments.

170 For intra-hemocoelic injection experiments, pathogens were injected in larvae's abdomens after local  
171 application of 70% ethanol with a paintbrush. Injections were performed using a syringe pump (Delta  
172 labo) with 1 mL syringes (Terumo) and 25G needles (Terumo). The injected larvae were then kept in 12-  
173 well plates at 23 °C with cubes of artificial diet (Poitout and Buès, 1970).

174 *X. nematophila* suspensions were prepared as described in Sicard et al. (2004). Bacterial culture was  
175 diluted in PBS and 20  $\mu$ L containing 200 +/- 50 bacterial cells were injected in the hemocoel at a rate of  
176 1.67 mL/min. 20  $\mu$ L sterile PBS were used for control larvae. The purity and number of injected *X.*  
177 *nematophila* were verified by plating 20  $\mu$ L of the bacterial suspension on NBTA (Boemare et al., 1997).

178 For NBC and axenic nematode injections, 10 +/- 3 nematodes in 20  $\mu$ L 70% Ringer and 30% glycerol  
179 solution were injected at a rate of 2.23 mL/min. Syringes were frequently renewed in order to limit  
180 nematodes concentration and sedimentation and the number of injected nematodes was verified by 10  
181 simulations of injection in Petri dishes followed by nematode counting under a stereomicroscope (Zeiss).  
182 Sterile 70% Ringer and 30% glycerol solutions were used for control larvae. To avoid accidental *per os*  
183 infections, the injected larvae were then briefly washed in sterile PBS and dried on paper towel before  
184 being placed in 12-well plates.

185 The pathogens efficacies were checked by monitoring the survival of 12 control and 12 infected larvae  
186 for 72 h after infestation or after injection.

## 187 **2.5. Production and storage of bacterial symbionts**

188 *X. nematophila* strain F1 isolated from NBCs strain SK27 was conserved at -80°C. Within 3 weeks before  
189 each experiment, they were grown for 48 h at 28°C on NBTA supplemented with erythromycin (15  
190  $\mu$ g/mL) to which the strain is resistant (Sicard et al., 2004). The colonies were then conserved at 15°C  
191 and used for overnight culture at 28°C in 5 mL Luria-Bertani broth (LB) before experiments.

## 192 **2.6. Caterpillar RNA extraction**

193 RNAs were prepared as described in Huot et al. (2019). Briefly, nine larvae per technical replicate were  
194 bled in anti-coagulant buffer (van Sambeek and Wiesner, 1999). Hemocytes were recovered by  
195 centrifugation (1 min, 800 g) at 4°C and the pellet was immediately flash-frozen with liquid nitrogen. The  
196 larvae were then dissected for fat body and midgut sampling and the tissues were flash-frozen in  
197 eppendorf tubes with liquid nitrogen. After storage at -80°C for at least 24 h, 1 mL Trizol (Life  
198 technologies) was added to the pooled tissues. The tissues were then ground by using a TissueLyzer  
199 85210 Rotator (Qiagen) with one stainless steel bead ( $\emptyset$  : 3 mm) at 30 Hz for 3 min. For optimal cell  
200 lyses, ground tissues were left at room temperature for 5 min. To extract nucleic acids, 200  $\mu$ L  
201 chloroform (Interchim) were added and the preparations were left at room temperature for 2 min with  
202 frequent vortex homogenization. After centrifugation (15 min, 15,000 g) at 4°C, the aqueous phases were  
203 transferred in new tubes and 400  $\mu$ L 70% ethanol were added. RNA purifications were immediately  
204 performed with the RNeasy mini kit (Qiagen) and contaminant DNA was removed with the Turbo DNA-  
205 free<sup>TM</sup> kit (Life Technologies).

206 RNA yield and preparation purity were analyzed by measuring the ratios  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{260}/A_{230}$  with a  
207 Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA integrity was verified by agarose gel  
208 electrophoresis and RNA preparations were conserved at - 80 °C.

## 209 **2.7. RNAseq experiments**

210 RNAseq raw data originate from Huot et al. (2019). In brief, during 3 independent experiments, 9 larvae  
211 infested with 150 *S. carpocapsae-X. nematophila* complexes and 9 uninfected control larvae were bled  
212 and dissected at time 15 hours post-contact with NBCs or Ringer sterile solution (see Materials and  
213 Methods 2.4.). Total RNA from their hemocytes and fat bodies were extracted (see Materials and  
214 Methods 2.6.) and the corresponding libraries were prepared by MGX GenomiX (IGF, Montpellier,  
215 France) with the TruSeq Stranded mRNA sample preparation kit (Illumina). The libraries were then  
216 validated on Fragment Analyzer with a Standard Sensitivity NGS kit (Advanced Analytical Technologies,  
217 Inc) and quantified by qPCR with a Light Cycler 480 thermal cycler (Roche Molecular diagnostics).  
218 cDNAs were then multiplexed by 6 and sequenced on 50 base pairs in a HiSeq 2500 system (Illumina)  
219 with a single-end protocol. Image analysis and base calling were performed with the HiSeq Control and  
220 the RTA software (Illumina). After demultiplexing, the sequences quality and the absence of contaminant  
221 were checked with the FastQC and the FastQ Screen softwares. Data were then submitted to a Purity  
222 Filter (Illumina) to remove overlapping clusters.

223 For each sample, the reads were pseudoaligned on the *S. frugiperda* reference transcriptome version  
224 OGS2.2 (Gouin et al., 2017) using the Kallisto software (Bray et al., 2016). Differential expression  
225 between infested and control conditions were then assessed for each time point and tissue with the Sleuth  
226 software (Pimentel et al., 2017). Wald tests were used with a q-value (equivalent of the adjusted p-value)  
227 threshold of 0.01 and a beta value (biased equivalent of the log2 fold change) threshold of 1. Only  
228 transcripts with normalized counts over 5 in all three replicates of the infested and/or of the control  
229 condition were considered as reliably differentially expressed.

230 Previously annotated immune transcripts (Gouin et al., 2017) were then checked for significant  
231 expression changes and not annotated differentially expressed ones were researched with the Blast2GO  
232 software by blastx on the NCBI nr and drosophila databases (Conesa et al., 2005). To avoid mistakes  
233 related to genome fragmentation, the immune transcripts were gathered by unique gene after careful  
234 examination of their sequences and of the available genomic data (Gouin et al., 2017). The induction  
235 levels of the transcripts were then averaged by unique gene before graphical representation of the results.

## 236 **2.8. RT-qPCR experiments**

237 RT-qPCR experiments were performed with extracted total RNA (see Materials and Methods 2.6.) from  
238 hemocytes and fat bodies of 9 larvae infested or infected by injection and of 9 uninfected control larvae  
239 during 3 independent experiments.



240 For each sample, cDNAs were synthesized from 1  $\mu$ g of RNA with the SuperScript II Reverse  
241 Transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol.  
242 The primers (Supplementary Table 1) were designed with the Primer3Web tool (Untergasser et al., 2012).  
243 Their efficiency was estimated by using serial dilutions of pooled cDNA samples and their specificity  
244 was verified with melting curves analyses. Amplification and melting curves were analyzed with the  
245 LightCycler 480 software (Roche Molecular diagnostics).  
246 RT-qPCRs were carried out in technical triplicate, with the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit  
247 (Roche). For each replicate and primer pair, 1.25  $\mu$ L of sample containing 50 ng/ $\mu$ L of cDNA and 1.75  
248  $\mu$ L of Master mix containing 0.85  $\mu$ M of primers were distributed in multiwell plates by an Echo 525  
249 liquid handler (Labcyte). The amplification reactions were then performed in a LightCycler 480 thermal  
250 cyclor (Roche) with an enzyme activation step of 15 min at 95°C, and 45 cycles of denaturation at 95°C  
251 for 5 sec, hybridization at 60°C for 10 sec and elongation at 72°C for 15 sec.  
252 Crossing points were determined using the Second Derivative Maximum method with the LightCycler  
253 480 software (Roche) and relative expression ratios between control and infected conditions were  
254 manually calculated according to the method of Ganger et al. (2017). The ratios were normalized to the  
255 RpL32 housekeeping gene relative levels and the EF1 gene was used as an internal control.  
256 Statistical analyses of the data were all performed with the R software (R Core Team, 2017). Differential  
257 expression significance between the control and infected conditions was assessed by paired one-tailed t-  
258 tests on  $\Delta$ Cq values. Multiple comparisons of fold changes were assessed by one-way ANOVA on  $\Delta\Delta$ Cq  
259 values followed by post hoc Tukey tests. P-values under 0.05 were considered as significant for all the  
260 above tests. The gplots package was used to draw the heatmaps and the clusters were built from a  
261 dissimilarity matrix based on Pearson correlation coefficients.

## 262 **2.9. Quantification of nematodes in the midgut lumen**

263 NBCs in the midgut lumen were quantified at several times after infestation by nematode counting in the  
264 alimentary bolus. For 3 independent experiments, 3 infested larvae were dissected and the midguts'  
265 alimentary bolus were extracted. Each alimentary bolus was then dissolved in 3 mL sterile PBS in a Petri  
266 dish ( $\emptyset$  : 35 mm) and motile nematodes were counted with a stereomicroscope (Leica).

## 267 **2.10. Quantification of *X. nematophila* in the hemolymph**

268 The concentration of *X. nematophila* strain F1 in the hemolymph was estimated by CFU counting on  
269 selective medium. For 3 independent infestation or infection by injection experiments and 3 technical  
270 replicates, hemolymph was collected by bleeding of 3 caterpillars in 200  $\mu$ L PBS supplemented with  
271 phenylthiourea (Sigma). The volumes of hemolymph were then estimated by pipetting and serial dilutions  
272 of the samples were plated on NBTA with 15  $\mu$ g/mL erythromycin. CFU were counted after 48 h

273 incubation at 28°C and the counts were reported to the estimated hemolymph volumes in order to  
274 calculate the bacterial concentrations. Hemolymph of naive larvae was also plated for control.

## 275 **2.11. Insect survival kinetics**

276 Survival kinetics were measured by 3 independent experiments on pools of 20 larvae infested with NBCs  
277 or injected with NBCs, with axenic *S. carpocapsae* nematodes or with *X. nematophila* symbionts.  
278 Survival was monitored from 0 to 72 hours after contact or injection.

## 279 **2.12. Parasitic success measurement**

280 Parasitic success was measured during 3 independent experiments on pools of 20 NBCs or axenic  
281 nematodes-injected larvae. Dead larvae were individually placed on white traps (White, 1927)  
282 approximately 2 days after their deaths. The emergence of nematodes was assessed at day 40 after  
283 injection by observation of the collection liquid with a stereomicroscope (Leica). Parasitic success was  
284 then calculated as the percentage of larvae with nematode emergence among the infected larvae.

# 285 **3. Results & Discussion**

## 286 **3.1. Hemocytes' and fat body's immune responses**

287 In order to get an accurate picture of the *S. frugiperda* transcriptional immune responses to the NBC  
288 infestation, we first used a previously published list of immune genes identified by sequence homology in  
289 the *S. frugiperda* genome (Gouin et al., 2017). We then used previously obtained RNAseq data (Huot et  
290 al., 2019) to look at their expression variations in the fat body and in the hemocytes (Supplementary  
291 Table 2A) and we completed the repertoire with additional putative immune genes that we directly  
292 identified from lists of differentially expressed genes upon NBC infestation (Supplementary Table 2B).  
293 In total, we present the annotation of 226 immune or putative immune genes of which 132 were  
294 significantly modulated at 15 h post-infestation (hpi) (Sleuth, p-value < 0.01; |Beta| > 1; all count values  
295 > 5 in at least one condition) in one or both tissues (Fig. 1). Among them, 62 were involved in  
296 antimicrobial responses (Fig. 1A), 18 were related to melanization (Fig. 1B), 23 were involved in cellular  
297 responses (Fig. 1C) and the 29 remaining genes were grouped in a category called “diverse” due to  
298 pleiotropic or poorly characterized functions (Fig. 1D).

### 299 **3.1.1. Antimicrobial responses**

300 In the antimicrobial response category, 58 genes were found to be upregulated in at least one of the two  
301 tissues (Fig. 1A). The signaling genes encoded 3 and 8 members of the Imd and Toll pathways,  
302 respectively, as well as 5 short catalytic peptidoglycan recognition proteins (PGRP-S), which are  
303 probably involved in the regulation of these pathways by peptidoglycan degradation (Myllymaki et al.,  
304 2014; Valanne et al., 2011) (Fig. 1A). Four other genes were considered as involved in recognition. They

305 encoded Gram negative binding proteins (GNBPs), which have been reported to recognize  
306 peptidoglycans or  $\beta$ -glucans and participate in the further activation of the Toll pathway (Ferrandon et al.,  
307 2007) and/or of the melanization response (Nakhleh et al., 2017) (Fig. 1A). Finally, the effector genes  
308 encoded 33 antimicrobial peptides (AMPs) belonging to all the *S. frugiperda*'s AMP families (Gouin et  
309 al., 2017) plus 4 lysozymes and lysozyme-like proteins (LLPs) (Fig. 1A). Depending on their families and  
310 on the insect species, AMPs can present varied activity spectra, ranging from antiviral or antibacterial  
311 activities to anti-fungal and anti-parasitic ones (Yi et al., 2014). Varied activity spectra have also been  
312 found for several insects' lysozymes and LLPs (Chen et al., 2018; Gandhe et al., 2007; Satyavathi et al.,  
313 2018; Sowa-Jasilek et al., 2014; Yu et al., 2002). Interestingly, all of the categories and subcategories  
314 cited above were represented in the two tissues, indicating that their antimicrobial responses are  
315 diversified and that the factors responsible for their disappearance in the hemolymph (Binda-Rossetti et  
316 al., 2016; Duvic et al., 2012) probably act at a post-transcriptional level. About a half of the genes  
317 presented similar and significant induction profiles in the hemocytes and in the fat body. This is for  
318 instance the case of the usually anti-Gram negative bacteria attacin, cecropin and gloverin AMPs (Yi et  
319 al., 2014), which were all highly induced in the two tissues (Fig. 1A), suggesting they both respond to the  
320 bacterial partner *X. nematophila*. On the other hand, all the induced GGBP, lysozyme and LLP genes  
321 were found to be either significantly induced in the hemocytes or in the fat body, and in the AMP  
322 category, tissue-specificities were observed for diapausin, defensin-like and most moricin genes (Fig.  
323 1A).

324 Only 8 antimicrobial response genes were found to be significantly downregulated (Fig. 1A).  
325 Interestingly, 4 were involved in the Imd pathway whereas the 4 remaining ones were dispersed between  
326 the AMP, GGBP and lysozyme categories (Fig. 1A). The Imd pathway downregulated factors included  
327 *sickie* and the *akirin* in the hemocytes and *SMARCC2* and *BAP60* in the fat body (Fig. 1A). In *D.*  
328 *melanogaster*, Sickie participates in the activation of Relish, the transcription factor of the Imd pathway  
329 (Foley and O'Farrell, 2004) and the akirin acts together with the Brahma chromatin-remodeling complex,  
330 containing BAP60 and SMARCC2, as cofactor of Relish to induce the expression of AMP genes (Bonnay  
331 et al., 2014). Only few data can be found in current literature on the transcriptional regulation of these  
332 factors (Bonnay et al., 2014; Cao et al. 2015; Chen et al., 2018). It is thus difficult to determine whether  
333 the downregulations we observed correspond to a normal negative feedback of the humoral immune  
334 response or to an immunosuppressive effect of the NBC. In a previous study on the *Spodoptera exigua*  
335 model, Hwang et al. (2013) have shown injection of live *X. nematophila* induces lower transcriptional  
336 inductions of several AMP genes than injection of dead bacteria (Hwang et al., 2013). It would be  
337 interesting to determine, either in the *S. exigua* or in the *S. frugiperda* model, whether reduction of AMP  
338 induction in response to live bacteria co-occurs with a downregulation of the Relish cofactors and  
339 activators we identified in the present analysis.

340 To summarize, the antimicrobial responses are potent and diversified in the two tissues, with a common  
341 induction of genes that probably respond to *X. nematophila*. Yet unexplained tissue-specific responses  
342 were observed and the results show a down-regulation of Imd pathway members that could be related to a  
343 previously described transcriptional immunosuppressive effect of the NBC. However, since at 15hpi, the  
344 full repertoire of *S. frugiperda* AMP is still expressed in response to naturally infesting NBC (Fig. 1A),  
345 this effect might not be potent enough to suppress the humoral response at this time point, suggesting that  
346 the NBC probably uses additional resistance and/or immunosuppressive strategies to survive the insect's  
347 humoral immune response.

### 348 **3.1.2. Melanization**

349 In the melanization category, 16 genes were found to be upregulated in at least one of the two tissues  
350 (Fig. 1B). These genes firstly encoded 6 serine proteases (Fig. 1B) that were considered as members of  
351 the prophenoloxidase (proPO) system. The proPO system is an extracellular proteolytic cascade ending in  
352 the maturation of the proPO zymogen into PO, which initiates the melanization process (Nakhleh et al.,  
353 2017). Among the upregulated serine proteases, PPAE2 is the only one that is known to take part in  
354 proPO processing whereas the other proteases were included in this category because of their  
355 characteristic CLIP domains and of their low homology with the serine proteases acting upstream of the  
356 Toll pathway in *D. melanogaster* (Veillard et al., 2016). The other upregulated genes in this category  
357 included 3 serpins, which are known to regulate the proPO system in several model insects (Nakhleh et  
358 al., 2017), 3 melanization enzymes, DDC, Yellow-like 1 and Punch-like (De Gregorio et al., 2001; Tang,  
359 2009) as well as 4 genes, Reeler-1 and 3 Hdd23 homologs, that are involved in melanization and nodule  
360 formation in other models (Bao et al., 2011; Qiao et al., 2014) (Fig. 1B). Despite of tissue-specific  
361 induction patterns, serine proteases and serpins were found in the two tissues (Fig. 1B), suggesting that  
362 both participate in the stimulation of the proPO system, which is consistent with results obtained in other  
363 interaction models (Yuan et al., 2017; Zou et al., 2015; Zou et al., 2010). However, with the exception of  
364 the DDC, all the melanization enzymes as well as the nodulation-related genes were specifically induced  
365 in the hemocytes (Fig. 1B), which is consistent with the very localized nature of this immune response  
366 (Tang, 2009) that is mainly mediated by hemocyte subtypes.

367 Finally, only 2 genes, PPAE1 and Yellow-like 2, were found to be significantly down-regulated in this  
368 category (Fig. 1B). Both were specifically repressed in the hemocytes, which could be due to functional  
369 interferences with their upregulated homologs (PPAE2 and Yellow-like 1) and/or to an expression in  
370 specific hemocyte subtype(s) whose proportion in the total hemocyte population would influence the  
371 observed log2 fold changes. There is also the possibility of an immunosuppressive effect of the NBC on  
372 the expression of these genes.

373 In summary, our results suggest that both the hemocytes and the fat body participate in induction and  
374 regulation of melanization in response to the NBC and no clear sign of immunosuppression at the

375 transcriptional level is detected for this response. These results are in agreement with the previous  
376 identification of diverse inhibitors of PO activity in both *S. carpocapsae* (Balasubramanian et al., 2009;  
377 Balasubramanian et al., 2010) and *X. nematophila* (Crawford et al., 2012; Eom et al., 2014) that act at the  
378 post-transcriptional level.

### 379 **3.1.3. Cellular responses**

380 In the hemocytes, 19 upregulated genes were placed in the cellular responses category (Fig. 1C). The  
381 signaling ones encoded 3 homologs of the transcription factor Krüppel (Kr) (Fig. 1C). In *D.*  
382 *melanogaster*, Kr and Kr homologs are involved in several developmental processes such as embryo  
383 patterning (Schmucker et al., 1992), organogenesis (Fichelson et al., 2012; Harbecke and Janning, 1989;  
384 Hoch and Jackle, 1998), and cell differentiation (Ivy et al., 2015). More specifically in the hemocytes, Kr  
385 has been shown to take part in hemocytes' differentiation and/or activation (Stofanko et al., 2008), a  
386 crucial step for the induction of cellular immune responses. The recognition genes encoded 3 cellular  
387 receptors of the Scavenger (SR) and Integrin families plus the hemolin, a secreted immunoglobulin-  
388 containing protein (Fig. 1C). Both Scavenger receptors and integrins are known to act as membrane  
389 receptors in phagocytosis of bacteria and apoptotic cells (Nazario-Toole and Wu, 2017). In addition,  
390 integrins are involved in diverse processes, including cell motility and adhesion, and encapsulation (Levin  
391 et al., 2005; Melcarne et al., 2019). The hemolin is known to act as an opsonin by increasing phagocytosis  
392 and nodulation of bacteria in *Manduca sexta* (Eleftherianos et al., 2007). Among the effector genes, we  
393 first identified 5 upregulated genes corresponding to conserved intracellular phagocytosis-related  
394 proteins. They included Ced-6, the Rabenosyn-5 (Rbsn-5-like), a V-ATPase subunit (ATP6V0A2-like)  
395 and 2 small GTPase Activating Proteins (Rabex-5-like, CdGAPr-like) (Nazario-Toole and Wu, 2017)  
396 (Fig. 1C). We also found genes encoding membrane proteins, such as the immunoglobulin-containing  
397 hemicentin (HMCN-like) (Barat-Houari et al., 2006) and 4 tetraspanin-like (Tsp-like) proteins (Hemler,  
398 2008) (Fig. 1C), that could participate in cell-cell adhesion and cellular immune responses. Interestingly,  
399 one of the upregulated tetraspanins (Tsp-like 3) presented 79.5% identity with the *Manduca sexta*  
400 (Lepidoptera : Noctuidae) tetraspanin D76, which takes part in hemocytes aggregation during capsule  
401 formation by trans-interacting with a specific integrin (Zhuang et al., 2007). Finally, 2 genes encoding  
402 proteins similar to the *D. melanogaster* clotting factors GP150 (Korayem et al., 2004) and a  
403 transglutaminase (Tg-like) (Lindgren et al., 2008) were also found upregulated (Fig. 1C). Only 2 genes  
404 (Ced-6-like, Rbsn-5-like) of the cellular responses category were found to be upregulated in the fat body  
405 (Fig. 1C) and both encoded intracellular proteins that are probably not related to immunity in this tissue.  
406 All the 4 down-regulated putative cellular immunity-related genes were specifically modulated in the  
407 hemocytes (Fig. 1C). They encoded 2 Rho GTPase Activating Proteins (RhoGAP-like), a scavenger  
408 receptor similar to the *D. melanogaster* Croquemort receptor (SR-B3) and a homolog of the *D.*  
409 *melanogaster* integrin  $\alpha$ -PS1. In *D. melanogaster*, Croquemort has been shown to take part in

410 phagocytosis of apoptotic cells and of the Gram positive bacterium *Staphylococcus aureus* but not of the  
411 Gram negative bacterium *Escherichia coli* (Melcarne et al., 2019; Stuart et al., 2005). Integrin  $\alpha$ -PS1 is a  
412 ligand of the extracellular matrix protein laminin (Gotwals et al., 1994). It is involved in migration and  
413 differentiation of several cell types during development (Delon and Brown, 2009; Roote and Zusman,  
414 1996; Urbano et al., 2011) but does not seem to be required for any immune process. Their down-  
415 regulations are thus probably due to their uselessness in the context of the response to the NBC.

416 Overall, the results suggest that all types of cellular responses are transcriptionally induced at 15 hpi,  
417 including phagocytosis and nodulation, as well as encapsulation that would be adapted to the bacterial  
418 partner or the nematode, respectively. In addition, the induction of coagulation responses is particularly  
419 interesting, since many clotting factors participate in *D. melanogaster* resistance to infestation by another  
420 type of NBC, the *Heterorhabditis bacteriophora-Photorhabdus luminescens* association (Arefin et al.,  
421 2014; Hyrsl et al., 2011; Kucerova et al., 2016; Wang et al., 2010). Moreover, despite *S. carpocapsae*  
422 does not pierce the insects' cuticles as *H. bacteriophora* (Dowds and Peters, 2002), it has been shown to  
423 express at least two secreted proteases with inhibitory activities towards the formation of clot fibers and  
424 coagulation-associated pathogen trapping (Toubarro et al., 2013a; Toubarro et al., 2013b). Once again,  
425 the induction of such immune responses is consistent with the previous identification of several virulence  
426 factors of the NBC targeting cellular immunity (Balasubramanian et al., 2009; Balasubramanian et al.,  
427 2010; Brivio et al., 2018; Eom et al., 2014; Kim et al., 2005; Park and Kim, 2000; Park and Stanley,  
428 2006; Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2003; Toubarro et al., 2013a; Vigneux et al., 2007).

#### 429 **3.1.4. Diverse immunity-related genes**

430 A total of 29 modulated genes were involved in other diverse immune processes. They included 10 up- or  
431 down-regulated signaling genes, 7 upregulated recognition genes, 8 upregulated effector genes and 5  
432 upregulated genes of unknown functions that are known to be modulated after immune challenge (Fig.  
433 1D).

434 The signaling genes firstly encoded 2 insulin-like growth factor (IGF-II-like) and 2 insulin receptor  
435 substrate homologs (IRS1-like) (Fig. 1D). Insulin signaling is known to have a deleterious impact on the  
436 induction of systemic immune responses in the fat body of *D. melanogaster* (Lee and Lee, 2018) whereas  
437 insulin increases hemocyte proliferation in the hemolymph of mosquitoes (Castillo et al., 2011) as well as  
438 in the hematopoietic organs of the lepidopteran model *Bombyx mori* (Nakahara et al., 2006). In agreement  
439 with these assertions, we found that 2 of these genes were down-regulated in the fat body, but all 4 genes  
440 were upregulated in the hemocytes (Fig. 1D). Two other signaling genes were found to be specifically  
441 overexpressed in the hemocytes. The first one is a homolog of the *Litopenaeus vannamei* (Decapoda:  
442 Penaeidae) leucine-rich repeat flightless-I-interacting protein 2 (LRRFIP2-like) (Fig. 1D), which has been  
443 shown to upregulate AMP expression in *L. vannamei* as well as in *D. melanogaster* (Zhang et al., 2013).  
444 On the other hand, 3 signaling genes were found to be strictly down-regulated (Fig. 1D). Interestingly,

445 these genes included a member of the TGF- $\beta$  pathway (BAMBI-like) in the hemocytes and a member of  
446 the JNK pathway in the fat body (Basket), two pleiotropic pathways that are currently suspected to take a  
447 part in the *D. melanogaster* immune response to nematodes after NBC infestation (Eleftherianos et al.,  
448 2016; Ozakman and Eleftherianos, 2019; Patrnogic et al., 2018; Yadav et al., 2018). The third down-  
449 regulated gene was found in the fat body and encoded MASK, an inducer of the Jak/Stat pathway (Fisher  
450 et al., 2018). In the fat body, the Jak-Stat pathway has mainly been shown to induce the expression of  
451 cytokines (Pastor-Pareja et al., 2008) and of a putative opsonin belonging to the TEP family (Lagueux et  
452 al., 2000). Remarkably, several TEP genes have been shown to participate in antibacterial immunity after  
453 NBC infestation in *D. melanogaster* (Arefin et al., 2014; Shokal and Eleftherianos, 2017; Shokal et al.,  
454 2017; Shokal et al., 2018). All of these down-regulations could thus impair the insect's immune response  
455 to the NBC. However, more detailed analyses of their functions and modulations would be required to  
456 hypothesize immunosuppressive effects of the NBCs.

457 All 7 upregulated recognition genes encoded lectins (Fig. 1D). Five of them encoded C-type lectins  
458 (CLECT), which are known to be involved in binding of diverse pathogens (Xia et al., 2018), including  
459 bacteria and nematodes (Yu and Kanost, 2004). This binding can then stimulate several immune  
460 responses, such as bacterial aggregation, melanization, phagocytosis, nodulation and encapsulation (Xia  
461 et al., 2018). The 2 others encoded galectins, which are involved in diverse aspects of mammalian  
462 immunity, including pathogens binding (Baum et al., 2014), and are considered as relevant candidate  
463 immune proteins in insects (Pace and Baum, 2002). Despite a larger set of upregulated lectins was  
464 identified in the fat body, members of these protein families were found upregulated in the two tissues.

465 In the hemocytes, the upregulated effector genes firstly encoded a homolog of the superoxide dismutase  
466 (SOD-like), a conserved detoxifying enzyme involved in responses to reactive oxygen species (Wang et  
467 al., 2018) (Fig. 1D). The 7 remaining genes encoded proteins with similarity to insect metalloproteinase  
468 inhibitors (IMPI-like) (Fig. 1D), whose functions have only been studied in the lepidopteran model  
469 *Galleria mellonella*. The only characterized IMPI encodes two proteins of which one is probably  
470 involved in the regulation of extracellular matrix remodeling and the second specifically targets  
471 metalloproteinases from pathogens (Wedde et al., 1998; Wedde et al., 2007). *S. carpocapse* and *X.*  
472 *nematophila* both express several secreted serine proteases as well as metalloproteinases during the  
473 infectious process (Caldas et al., 2002; Chang et al., 2019; Dillman et al., 2015; Hao et al., 2010; Jing et  
474 al., 2010; Lu et al., 2017; Massaoud et al., 2011). The induction of such immune responses could interfere  
475 with some of these proteinases to impair the NBC's virulence and/or survival. Interestingly, all but one of  
476 these IMPI homologs were found to be specifically upregulated in the hemocytes, a tissue-specificity that  
477 had not been highlighted in previous reports (Griesch et al., 2000; Vertyporokh and Wojda, 2017).

478 Finally, the remaining genes of unknown function encoded Spod-x-tox, a protein without antimicrobial  
479 activity which contains tandem repeats of defensin-like motifs (Destoumieux-Garzon et al., 2009), 3

480 REPAT genes, which are known to be induced in the midgut after exposure to toxins, viruses and  
481 intestinal microbiota perturbations in the close species *S. exigua* (Herrero et al., 2007; Navarro-Cerrillo et  
482 al., 2012; Navarro-Cerrillo et al., 2013), and Hdd1, which is induced in response to bacteria and  
483 peptidoglycan in the lepidopteran models *Hyphantria cunea* and *Bombyx mori* (Shin et al., 1998; Zhang  
484 et al., 2017) (Fig. 1D).

485 In summary, we found an important additional mobilization of several relevant candidate immune genes,  
486 including mainly insulin signaling factors and IMPIs in the hemocytes and lectins in the fat body. In  
487 addition, these results suggest that the candidate immune pathways TGF- $\beta$ , JNK and Jak/Stat could be  
488 down-regulated. Such down-regulations are in disagreement with the results of Yadav and colleagues  
489 (Yadav et al., 2017) in *D. melanogaster* and thus would require further investigation.

### 490 **3.2. Temporal analysis of the induced immune responses**

491 In order to put the *S. frugiperda* immune responses in relation with the infectious process, we then  
492 described their temporal dynamics in each analyzed immunocompetent tissue. To this aim, we monitored  
493 with RT-qPCR experiments the induction levels of selected representative immune genes from 5 hpi, the  
494 mean time at which nematodes release *X. nematophila* in the hemocoel, to 20 hpi, which is about 9 hours  
495 before the first insect deaths (Supplementary Fig. 2).

496 In the hemocytes, the selected genes included 15 genes of the antimicrobial response, 2 genes involved in  
497 melanization, 5 cellular response genes, 2 lectins and one IMPI-like gene. At 5 hpi, only 2 genes,  
498 encoding a lebocin antibacterial (Yi et al., 2014) AMP (Lebocin 2) and the negative regulator Pirk of the  
499 Imd pathway (Kleino et al., 2008), were found to be significantly upregulated. However, most of the  
500 selected genes that are strongly induced at later time points also presented positive log<sub>2</sub> fold changes at  
501 this time point (Fig. 2A). From 10 to 20 hpi, all selected genes but few exceptions (*cecropin D*, *Tg-like*  
502 and *Integrin  $\beta$ -like*) due to biological variability were significantly upregulated at each time point (Fig.  
503 2A). Clustering analyses based on Pearson coefficients however revealed 3 distinct clusters of  
504 covariations. The first one contained 13 genes belonging to all the categories cited above and  
505 corresponded to very stable induction patterns (Fig. 2A). The second one, which contained 8 genes  
506 involved antimicrobial and cellular responses plus the selected C-type lectin (*CLECT (ccBV)*),  
507 corresponded to slightly increasing patterns (Fig. 2A). Finally, the third one, which contained the Relish  
508 and Pelle members of the Imd and Toll pathways (Ferrandon et al., 2007), an integrin and the DDC  
509 melanization enzyme (Huang et al., 2005) genes, corresponded to slightly decreasing patterns (Fig. 2A).

510 In the fat body, the selected genes included 15 genes of the antimicrobial response, 2 genes involved in  
511 melanization, one galectin gene (*Galectin 1*) and an IMPI-like gene (*IMPI-like 3*). At 5 hpi, all 7 selected  
512 AMPs, *PGRP-S1* and *Galectin 1* were found to be upregulated (Fig. 2B). All these genes were among the  
513 most strongly overexpressed at later time points. Such as in the hemocytes, most of the selected genes  
514 were then significantly upregulated from 10 to 20 hpi (Fig. 2B). In this tissue, the genes only subdivided



515 into two main covariation clusters: a cluster of genes with stable induction patterns and a cluster of genes  
516 with increasing induction patterns. The first cluster contained 10 genes of which 8 were involved in  
517 antimicrobial responses, one encoded a melanization-related serine protease (Snake-like 2) and one  
518 encoded the Galectin 1 (Fig. 2B). The second cluster contained 9 genes, of which 7 were involved in  
519 antimicrobial responses, one encoded the DDC melanization enzyme (Huang et al., 2005) and the last one  
520 encoded the IMPI-like 3 (Fig. 2B).

521 Altogether, the results obtained for the two tissues show that most of the transcriptional immune  
522 responses induced at 15 hpi take place between 0 and 10 hpi, which is comparable to timings observed in  
523 other interaction models (Boutros et al., 2002; Erler et al., 2011; Lemaitre et al., 1997). The results also  
524 indicate that these responses are globally stable across the time post-infestation despite some distinct gene  
525 induction patterns in each category of response. Interestingly, while we were hoping to discriminate  
526 between an early response, probably activated by the nematode presence, and a later response, probably  
527 reacting to bacterial growth, we did not find any clear link between the gene inductions' dynamics and  
528 the different immune processes and pathways that were represented in our selection.

### 529 **3.3. Evaluation of each NBC partner's part in the induced immune responses**

530 In order to identify each NBC partner's relative participation in the fat body's and hemocytes' immune  
531 responses, we used RT-qPCR to compare the induction levels of the selected immune genes after  
532 independent infections by the whole NBC, the axenic nematode or the bacterial symbiont. To this aim, we  
533 decided to use a more standardized protocol of direct injection of the pathogens into the hemocoel,  
534 thereby limiting putative side effects such as early hemocoel colonization by intestinal microorganisms.  
535 Importantly, we previously compared the kinetics of *X. nematophila* growth and of *S. frugiperda* survival  
536 after injection of the entire NBC and of 200 *X. nematophila* (Supplementary Fig. 3A,B). This comparison  
537 showed that both kinetics are very similar and thus that any difference of induction level between the 2  
538 conditions would not reflect differences in bacterial load or physiological state. However, the putative  
539 impact of axenization on the nematode's physiology could not be assessed by the same way due to  
540 technical limitations and to its avirulence in absence of its bacterial symbiont (Supplementary Fig. 3B,C).  
541 In the hemocytes, 14 genes presented higher induction levels in response to *X. nematophila* than in  
542 response to the axenic nematode (Fig. 3). In the antimicrobial category, they included the negative  
543 regulator *Pirk* of the Imd pathway (Kleino et al., 2008), all the selected attacin, cecropin, gloverin,  
544 lebocin and gallerimycin AMP genes, the 2 selected PGRP-S genes, and also probably the Imd pathway  
545 transcription factor *Relish* despite non-significant statistics (Ferrandon et al., 2007) (Fig. 3A). As  
546 indicated above, the Imd pathway, as well as the attacin, cecropin and gloverin AMP families, are known  
547 to take part in anti-Gram negative bacteria immune responses (Ferrandon, 2013; Yi et al., 2014). Their  
548 induction patterns thus indicate that the antimicrobial *X. nematophila*-induced responses are well adapted  
549 to the nature of the pathogen. Moreover, these results are in agreement with the study of Aymeric et al.

(2010) showing that the Imd pathway functions in the *D. melanogaster* immune response to *X. nematophila*. In the other categories, the *X. nematophila*-induced genes encoded the DDC melanization enzyme (Huang et al., 2005), the hemolin antibacterial opsonin (Eleftherianos et al., 2007), the IMPI-like 3, and also probably the selected integrin (Integrin  $\beta$ -like) (Fig. 3B-D). Once again, all of these genes are susceptible to play a part in an immune response to a pathogenic bacterium even though most of them could act on diverse types of invaders. Surprisingly, we found that *X. nematophila* strongly over-induces the transglutaminase (Tg-like) putative clotting factor gene (Lindgren et al., 2008) (Fig. 3C). This result could suggest that the bacterium is actually the main responsible for tissue damages at this time point and/or that *Tg-like* expression is induced in response to bacteria. Importantly, this result is in agreement with the study of Yadav and colleagues (Yadav et al., 2017), who showed that the *D. melanogaster* Fondue clotting factor was induced after infestation by the NBC but not after infestation by axenic nematodes. Remarkably, most of the genes that were mostly induced by *X. nematophila* presented higher induction values in response to the bacterium alone than in response to the whole NBC. However, this observation cannot be directly interpreted as an antagonistic effect of the nematode partner since it could be due to changes in the relative proportions of each hemocyte subtype, which would not necessarily reflect absolute variations in their numbers. In addition, the nematode partner specifically induced the overexpression of the selected C-type lectin (*CLECT (ccBV)*) and was probably the main inducer of the *Galectin 1*, the tetraspanin D76 homolog (*Tsp-like 3*) and the selected diapausin AMP (*Diapausin 5*) (Fig. 3A,C,D). As mentioned before, the *M. sexta* tetraspanin D76 is known to take part in encapsulation (Zhuang et al., 2007) and some lectins can bind nematodes and participate in melanization (Yu and Kanost, 2004) as well as in all types of cellular immune responses. Once again, their induction patterns are consistent with the nature of the pathogen, since both types of molecules could be involved in classical anti-nematode immune responses, such as cellular or melanotic encapsulation (Eleftherianos et al., 2017). Finally, 5 genes, encoding the Toll pathway members Pelle and Cactus (Ferrandon et al., 2007), the selected moricin AMP (Moricin 2), the melanization-related PPAE2 and the Krüppel-like transcription factor (Kr-like factor 1), were similarly induced by each of the three pathogens (Fig. 3A-C), suggesting that these responses are induced by the 2 partners without any additive effect.

In the fat body, statistical analysis of the results firstly revealed that the induction levels of *Pirk* as well as of the selected cecropin and gloverin AMP genes were significantly lower in response to the axenic nematode than in response to the NBC and to *X. nematophila* (Fig. 4A), suggesting the bacterial partner is the main responsible for their inductions. In addition, despite non-significant statistics, the results for the selected attacin AMPs, PGRP-S6 and GNB3 genes showed similar induction patterns (Fig. 4A). As for the hemocytes, the induction patterns of *Pirk* and of the attacin, cecropin and gloverin AMP genes suggest that the fat body's antimicrobial response to *X. nematophila* is well adapted to the type of pathogen that is met. On the contrary, the induction levels of the melanization-related serine protease

585 (*Snake-like 2*) was significantly lower in response to *X. nematophila* than in response to the NBC and to  
586 the axenic nematode (Fig. 4B), suggesting that the nematode partner is the main responsible for its  
587 induction. Similar induction patterns were obtained for the Toll pathway members *Toll* and *Cactus*  
588 (Ferrandon et al., 2007) as well as for *Galectin 1* (Fig. 4A,C). As mentioned for the hemocytes, the  
589 induction of lectins and melanization-related genes in response to the nematode is consistent with the  
590 nature of the pathogen since both could participate in classical anti-nematode immune responses  
591 (Eleftherianos et al., 2017). The induction of Toll pathway members is more difficult to relate with  
592 known anti-nematode immune responses and Yadav et al. (2018) found that the inactivation of this  
593 pathway does not impact the *D. melanogaster* survival to infestation by the whole NBC or by axenic *S.*  
594 *carpocapsae*. However, the involvement of this immune pathway in anti-nematode immune responses  
595 may depend on the downstream effectors and thus be variable between insect species. Finally, the other  
596 genes did not show any clear difference of induction level after injection of the 3 pathogens, except for  
597 the gallerimycin AMP, PGRP-S1 and the DDC melanization enzyme genes, which presented a lower  
598 induction when each NBC partner was injected alone (Fig. 4A,B). These results suggest synergistic  
599 effects of the nematode and of the bacterium on the induction of these genes.

600 In summary, we found in the 2 tissues that most of the selected genes presented partner-specific induction  
601 patterns, suggesting that the immune response to the NBC corresponds to combinations of responses  
602 induced by each partner. The detailed analysis of these genes indicates that *X. nematophila* is the main  
603 inducer of most of the selected genes, and especially of the well-known antibacterial ones. On the other  
604 hand, *S. carpocapsae* is the main inducer of some melanization and encapsulation-related genes and of  
605 the selected lectins, which could all take part in classical anti-nematode immune responses. The results  
606 thus globally suggest that the hemocytes and the fat body both respond appropriately to each NBC partner  
607 despite some yet unexplained results, such as an induction of Toll pathway members in the fat body by  
608 the nematode partner.

### 609 **3.4. Expression patterns of two new clusters of candidate immune genes**

610 During our first analysis of the RNAseq data, we identified 2 new clusters of candidate immune genes  
611 (Huot et al., 2019). The first one, named the Unknown (Unk) cluster, was localized close to *Tamozhennic*,  
612 a gene encoding a nuclear porin involved in the nucleation of Dorsal, the transcription factor of the Toll  
613 pathway (Minakhina et al., 2003). It contained 5 genes predicted to encode secreted peptides and short  
614 proteins that were all highly overexpressed in the midgut, fat body and hemocytes at 15 hpi and of which  
615 4 were the unique mobilized genes at 8 hpi in the fat body. The second cluster, named the Genes with  
616 Bacterial Homology (GBH) cluster, contained 3 genes located inside a defensin-like AMP genes cluster  
617 in the *S. frugiperda* genome. The 3 genes were predicted to encode secreted proteins similar to each other  
618 and one of them was also found highly induced at 15 hpi in the 3 tissues. The particularity of these genes  
619 is that homologs are found only in lepidopteran species as well as, intriguingly, in Gram positive bacteria.

620 Here, we reexamined the expression patterns of the *Unk* and *GBH* genes and found that the 5 *Unk* genes  
621 were mainly expressed in the fat body whereas 2 of the 3 *GBH* genes were mainly expressed and induced  
622 in the hemocytes (Supplementary Table 3).

623 In order to learn more about their putative functions, we decided to analyze, as we did for the known  
624 immune genes, their induction patterns across the time post-infestation and in response to each NBC  
625 partner in the corresponding tissues. In both cases, we found that the induction dynamics of the genes  
626 were very similar to those of immune genes, with an upregulation that becomes significant at 5 or 10 hpi  
627 and with globally stable induction patterns from 10 to 20 hpi (Fig. 5A,B).

628 In the case of the GBH cluster, the results that we got for the 2 NBC-responsive genes (*GBH1* and *GBH3*)  
629 in the hemocytes indicate that they are significantly less induced after axenic nematode injection than  
630 after NBC and *X. nematophila* injections, suggesting that the bacterium is the main responsible for their  
631 up-regulation (Fig. 5C). We could hypothesize an acquisition by horizontal gene transfer from bacteria of  
632 the *GBH* genes. In this case, their putative involvement in the antibacterial immune response would be  
633 particularly interesting, since bacterial genes hijacking for immune purpose has only been reported once  
634 in metazoans, in the tick *Ixodes scapularis* (Chou et al., 2015). Such a hypothesis however requires  
635 functional confirmation.

636 In the case of the *Unk* cluster, we found that the 4 most induced genes in the fat body (*Unk2* to 5) are all  
637 strongly and similarly induced by the NBC and by the axenic nematode whereas they are not induced by  
638 *X. nematophila* (Fig. 5D). The results are very similar for the least expressed *Unk* gene (*Unk1*), for which  
639 we only found a significant induction for the injection of axenic nematodes (Fig. 5D). This partner-  
640 specific induction pattern suggests that the *Unk* genes are involved in specific aspects of the insect  
641 responses to the infestation. In addition, the putative involvement of the *Unk* genes in the response to the  
642 nematode partner seems to be in agreement with their early mobilization during the infectious process and  
643 with their overexpression in the midgut (Huot et al., 2019), which is the entry site of the nematode. In our  
644 previous study, we had hypothesized the *Unk* genes may encode new types of immune effectors (Huot et  
645 al., 2019). However, given their low levels of conservation in species as close as *S. litura* or *S. littoralis*  
646 (Supplementary Fig. 4) another hypothesis would be that they correspond to regulatory long non-coding  
647 RNAs (Johnsson et al., 2014; Qu and Adelson, 2012). In both cases, the further functional  
648 characterization of these genes could be very promising given our current lack of knowledge of the  
649 immune pathways and molecular effectors of insect anti-nematode immunity.

## 650 **4. Conclusion**

651 Here, we provide a very deep and contextualized analysis of the *S. frugiperda*'s hemocytes' and fat  
652 body's transcriptional immune responses to infestation by the *S. carpocapsae-X. nematophila* NBC. Our  
653 topologic analysis of these responses at 15 hpi firstly confirmed the induction of very potent and

654 diversified immune responses towards the pathogen, such as suggested by our previous analysis of the  
655 transcriptomic data (Huot et al., 2019) as well as by the study of Yadav et al. (2017) in the *D.*  
656 *melanogaster* model. The present work now shows that these responses are very stable across the post-  
657 infestation time and that they correspond to combinations of *X. nematophila*- and *S. carpocapsae*-induced  
658 responses that seem to be well adapted to the nature of each partner (Figure 6).

659 Together with results obtained in other insect models, the pieces of information collected during these  
660 analyses are of great interest for the study of the dialogue that takes place between each NBC partner and  
661 *S. frugiperda*'s immune systems. First, our results strongly suggest that the NBC immunosuppressive  
662 strategies globally have a low impact on the induction of immune responses at the transcriptional level in  
663 *S. frugiperda*. They also indicate that the nematode and/or its effects on the host are detected by the  
664 insect's immune system that in return seems to induce appropriate immune responses towards the  
665 pathogen. Such observations could help to determine the limits and/or universality of previously  
666 described immunosuppressive and immunoevasive strategies of the NBC that have been described in  
667 other models. For example, they suggest that the suppressive effect of *X. nematophila* on the expression  
668 of AMP genes (Hwang et al., 2013; Ji and Kim, 2004; Park et al., 2007) as well as the camouflage  
669 strategy of *S. carpocapsae* (Binda-Rossetti et al., 2016; Mastore et al., 2015) are probably far from  
670 sufficient to explain their success towards the *S. frugiperda*'s immune system, which could also be true  
671 for other insect species. On the other hand, we found several unexplained down-regulations of signaling  
672 genes, such as of members of the Imd, JNK, TGF- $\beta$  and Jak-Stat pathways, that had never been reported  
673 before and which could open new working trails for the study of the molecular basis of the NBC's  
674 immunosuppressive strategies. Finally, this study allowed the identification of very large panels of  
675 candidate immune genes involved in all the main components of insect immunity as well as of some yet  
676 uncharacterized genes that could encode new immune factors involved in the response to NBCs, such as  
677 the *GBH* and the *Unk* genes, which are respectively specific to lepidopterans and to some noctuid species  
678 (Huot et al., 2019).

679 Continuing this work with more functional and mechanistic approaches is now required to get an accurate  
680 picture of the molecular dialogue between the NBC and the immune system. In the longer term, using  
681 such detailed and contextualized approaches on diverse insect species could help to identify the precise  
682 causes of immune systems' failure or success towards this NBC and thus the conditions that are required  
683 for an adequate use of this pathogen against insect pests.

## 684 **Acknowledgments**

685 We thank the quarantine insect platform (PIQ), member of the Vectopole Sud network, for providing the  
686 infrastructure needed for pest insect experimentations. We are also grateful to Clotilde Gibard, Raphaël  
687 Bousquet and Gaëtan Clabots for maintaining the insect collections of the DGIMI laboratory in

688 Montpellier. This work was supported by grants from the French Institut National de la Recherche  
689 Agronomique.

### 690 **Authors' contribution**

691 L.H., N.N. and B.D. conceived this study. N.N. and B.D. directed this study. L.H. and P.-A.G. performed  
692 the infestation experiments. L.H., P.-A.G. performed dissections. L.H. and A.B. extracted and purified the  
693 RNA. J.-C.O. designed the *X. nematophila* specific primers. S.P. produced the axenic nematodes and  
694 checked their axenization. L.H. and A.B. performed the qPCRs. L.H., N.N. and B.D. analysed the data.  
695 L.H. wrote the manuscript. L.H., N.N. and B.D. revised the manuscript. All authors have read and  
696 approved the manuscript.

### 697 **Additional Information**

698 **Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

- 700 Arefin, B., Kucerova, L., Dobes, P., Markus, R., Strnad, H., Wang, Z., Hyrsl, P., Zurovec, M., Theopold, U., 2014.  
701 Genome-wide transcriptional analysis of *Drosophila* larvae infected by entomopathogenic nematodes  
702 shows involvement of complement, recognition and extracellular matrix proteins. *J Innate Immun* 6, 192-  
703 204, 10.1159/000353734.
- 704 Aymeric, J.L., Givaudan, A., Duvic, B., 2010. Imd pathway is involved in the interaction of *Drosophila melanogaster*  
705 with the entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*. *Mol*  
706 *Immunol* 47, 2342-2348, 10.1016/j.molimm.2010.05.012.
- 707 Balasubramanian, N., Hao, Y.J., Toubarro, D., Nascimento, G., Simoes, N., 2009. Purification, biochemical and  
708 molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the  
709 entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Int J Parasitol* 39, 975-984,  
710 10.1016/j.ijpara.2009.01.012.
- 711 Balasubramanian, N., Toubarro, D., Simoes, N., 2010. Biochemical study and *in vitro* insect immune suppression  
712 by a trypsin-like secreted protease from the nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasite Immunol* 32,  
713 165-175, 10.1111/j.1365-3024.2009.01172.x.
- 714 Bao, Y.Y., Xue, J., Wu, W.J., Wang, Y., Lv, Z.Y., Zhang, C.X., 2011. An immune-induced Reeler protein is involved in  
715 the *Bombyx mori* melanization cascade. *Insect Biochem Mol Biol* 41, 696-706, 10.1016/j.ibmb.2011.05.001.
- 716 Barat-Houari, M., Hilliou, F., Jousset, F.X., Sofer, L., Deleury, E., Rocher, J., Ravallec, M., Galibert, L., Delobel, P.,  
717 Feyereisen, R., Fournier, P., Volkoff, A.N., 2006. Gene expression profiling of *Spodoptera frugiperda*  
718 hemocytes and fat body using cDNA microarray reveals polydnvirus-associated variations in lepidopteran  
719 host genes transcript levels. *BMC Genomics* 7, 10.1186/1471-2164-7-160.
- 720 Baum, L.G., Garner, O.B., Schaefer, K., Lee, B., 2014. Microbe-host interactions are positively and negatively  
721 regulated by galectin glycan interactions. *Front Immunol* 5, 10.3389/Fimmu.2014.00284.
- 722 Binda-Rossetti, S., Mastore, M., Protasoni, M., Brivio, M.F., 2016. Effects of an entomopathogen nematode on the  
723 immune response of the insect pest red palm weevil: Focus on the host antimicrobial response. *J Invertebr*  
724 *Pathol* 133, 110-119, 10.1016/j.jip.2015.11.001.
- 725 Boemare, N., Thaler, J.O., Lanois, A., 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of  
726 *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. *Symbiosis* 22, 167-175.
- 727 Bonnay, F., Nguyen, X.H., Cohen-Berros, E., Troxler, L., Batsche, E., Camonis, J., Takeuchi, O., Reichhart, J.M.,  
728 Matt, N., 2014. Akirin specifies NF- $\kappa$ B selectivity of *Drosophila* innate immune response via chromatin  
729 remodeling. *EMBO J* 33, 2349-2362, 10.15252/embj.201488456.
- 730 Boutros, M., Agaisse, H., Perrimon, N., 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune  
731 responses in *Drosophila*. *Dev Cell* 3, 711-722, 10.1016/S1534-5807(02)00325-8.
- 732 Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat*  
733 *Biotechnol* 34, 525-527, 10.1038/nbt.3519.
- 734 Brey, P.T., Lee, W.J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M., Ashida, M., 1993. Role of the integument  
735 in insect immunity - Epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial-cells.  
736 *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6275-6279, 10.1073/pnas.90.13.6275.
- 737 Brivio, M.F., Toscano, A., De Pasquale, S.M., Barbaro, A.D., Giovannardi, S., Finzi, G., Mastore, M., 2018. Surface  
738 protein components from entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: effects on immune  
739 responses of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Manag Sci* 74, 2089-  
740 2099, 10.1002/ps.4905.
- 741 Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A., Simoes, N., 2002. Purification and characterization of an extracellular protease  
742 from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Appl Environ Microbiol* 68, 1297-  
743 1304, 10.1128/Aem.68.3.1297-1304.2002.
- 744 Cambon, M., Lafont, P., Frayssinet, M., Lanois, A., Ogier, J.C., Pagès, S., Parthuisot, N., Ferdy, J.B., Gaudriault, S.,  
745 2020. Bacterial community profile after the lethal infection of *Steinernema-Xenorhabdus* pairs into soil-  
746 reared *Tenebrio molitor* larvae. *FEMS Microbiol Ecol*, 10.1093/femsec/fiaa009.
- 747 Cao, X., He, Y., Hu, Y., Wang, Y., Chen, Y.R., Bryant, B., Clem, R.J., Schwartz, L.M., Blissard, G., Jiang, H., 2015. The  
748 immune signaling pathways of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol* 62, 64-74,  
749 10.1016/j.ibmb.2015.03.006.
- 750 Castillo, J., Brown, M.R., Strand, M.R., 2011. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of  
751 hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 7, e1002274, 10.1371/journal.ppat.1002274.

- 752 Chang, D.Z., Serra, L., Lu, D., Mortazavi, A., Dillman, A.R., 2019. A core set of venom proteins is released by  
753 entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema*. PLoS Pathog 15, e1007626,  
754 10.1371/journal.ppat.1007626.
- 755 Chen, T.T., Tan, L.R., Hu, N., Dong, Z.Q., Hu, Z.G., Jiang, Y.M., Chen, P., Pan, M.H., Lu, C., 2018. C-lysozyme  
756 contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection. J Insect Physiol  
757 108, 54-60, 10.1016/j.jinsphys.2018.05.005.
- 758 Chou, S., Daugherty, M.D., Peterson, S.B., Biboy, J., Yang, Y.Y., Jutras, B.L., Fritz-Laylin, L.K., Ferrin, M.A., Harding,  
759 B.N., Jacobs-Wagner, C., Yang, X.F., Vollmer, W., Malik, H.S., Mougous, J.D., 2015. Transferred interbacterial  
760 antagonism genes augment eukaryotic innate immune function. Nature 518, 98-101,  
761 10.1038/nature13965.
- 762 Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for  
763 annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21, 3674-3676,  
764 10.1093/bioinformatics/bti610.
- 765 Crawford, J.M., Portmann, C., Zhang, X., Roeffaers, M.B.J., Clardy, J., 2012. Small molecule perimeter defense in  
766 entomopathogenic bacteria. Proc Natl Acad Sci USA 109, 10821-10826, 10.1073/pnas.1201160109.
- 767 De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune  
768 response by using oligonucleotide microarrays. Proc Natl Acad Sci USA 98, 12590-12595,  
769 10.1073/pnas.221458698.
- 770 Delon, I., Brown, N.H., 2009. The integrin adhesion complex changes its composition and function during  
771 morphogenesis of an epithelium. J Cell Sci 122, 4363-4374, 10.1242/jcs.055996.
- 772 Destoumieux-Garzon, D., Brehelin, M., Bulet, P., Boublik, Y., Girard, P.A., Baghdigui, S., Zumbihl, R., Escoubas,  
773 J.M., 2009. *Spodoptera frugiperda* X-tox protein, an immune related defensin rosary, has lost the function  
774 of ancestral defensins. PLoS One 4, e6795, 10.1371/journal.pone.0006795.
- 775 Dillman, A.R., Macchietto, M., Porter, C.F., Rogers, A., Williams, B., Antosheckkin, I., Lee, M.M., Goodwin, Z., Lu,  
776 X.J., Lewis, E.E., Goodrich-Blair, H., Stock, S.P., Adams, B.J., Sternberg, P.W., Mortazavi, A., 2015.  
777 Comparative genomics of *Steinernema* reveals deeply conserved gene regulatory networks. Genome Biol  
778 16, 10.1186/s13059-015-0746-6.
- 779 Dowds, B.C.A., Peters, A., 2002. Virulence Mechanisms, in Entomopathogenic Nematology, Gaugler, R. (Ed.). CABI  
780 Publishing, pp. 79-93.
- 781 Duvic, B., Jouan, V., Essa, N., Girard, P.A., Pages, S., Khattar, Z.A., Volkoff, N.A., Givaudan, A., Destoumieux-  
782 Garzon, D., Escoubas, J.M., 2012. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression  
783 during entomopathogenic bacterial challenge. J Insect Physiol 58, 881-888, 10.1016/j.jinsphys.2012.04.001.
- 784 Eleftherianos, I., Castillo, J.C., Patrnoic, J., 2016. TGF- $\beta$  signaling regulates resistance to parasitic nematode  
785 infection in *Drosophila melanogaster*. Immunobiology 221, 1362-1368, 10.1016/j.imbio.2016.07.011.
- 786 Eleftherianos, I., Gokcen, F., Felfoldi, G., Millichap, P.J., Trenczek, T.E., ffrench-Constant, R.H., Reynolds, S.E.,  
787 2007. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the  
788 insect *Manduca sexta*. Cell Microbiol 9, 1137-1147, 10.1111/j.1462-5822.2006.00855.x.
- 789 Eleftherianos, I., Shokal, U., Yadav, S., Kenney, E., Maldonado, T., 2017. Insect immunity to entomopathogenic  
790 nematodes and their mutualistic bacteria. Curr Top Microbiol Immunol 402, 123-156,  
791 10.1007/82\_2016\_52.
- 792 Eom, S., Park, Y., Kim, Y., 2014. Sequential immunosuppressive activities of bacterial secondary metabolites from  
793 the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. J Microbiol 52, 161-168, 10.1007/s12275-014-  
794 3251-9.
- 795 Erler, S., Popp, M., Lattorff, H.M.G., 2011. Dynamics of immune system gene expression upon bacterial challenge  
796 and wounding in a social insect (*Bombus terrestris*). PLoS One 6, e18126, 10.1371/journal.pone.0018126.
- 797 Ferrandon, D., 2013. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism  
798 *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. Curr Opin Immunol 25, 59-70,  
799 10.1016/j.coi.2012.11.008.
- 800 Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and  
801 signalling during bacterial and fungal infections. Nat Rev Immunol 7, 862-874, 10.1038/nri2194.
- 802 Fichelson, P., Brigui, A., Pichaud, F., 2012. Orthodenticle and Krüppel homolog 1 regulate *Drosophila*  
803 photoreceptor maturation. Proc Natl Acad Sci USA 109, 7893-7898, 10.1073/pnas.1120276109.



804 Fisher, K.H., Fragiadaki, M., Pugazhendhi, D., Bausek, N., Arredondo, M.A., Thomas, S.J., Brown, S., Zeidler, M.P.,  
805 2018. A genome-wide RNAi screen identifies MASK as a positive regulator of cytokine receptor stability. *J*  
806 *Cell Sci* 131, 10.1242/jcs.209551.

807 Foley, E., O'Farrell, P.H., 2004. Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi  
808 screen. *PLoS Biol* 2, 1091-1106, 10.1371/journal.pbio.0020203.

809 Forst, S., Clarke, D., 2002. Bacteria-nematode symbiosis, in *Entomopathogenic Nematology*, Gaugler, R. (Ed.).  
810 CABI Publishing, pp. 57-78.

811 Galko, M.J., Krasnow, M.A., 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* 2,  
812 1114-1126, 10.1371/journal.pbio.0020239.

813 Gandhe, A.S., Janardhan, G., Nagaraju, J., 2007. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from  
814 silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol* 37,  
815 655-666, 10.1016/j.ibmb.2007.03.013.

816 Ganger, M.T., Dietz, G.D., Ewing, S.J., 2017. A common base method for analysis of qPCR data and the application  
817 of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics* 18, 534, 10.1186/s12859-017-1949-5.

818 Gotwals, P.J., Fessler, L.I., Wehrli, M., Hynes, R.O., 1994. *Drosophila* PS1 integrin is a laminin receptor and differs  
819 in ligand specificity from PS2. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 11447-11451, 10.1073/pnas.91.24.11447.

820 Gotz, P., Boman, A., Boman, H.G., 1981. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic  
821 nematode with symbiotic bacteria. *Proc R Soc B* 212, 333-350, 10.1098/rspb.1981.0043.

822 Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.M., Duvic, B., Hilliou, F., Durand, N., Montagne, N.,  
823 Darboux, I., Kuwar, S., Chertemps, T., Siaussat, D., Bretschneider, A., Mone, Y., Ahn, S.J., Hanniger, S.,  
824 Grenet, A.S.G., Neunemann, D., Maumus, F., Luyten, I., Labadie, K., Xu, W., Koutroumpa, F., Escoubas, J.M.,  
825 Llopis, A., Maibeche-Coisne, M., Salasc, F., Tomar, A., Anderson, A.R., Khan, S.A., Dumas, P., Orsucci, M.,  
826 Guy, J., Belser, C., Alberti, A., Noel, B., Couloux, A., Mercier, J., Nidelet, S., Dubois, E., Liu, N.Y., Boulogne, I.,  
827 Mirabeau, O., Le Goff, G., Gordon, K., Oakeshott, J., Consoli, F.L., Volkoff, A.N., Fescemyer, H.W., Marden,  
828 J.H., Luthe, D.S., Herrero, S., Heckel, D.G., Wincker, P., Kergoat, G.J., Amselem, J., Quesneville, H., Groot,  
829 A.T., Jacquin-Joly, E., Negre, N., Lemaitre, C., Legeai, F., d'Alencon, E., Fournier, P., 2017. Two genomes of  
830 highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant  
831 ranges. *Sci Rep* 7, 11816, 10.1038/S41598-017-10461-4.

832 Griesch, J., Wedde, M., Vilcinskas, A., 2000. Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the  
833 haemolymph of *Galleria mellonella*: a new pathway mediating induction of humoral immune responses.  
834 *Insect Biochem Mol Biol* 30, 461-472, 10.1016/S0965-1748(00)00010-2.

835 Ha, E.M., Lee, K.A., Park, S.H., Kim, S.H., Nam, H.J., Lee, H.Y., Kang, D., Lee, W.J., 2009. Regulation of DUOX by the  
836  $G\alpha_q$ -phospholipase  $C\beta$ - $Ca^{2+}$  pathway in *Drosophila* gut immunity. *Dev Cell* 16, 386-397,  
837 10.1016/j.devcel.2008.12.015.

838 Hao, Y.J., Montiel, R., Abubucker, S., Mitreva, M., Simoes, N., 2010. Transcripts analysis of the entomopathogenic  
839 nematode *Steinernema carpocapsae* induced *in vitro* with insect haemolymph. *Mol Biochem Parasit* 169,  
840 79-86, 10.1016/j.molbiopara.2009.10.002.

841 Harbecke, R., Janning, W., 1989. The segmentation gene Krüppel of *Drosophila melanogaster* has homeotic  
842 properties. *Gene Dev* 3, 114-122, 10.1101/Gad.3.1.114.

843 Hemler, M.E., 2008. Targeting of tetraspanin proteins - potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* 7,  
844 747-758, 10.1038/nrd2659.

845 Herrero, S., Ansems, M., Van Oers, M.M., Vlak, J.M., Bakker, P.L., de Maagd, R.A., 2007. REPAT, a new family of  
846 proteins induced by bacterial toxins and baculovirus infection in *Spodoptera exigua*. *Insect Biochem Mol*  
847 *Biol* 37, 1109-1118, 10.1016/j.ibmb.2007.06.007.

848 Hoch, M., Jackle, H., 1998. Krüppel acts as a developmental switch gene that mediates Notch signalling-  
849 dependent tip cell differentiation in the excretory organs of *Drosophila*. *EMBO J* 17, 5766-5775,  
850 10.1093/emboj/17.19.5766.

851 Huang, C.Y., Chou, S.Y., Bartholomay, L.C., Christensen, B.M., Chen, C.C., 2005. The use of gene silencing to study  
852 the role of dopa decarboxylase in mosquito melanization reactions. *Insect Mol Biol* 14, 237-244,  
853 10.1111/j.1365-2583.2004.00552.x.

854 Huot, L., George, S., Girard, P.A., Severac, D., Negre, N., Duvic, B., 2019. *Spodoptera frugiperda* transcriptional  
855 response to infestation by *Steinernema carpocapsae*. *Sci Rep* 9, 12879, 10.1038/s41598-019-49410-8.

- 856 Hwang, J., Park, Y., Kim, Y., Hwang, J., Lee, D., 2013. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*,  
857 suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and Imd pathways by blocking  
858 eicosanoid biosynthesis. Arch Insect Biochem Physiol 83, 151-169, 10.1002/arch.21103.
- 859 Hyrsi, P., Dobes, P., Wang, Z., Hauling, T., Wilhelmsson, C., Theopold, U., 2011. Clotting factors and eicosanoids  
860 protect against nematode infections. J Innate Immun 3, 65-70, 10.1159/000320634.
- 861 Issa, N., Guillaumot, N., Lauret, E., Matt, N., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Reichhart, J.M., Veillard, F.,  
862 2018. The circulating protease Persephone is an immune sensor for microbial proteolytic activities  
863 upstream of the *Drosophila* Toll pathway. Mol Cell 69, 539-550, 10.1016/j.molcel.2018.01.029.
- 864 Ivy, J.R., Drechsler, M., Catterson, J.H., Bodmer, R., Ocorr, K., Paululat, A., Hartley, P.S., 2015. Klf15 is critical for  
865 the development and differentiation of *Drosophila* nephrocytes. PLoS One 10, e0134620,  
866 10.1371/journal.pone.0134620.
- 867 Ji, D.J., Kim, Y., 2004. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an  
868 antibacterial peptide, cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. J Insect Physiol 50, 489-496,  
869 10.1016/j.jinsphys.2004.03.005.
- 870 Jing, Y.J., Toubarro, D., Hao, Y.J., Simoes, N., 2010. Cloning, characterisation and heterologous expression of an  
871 astacin metalloprotease, Sc-AST, from the entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. Mol  
872 Biochem Parasit 174, 101-108, 10.1016/j.molbiopara.2010.07.004.
- 873 Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Soderhall, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis,  
874 coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology 211, 213-236, 10.1016/j.imbio.2005.10.015.
- 875 Johnsson, P., Lipovich, L., Grander, D., Morris, K.V., 2014. Evolutionary conservation of long non-coding RNAs:  
876 Sequence, structure, function. Biochim Biophys Acta Gen Subj 1840, 1063-1071,  
877 10.1016/j.bbagen.2013.10.035.
- 878 Kim, Y., Ji, D., Cho, S., Park, Y., 2005. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*,  
879 share an inhibitory action against phospholipase A<sub>2</sub> to induce host immunodepression. J Invertebr Pathol  
880 89, 258-264, 10.1016/j.jip.2005.05.001.
- 881 Kleino, A., Myllymaki, H., Kallio, J., Vanha-aho, L.M., Oksanen, K., Ulvila, J., Hultmark, D., Valanne, S., Ramet, M.,  
882 2008. Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. J Immunol 180, 5413-5422,  
883 10.4049/jimmunol.180.8.5413.
- 884 Korayem, A.M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., Ueda, R., Dushay, M.S.,  
885 Theopold, U., 2004. A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a  
886 function in coagulation and the entrapment of bacteria. Insect Biochem Mol Biol 34, 1297-1304,  
887 10.1016/j.ibmb.2004.09.001.
- 888 Kristensen, N., Chauvin, G., 2012. Lepidoptera, moths and butterflies: Morphology, physiology, and development.  
889 Integument, in Handbook of Zoology, De Gruyter, W. (Ed.). Berlin: De Gruyter, pp. 1-8.
- 890 Kucerova, L., Broz, V., Arefin, B., Maaroufi, H.O., Hurychova, J., Strnad, H., Zurovec, M., Theopold, U., 2016. The  
891 *Drosophila* chitinase-like protein IDGF3 is involved in protection against nematodes and in wound healing. J  
892 Innate Immun 8, 199-210, 10.1159/000442351.
- 893 Labaude, S., Griffin, C.T., 2018. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control.  
894 Insects 9, E72, 10.3390/insects9020072.
- 895 Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as  
896 biological control agents: Back to the future. J Invertebr Pathol 132, 1-41, 10.1016/j.jip.2015.07.009.
- 897 Lagueux, M., Perrodou, E., Levashina, E.A., Capovilla, M., Hoffmann, J.A., 2000. Constitutive expression of a  
898 complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 97,  
899 11427-11432, 10.1073/pnas.97.21.11427.
- 900 Lee, K.A., Lee, W.J., 2018. Immune-metabolic interactions during systemic and enteric infection in *Drosophila*.  
901 Curr Opin Insect Sci 29, 21-26, 10.1016/j.cois.2018.05.014.
- 902 Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. Annu Rev Entomol 42, 525-550,  
903 10.1146/annurev.ento.42.1.525.
- 904 Lemaitre, B., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of  
905 antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 94,  
906 14614-14619, 10.1073/pnas.94.26.14614.
- 907 Levin, D.M., Breuer, L.N., Zhuang, S.F., Anderson, S.A., Nardi, J.B., Kanost, M.R., 2005. A hemocyte-specific  
908 integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem  
909 Mol Biol 35, 369-380, 10.1016/j.ibmb.2005.01.003.

- 910 Li, X.Y., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Gaugler, R., Cox-Foster, D.L., 2007. Relationship between the successful  
911 infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int J Parasitol* 37, 365-374,  
912 10.1016/j.ijpara.2006.08.009.
- 913 Lindgren, M., Riazi, R., Lesch, C., Willielinsson, C., Theopold, U., Dushay, M.S., 2008. Fondue and transglutaminase  
914 in the *Drosophila* larval clot. *J Insect Physiol* 54, 586-592, 10.1016/j.jinsphys.2007.12.008.
- 915 Lu, D., Macchietto, M., Chang, D., Barros, M.M., Baldwin, J., Mortazavi, A., Dillman, A.R., 2017. Activated  
916 entomopathogenic nematode infective juveniles release lethal venom proteins. *PLoS Pathog* 13, e1006302,  
917 10.1371/journal.ppat.1006302.
- 918 Massaoud, M.K., Marokhazi, J., Venekei, I., 2011. Enzymatic characterization of a serralsin-like metalloprotease  
919 from the entomopathogen bacterium, *Xenorhabdus*. *Biochim Biophys Acta-Proteins Proteom* 1814, 1333-  
920 1339, 10.1016/j.bbapap.2011.05.008.
- 921 Mastore, M., Arizza, V., Manachini, B., Brivio, M.F., 2015. Modulation of immune responses of *Rhynchophorus*  
922 *ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*  
923 (Nematoda: Rhabditida). *Insect Sci* 22, 748-760, 10.1111/1744-7917.12141.
- 924 Melcarne, C., Lemaitre, B., Kurant, E., 2019. Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to  
925 physiology. *Insect Biochem Mol Biol* 109, 1-12, 10.1016/j.ibmb.2019.04.002.
- 926 Minakhina, S., Yang, J., Steward, R., 2003. Tamo selectively modulates nuclear import in *Drosophila*. *Genes Cells* 8,  
927 299-310, 10.1046/j.1365-2443.2002.00634.x.
- 928 Myllymaki, H., Valanne, S., Ramet, M., 2014. The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J Immunol* 192, 3455-3462,  
929 10.4049/jimmunol.1303309.
- 930 Nakahara, Y., Matsumoto, H., Kanamori, Y., Kataoka, H., Mizoguchi, A., Kiuchi, M., Kamimura, M., 2006. Insulin  
931 signaling is involved in hematopoietic regulation in an insect hematopoietic organ. *J Insect Physiol* 52, 105-  
932 111, 10.1016/j.jinsphys.2005.09.009.
- 933 Nakhleh, J., El Moussawi, L., Osta, M.A., 2017. Chapter 3 - The melanization response in insect immunity, in  
934 *Advances in Insect Physiology*, Ligoxygakis, P. (Ed.). Academic Press, pp. 83-109.
- 935 Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect  
936 innate immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 443-459, 10.1016/j.ibmb.2005.01.014.
- 937 Navarro-Cerrillo, G., Ferre, J., de Maagd, R.A., Herrero, S., 2012. Functional interactions between members of the  
938 REPAT family of insect pathogen-induced proteins. *Insect Mol Biol* 21, 335-342, 10.1111/j.1365-  
939 2583.2012.01139.x.
- 940 Navarro-Cerrillo, G., Hernandez-Martinez, P., Vogel, H., Ferre, J., Herrero, S., 2013. A new gene superfamily of  
941 pathogen-response (repat) genes in *Lepidoptera*: classification and expression analysis. *Comp Biochem*  
942 *Physiol B-Biochem Physiol* 164, 10-17, 10.1016/j.cbpb.2012.09.004.
- 943 Nazario-Toole, A.E., Wu, L.P., 2017. Phagocytosis in insect immunity, in *Advances in Insect Physiology*, Volume 52,  
944 Ligoxygakis, P. (Ed.). Kruze, K., pp. 35-73.
- 945 Ozakman, Y., Eleftherianos, I., 2019. TGF- $\beta$  signaling interferes with the *Drosophila* innate immune and metabolic  
946 response to parasitic nematode infection. *Front Physiol* 10, 10.3389/Fphys.2019.00716.
- 947 Pace, K.E., Baum, L.G., 2002. Insect galectins: Roles in immunity and development. *Glycoconjugate J* 19, 607-614,  
948 10.1023/B:Glyc.0000014092.86763.2f.
- 949 Park, Y., Herbert, E.E., Cowles, C.E., Cowles, K.N., Menard, M.L., Orchard, S.S., Goodrich-Blair, H., 2007. Clonal  
950 variation in *Xenorhabdus nematophila* virulence and suppression of *Manduca sexta* immunity. *Cell*  
951 *Microbiol* 9, 645-656, 10.1111/j.1462-5822.2006.00815.x.
- 952 Park, Y., Kim, Y., 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the  
953 symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Insect Physiol* 46,  
954 1469-1476, 10.1016/S0022-1910(00)00071-8.
- 955 Park, Y., Stanley, D., 2006. The entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, impairs hemocytic  
956 immunity by inhibition of eicosanoid biosynthesis in adult crickets, *Gryllus firmus*. *Biol Control* 38, 247-253,  
957 10.1016/j.biocontrol.2005.11.002.
- 958 Pastor-Pareja, J.C., Wu, M., Xu, T., 2008. An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage  
959 in *Drosophila*. *Dis Model Mech* 1, 144-154, 10.1242/dmm.000950.
- 960 Patnogie, J., Heryanto, C., Eleftherianos, I., 2018. Wounding-induced upregulation of the Bone Morphogenic  
961 Protein signaling pathway in *Drosophila* promotes survival against parasitic nematode infection. *Gene* 673,  
962 112-118, 10.1016/j.gene.2018.06.052.

963 Pimentel, H., Bray, N.L., Puente, S., Melsted, P., Pachter, L., 2017. Differential analysis of RNA-seq incorporating  
964 quantification uncertainty. *Nat Methods* 14, 687-690, 10.1038/nmeth.4324.

965 Poinar, G.O., Grewal, P.S., 2012. History of entomopathogenic nematology. *J Nematol* 44, 153-161.

966 Poitout, S., Buès, R., 1970. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et  
967 sur milieu artificiel simplifié. *Ann Zool Ecol Anim* 2, 79-91.

968 Qiao, C., Li, J., Wei, X.H., Wang, J.L., Wang, Y.F., Liu, X.S., 2014. SRP gene is required for *Helicoverpa armigera*  
969 prophenoloxidase activation and nodulation response. *Dev Comp Immunol* 44, 94-99,  
970 10.1016/j.dci.2013.11.016.

971 Qu, Z.P., Adelson, D.L., 2012. Identification and comparative analysis of ncRNAs in human, mouse and zebrafish  
972 Indicate a conserved role in regulation of genes expressed in brain. *PLoS One* 7, e52275,  
973 10.1371/journal.pone.0052275.

974 R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical  
975 Computing, Vienna, Austria, URL <https://www.R-project.org/>.

976 Ribeiro, C., Duvic, B., Oliveira, P., Givaudan, A., Palha, F., Simoes, N., Brehelin, M., 1999. Insect immunity - effects  
977 of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. *J Insect Physiol* 45, 677-685,  
978 10.1016/S0022-1910(99)00043-8.

979 Ribeiro, C., Vignes, M., Brehelin, M., 2003. *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) secretes a cation-  
980 selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough endoplasmic reticulum and cell  
981 lysis. *J Biol Chem* 278, 3030-3039, 10.1074/jbc.M210353200.

982 Roote, C.E., Zusman, S., 1996. Alternatively spliced forms of the *Drosophila*  $\alpha$ PS2 subunit of integrin are sufficient  
983 for viability and can replace the function of the  $\alpha$ PS1 subunit of integrin in the retina. *Development* 122,  
984 1985-1994.

985 Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A., 1978. Histological study of wound-healing and hemocyte function in wax moth  
986 *Galleria mellonella*. *J Morphol* 157, 181-199, 10.1002/jmor.1051570206.

987 Satyavathi, V.V., Mohamed, A.A., Kumari, S., Mamatha, D.M., Duvic, B., 2018. The IMD pathway regulates  
988 lysozyme-like proteins (LLPs) in the silkworm *Antheraea mylitta*. *J Invertebr Pathol* 154, 102-108,  
989 10.1016/j.jip.2018.04.006.

990 Schmucker, D., Taubert, H., Jackle, H., 1992. Formation of the *Drosophila* larval photoreceptor organ and its  
991 neuronal differentiation require continuous Krüppel gene activity. *Neuron* 9, 1025-1039, 10.1016/0896-  
992 6273(92)90063-J.

993 Shin, S.W., Park, S.S., Park, D.S., Kim, M.G., Kim, S.C., Brey, P.T., Park, H.Y., 1998. Isolation and characterization of  
994 immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and  
995 subtractive cloning. *Insect Biochem Mol Biol* 28, 827-837.

996 Shokal, U., Eleftherianos, I., 2017. The *Drosophila* Thioester containing Protein-4 participates in the induction of  
997 the cellular immune response to the pathogen *Photobacterium*. *Dev Comp Immunol* 76, 200-208,  
998 10.1016/j.dci.2017.06.008.

999 Shokal, U., Kopydlowski, H., Eleftherianos, I., 2017. The distinct function of Tep2 and Tep6 in the immune defense  
1000 of *Drosophila melanogaster* against the pathogen *Photobacterium*. *Virulence* 8, 1668-1682,  
1001 10.1080/21505594.2017.1330240.

1002 Shokal, U., Kopydlowski, H., Harsh, S., Eleftherianos, I., 2018. Thioester-containing proteins 2 and 4 affect the  
1003 metabolic activity and inflammation response in *Drosophila*. *Infect Immun* 86, 10.1128/IAI.00810-17.

1004 Sicard, M., Brugirard-Ricaud, K., Pages, S., Lanois, A., Boemare, N.E., Brehelin, M., Givaudan, A., 2004. Stages of  
1005 infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and  
1006 insect hosts. *Appl Environ Microbiol* 70, 6473-6480, 10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004.

1007 Sowa-Jasilek, A., Zdybicka-Barabas, A., Staczek, S., Wydrych, J., Mak, P., Jakubowicz, T., Cytrynska, M., 2014.  
1008 Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme.  
1009 *Peptides* 53, 194-201, 10.1016/j.peptides.2014.01.012.

1010 Stofanko, M., Kwon, S.Y., Badenhorst, P., 2008. A misexpression screen to identify regulators of *Drosophila* larval  
1011 hemocyte development. *Genetics* 180, 253-267, 10.1534/genetics.108.089094.

1012 Strand, M.R., 2008. The insect cellular immune response. *Insect Sci* 15, 1-14, 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x.

1013 Stuart, L.M., Deng, J.S., Silver, J.M., Takahashi, K., Tseng, A.A., Hennessy, E.J., Ezekowitz, R.A.B., Moore, K.J., 2005.  
1014 Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal  
1015 cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 170, 477-485, 10.1083/jcb.200501113.

1016 Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N., Boemare, N., 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*,  
1017 including the description of ten novel species. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2805-2818, 10.1099/ij.s.0.64287-  
1018 0.

1019 Tang, H.P., 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly* 3, 105-111,  
1020 10.4161/Fly.3.1.7747.

1021 Thurston, G.S., Yule, W.N., Dunphy, G.B., 1994. Explanations for the low susceptibility of *Leptinotarsa*  
1022 *decehlineata* to *Steinernema carpocapsae*. *Biol Control* 4, 53-58, 10.1006/bcon.1994.1010.

1023 Tingvall, T.O., Roos, E., Engstrom, Y., 2001. The Imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila*  
1024 barrier epithelia. *EMBO Rep* 2, 239-243.

1025 Toubarro, D., Avila, M.M., Hao, Y.J., Balasubramanian, N., Jing, Y.J., Montiel, R., Faria, T.Q., Brito, R.M., Simoes, N.,  
1026 2013a. A serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *PLoS One*  
1027 8, e69161, 10.1371/journal.pone.0069161.

1028 Toubarro, D., Avila, M.M., Montiel, R., Simoes, N., 2013b. A pathogenic nematode targets recognition proteins to  
1029 avoid insect defenses. *PLoS One* 8, e75691, 10.1371/journal.pone.0075691.

1030 Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.L., 2000.  
1031 Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia.  
1032 *Immunity* 13, 737-748, 10.1016/S1074-7613(00)00072-8.

1033 Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new  
1034 capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40, e115, 10.1093/nar/gks596.

1035 Urbano, J.M., Dominguez-Gimenez, P., Estrada, B., Martin-Bermudo, M.D., 2011. PS integrins and laminins: Key  
1036 regulators of cell migration during *Drosophila* embryogenesis. *PLoS One* 6, e23893,  
1037 10.1371/journal.pone.0023893.

1038 Valanne, S., Wang, J.H., Ramet, M., 2011. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *J Immunol* 186, 649-656,  
1039 10.4049/jimmunol.1002302.

1040 van Sambeek, J., Wiesner, A., 1999. Successful parasitism of locusts by entomopathogenic nematodes is  
1041 correlated with inhibition of insect phagocytes. *J Invertebr Pathol* 73, 154-161, 10.1006/jipa.1998.4823.

1042 Veillard, F., Troxler, L., Reichhart, J.M., 2016. *Drosophila melanogaster* clip-domain serine proteases: Structure,  
1043 function and regulation. *Biochimie* 122, 255-269, 10.1016/j.biochi.2015.10.007.

1044 Vertyporokh, L., Wojda, I., 2017. Expression of the insect metalloproteinase inhibitor IMPI in the fat body of  
1045 *Galleria mellonella* exposed to infection with *Beauveria bassiana*. *Acta Biochim Pol* 64, 273-278,  
1046 10.18388/abp.2016\_1376.

1047 Vigneux, F., Zumbihl, R., Jubelin, G., Ribeiro, C., Poncet, J., Baghdigian, S., Givaudan, A., Brehelin, M., 2007. The  
1048 xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are  
1049 present in plant and human pathogens. *J Biol Chem* 282, 9571-9580, 10.1074/jbc.M604301200.

1050 Wang, Y., Branicky, R., Noe, A., Hekimi, S., 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage  
1051 and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 217, 1915-1928, 10.1083/jcb.201708007.

1052 Wang, Y., Gaugler, R., Cui, L.W., 1994. Variations in immune response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus*  
1053 to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* species. *J Nematol* 26, 11-18.

1054 Wang, Z., Wilhelmsson, C., Hyrsil, P., Loof, T.G., Dobes, P., Klupp, M., Loseva, O., Morgelin, M., Ikle, J., Cripps, R.M.,  
1055 Herwald, H., Theopold, U., 2010. Pathogen entrapment by transglutaminase -- a conserved early innate  
1056 immune mechanism. *PLoS Pathog* 6, e1000763, 10.1371/journal.ppat.1000763.

1057 Wedde, M., Weise, C., Kopacek, P., Franke, P., Vilcinskas, A., 1998. Purification and characterization of an  
1058 inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*.  
1059 *Eur J Biochem* 255, 535-543, 10.1046/j.1432-1327.1998.2550535.x.

1060 Wedde, M., Weise, C., Nuck, R., Altincicek, B., Vilcinskas, A., 2007. The insect metalloproteinase inhibitor gene of  
1061 the lepidopteran *Galleria mellonella* encodes two distinct inhibitors. *Biol Chem* 388, 119-127,  
1062 10.1515/Bc.2007.013.

1063 White, G.F., 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66, 302-303,  
1064 10.1126/science.66.1709.302-a.

1065 Wu, S., Zhang, X.F., He, Y.Q., Shuai, J.B., Chen, X.M., Ling, E.J., 2010. Expression of antimicrobial peptide genes in  
1066 *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. *Dev Comp Immunol* 34, 1191-  
1067 1198, 10.1016/j.dci.2010.06.013.

1068 Xia, X., You, M., Rao, X.J., Yu, X.Q., 2018. Insect C-type lectins in innate immunity. *Dev Comp Immunol* 83, 70-79,  
1069 10.1016/j.dci.2017.11.020.

- 1070 Yadav, S., Daugherty, S., Shetty, A.C., Eleftherianos, I., 2017. RNAseq analysis of the *Drosophila* response to the  
1071 entomopathogenic nematode *Steinernema*. *G3 (Bethesda)* 7, 1955-1967, 10.1534/g3.117.041004.
- 1072 Yadav, S., Eleftherianos, I., 2018. The Imaginal Disc Growth Factors 2 and 3 participate in the *Drosophila* response  
1073 to nematode infection. *Parasite Immunol* 40, 10.1111/pim.12581.
- 1074 Yadav, S., Eleftherianos, I., 2019. Participation of the serine protease Jonah66Ci in the *Drosophila* antinematode  
1075 immune response. *Infect Immun* 87, 10.1128/IAI.00094-19.
- 1076 Yadav, S., Gupta, S., Eleftherianos, I., 2018. Differential regulation of immune signaling and survival response in  
1077 *Drosophila melanogaster* larvae upon *Steinernema carpocapsae* nematode infection. *Insects* 9,  
1078 10.3390/Insects9010017.
- 1079 Yi, H.Y., Chowdhury, M., Huang, Y.D., Yu, X.Q., 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl*  
1080 *Microbiol Biotechnol* 98, 5807-5822, 10.1007/s00253-014-5792-6.
- 1081 Yu, K.H., Kim, K.N., Lee, J.H., Lee, H.S., Kim, S.H., Cho, K.Y., Nam, M.H., Lee, I.H., 2002. Comparative study on  
1082 characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx*  
1083 *mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev Comp Immunol* 26, 707-713, 10.1016/S0145-305x(02)00027-7.
- 1084 Yu, X.Q., Kanost, M.R., 2004. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte  
1085 encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol* 28, 891-  
1086 900, 10.1016/j.dci.2004.02.005.
- 1087 Yuan, C.F., Xing, L.S., Wang, M.L., Wang, X., Yin, M.Y., Wang, Q.R., Hu, Z.H., Zou, Z., 2017. Inhibition of  
1088 melanization by serpin-5 and serpin-9 promotes baculovirus infection in cotton bollworm *Helicoverpa*  
1089 *armigera*. *PLoS Pathog* 13, e1006645, 10.1371/journal.ppat.1006645.
- 1090 Zhang, K., Pan, G.Z., Zhao, Y.Z., Hao, X.W., Li, C.Y., Shen, L., Zhang, R., Su, J.J., Cui, H.J., 2017. A novel immune-  
1091 related gene HDD1 of silkworm *Bombyx mori* is involved in bacterial response. *Mol Immunol* 88, 106-115,  
1092 10.1016/j.molimm.2017.06.023.
- 1093 Zhang, S., Yan, H., Li, C.Z., Chen, Y.H., Yuan, F.H., Chen, Y.G., Weng, S.P., He, J.G., 2013. Identification and function  
1094 of leucine-rich repeat flightless-I-interacting protein 2 (LRRFIP2) in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One* 8,  
1095 e57456, 10.1371/journal.pone.0057456.
- 1096 Zhuang, S.F., Kelo, L.S., Nardi, J.B., Kanost, M.R., 2007. An integrin-tetraspanin interaction required for cellular  
1097 innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 282, 10.1074/Jbc.M700341200.
- 1098 Zou, F.M., Lee, K.S., Kim, B.Y., Kim, H.J., Gui, Z.Z., Zhang, G.Z., Guo, X.J., Jin, B.R., 2015. Differential and spatial  
1099 regulation of the prophenoloxidase (proPO) and proPO-activating enzyme in cuticular melanization and  
1100 innate immunity in *Bombyx mori* pupae. *J Asia-Pac Entomol* 18, 757-764, 10.1016/j.aspen.2015.09.007.
- 1101 Zou, Z., Shin, S.W., Alvarez, K.S., Kokoza, V., Raikhell, A.S., 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito  
1102 *Aedes aegypti*. *Immunity* 32, 41-53, 10.1016/j.immuni.2009.11.011.

## 1104 **Figure Legends**

1105 **Fig 1.** Expression variations of the differentially expressed immune genes after infestation by the  
1106 nematobacterial complex. Heatmaps showing the expression variations of the differentially expressed  
1107 immune genes in the hemocytes and in the fat body at a middle time point of 15 h post-infestation.  
1108 RNAseq raw data were retrieved from the study of Huot et al. (2019) in which three independent  
1109 experiments were performed with N=9 larvae exposed to 150 NBCs or to a Ringer sterile solution in each  
1110 sample. Differential expression between the infested and the control conditions was analyzed with the  
1111 Sleuth software (following pseudoalignment with the Kallisto software) using statistical thresholds of  
1112 0.01 for q-value (equivalent of adjusted p-value), -1 and +1 for Beta value (biased equivalent of log2 fold  
1113 change) and 5 for pseudocount means. The immune genes were identified by homology and classified as  
1114 (A) antimicrobial immunity-related, (B) melanization-related, (C) cellular immunity-related and (D)  
1115 diverse immune responses. Black dots indicate genes with statistically non-significant variations to the  
1116 controls in the corresponding tissue; HC : Hemocytes, FB : Fat body.

1117 **Fig 2.** Temporal dynamics of the identified immune responses after infestation by the nematobacterial  
1118 complex. Heatmaps showing the temporal evolution of the induction levels of representative immune  
1119 genes in the hemocytes (A) and in the fat body (B) after infestation by the NBC. Three independent  
1120 experiments were performed with N=9 larvae exposed to 150 NBCs and N=9 larvae exposed to Ringer  
1121 sterile solution. RT-qPCR experiments were performed in triplicate and the RpL32 housekeeping gene  
1122 was used as reference for relative quantifications. Differential expression between the infested and the  
1123 control conditions was assessed according to the method of Ganger et al. (2017) and with Student t tests  
1124 on  $\Delta Cq$ . Black dots indicate genes with statistically non-significant variations to the controls in the  
1125 corresponding tissue ( $p$ -value > 0.05). The dendrograms represent clustering analyses based on Pearson  
1126 correlation coefficients.

1127 **Fig 3.** Relative participations of *S. carpocapsae* and *X. nematophila* in the hemocytes' immune responses.  
1128 Histograms showing the induction levels (+/- SEM) of representative immune genes in the hemocytes at  
1129 13 h after independent injections of either whole NBCs, axenic nematodes or bacterial symbionts. Three  
1130 independent experiments were performed with N=9 control larvae and N=9 larvae injected with 10 NBCs  
1131 (NBC), 10 axenic *S. carpocapsae* (*S.c.*) or 200 *X. nematophila* (*X.n.*). For NBC and axenic nematode  
1132 injections control larvae were injected with 70 % Ringer - 30 % glycerol sterile solutions whereas they  
1133 were injected with sterile PBS for bacterial injections. RT-qPCR experiments were performed in triplicate  
1134 and the RpL32 housekeeping gene was used as reference for relative quantifications. Differential  
1135 expression values between the infected and the corresponding control conditions were calculated  
1136 according to the method of Ganger et al. (2017) and statistical differences between the three types of  
1137 infection were assessed by one-way ANOVA and Tukey tests on  $\Delta\Delta Cq$ . Letters indicate the statistical

1138 groups resulting from the Tukey tests (p-value > 0.05). The genes were then gathered by type of immune  
1139 response with (A) antimicrobial immunity-related, (B) melanization-related, (C) cellular immunity-  
1140 related and (D) diverse immune responses.

1141 **Fig 4.** Relative participations of *S. carpocapsae* and *X. nematophila* in the fat body's immune responses.  
1142 Histograms showing the induction levels (+/- SEM) of representative immune genes in the fat body at 13  
1143 h after independent injections of either whole NBCs, axenic nematodes or bacterial symbionts. Three  
1144 independent experiments were performed with N=9 control larvae and N=9 larvae injected with 10 NBCs  
1145 (NBC), 10 axenic *S. carpocapsae* (*S.c.*) or 200 *X. nematophila* (*X.n.*). For NBC and axenic nematode  
1146 injections control larvae were injected with 70 % Ringer - 30 % glycerol sterile solutions whereas they  
1147 were injected with sterile PBS for bacterial injections. RT-qPCR experiments were performed in triplicate  
1148 and the RpL32 housekeeping gene was used as reference for relative quantifications. Differential  
1149 expression values between the infected and the corresponding control conditions were calculated  
1150 according to the method of Ganger et al. (2017) and statistical differences between the three types of  
1151 infection were assessed by one-way ANOVA and Tukey tests on  $\Delta\Delta Cq$ . Letters indicate the statistical  
1152 groups resulting from the Tukey tests (p-value > 0.05). The genes were then gathered by type of immune  
1153 response with (A) antimicrobial immunity-related, (B) melanization-related and (C) diverse immune  
1154 responses.

1155 **Fig 5.** Transcriptional induction patterns of putative new immune genes. (A, C) Histograms showing the  
1156 induction levels (+/- SEM) of 2 GBH genes in the hemocytes (A) and of the 5 Unk genes in the fat body  
1157 (C) at several times after infestation by the NBC. Three independent experiments were performed with  
1158 N=9 larvae exposed to 150 NBCs and N=9 larvae exposed to Ringer sterile solution. RT-qPCR  
1159 experiments were performed in triplicate and the RpL32 housekeeping gene was used as reference for  
1160 relative quantifications. Differential expression between the infested and the control conditions was  
1161 assessed according to the method of Ganger et al. (2017) and with Student t tests on  $\Delta Cq$ . Black dots  
1162 indicate genes with statistically non-significant variations to the controls (p-value > 0.05). (B, D)  
1163 Histograms showing the induction levels (+/-SEM) of 2 GBH genes in the hemocytes (B) and of the 5  
1164 Unk genes in the fat body (D) at 13 h after independent injections of either whole NBCs, axenic  
1165 nematodes or bacterial symbionts. Three independent experiments were performed with N=9 control  
1166 larvae and N=9 larvae injected with 10 NBCs (NBC), 10 axenic *S. carpocapsae* (*S.c.*) or 200 *X.*  
1167 *nematophila* (*X.n.*). For NBC and axenic nematode injections control larvae were injected with 70 %  
1168 Ringer - 30 % glycerol sterile solutions whereas they were injected with sterile PBS for bacterial  
1169 injections. RT-qPCR experiments were performed in triplicate and the RpL32 housekeeping gene was  
1170 used as reference for relative quantifications. Differential expression values between the infected and the  
1171 corresponding control conditions were calculated according to the method of Ganger et al. (2017) and



1172 statistical differences between the three types of infection were assessed by one-way ANOVA and Tukey  
1173 tests on  $\Delta\Delta Cq$ . Letters indicate the statistical groups resulting from the Tukey tests (p-value > 0.05).

1174 **Fig 6.** Hypothetical structure of the *S. frugiperda* larva's immune response to the NBC. Graphical  
1175 abstract illustrating the main hypotheses we can emit from the present RNAseq and RT-qPCR data and  
1176 from our current knowledge of *S. frugiperda* immunity. Dark green letters, lines and arrows indicate  
1177 responses that seem to be mainly induced by the nematode partner *S. carpocapsae* whereas orange ones  
1178 indicate responses that seem to be mainly induced by the bacterial symbiont *X. nematophila*. The arrows'  
1179 thicknesses and the letter sizes refer to the relative strengths of the induced transcriptional responses.

1180

**Figure 1**

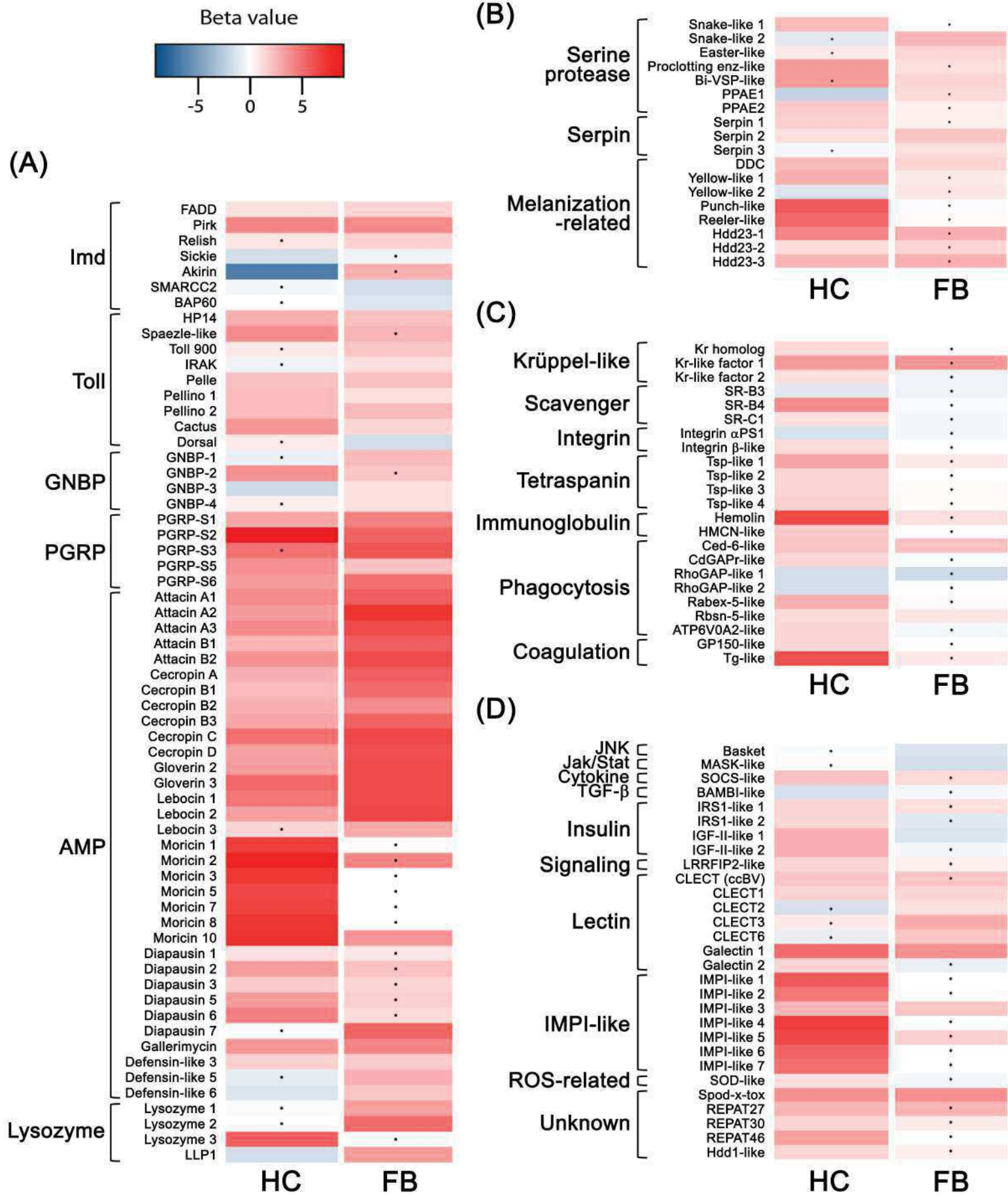
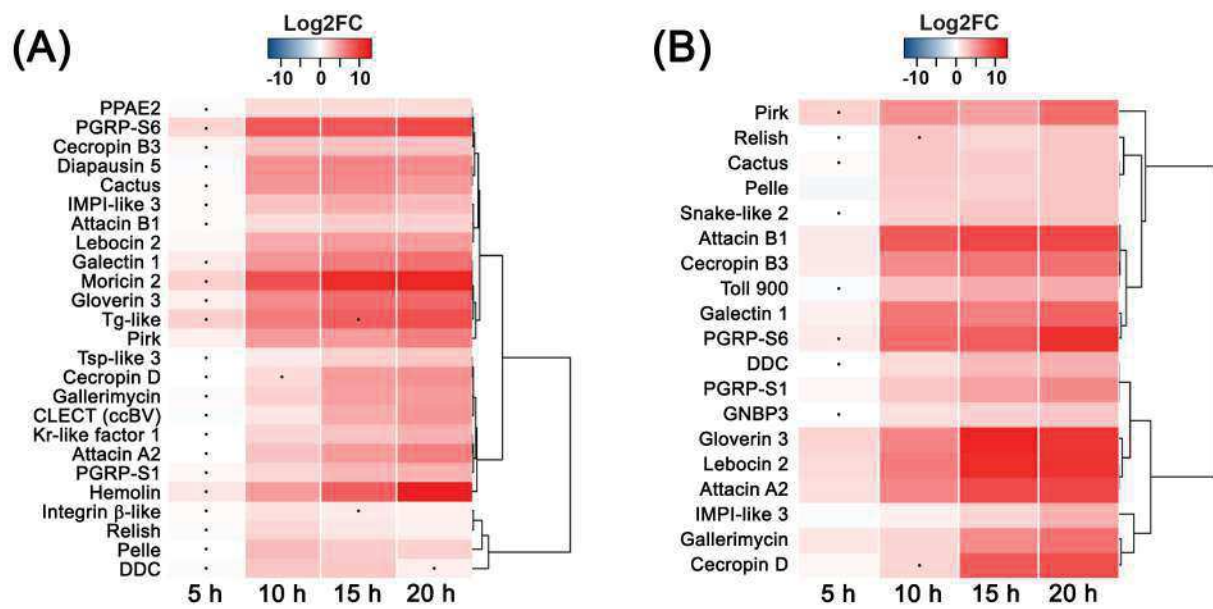


Figure 2



**Figure 3**

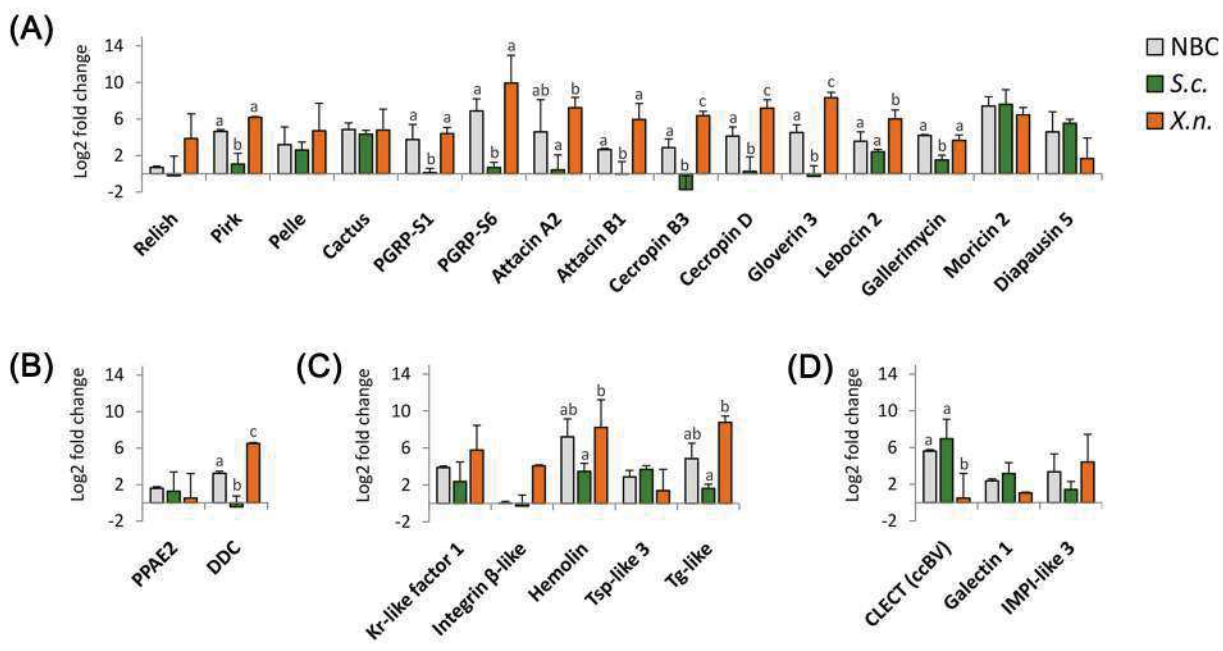


Figure 4

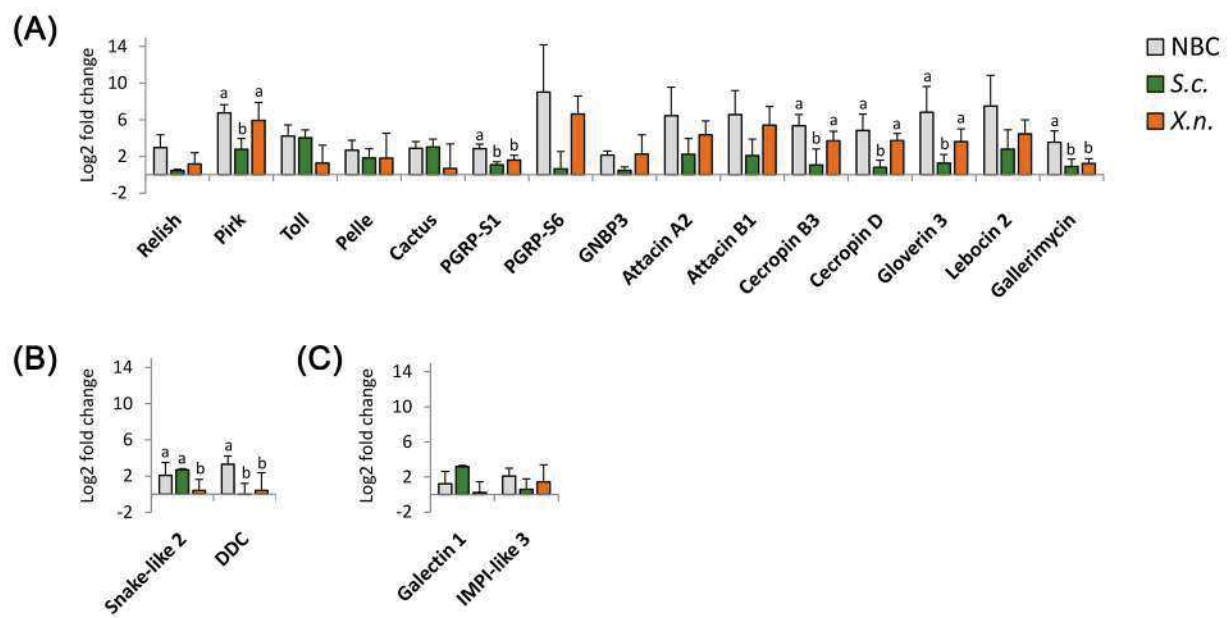


Figure 5

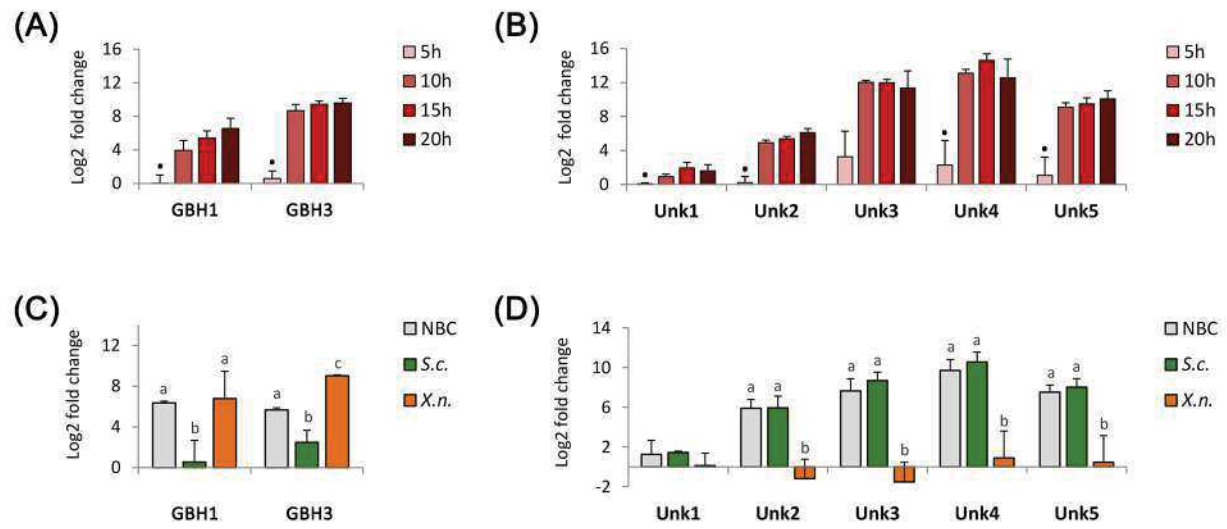
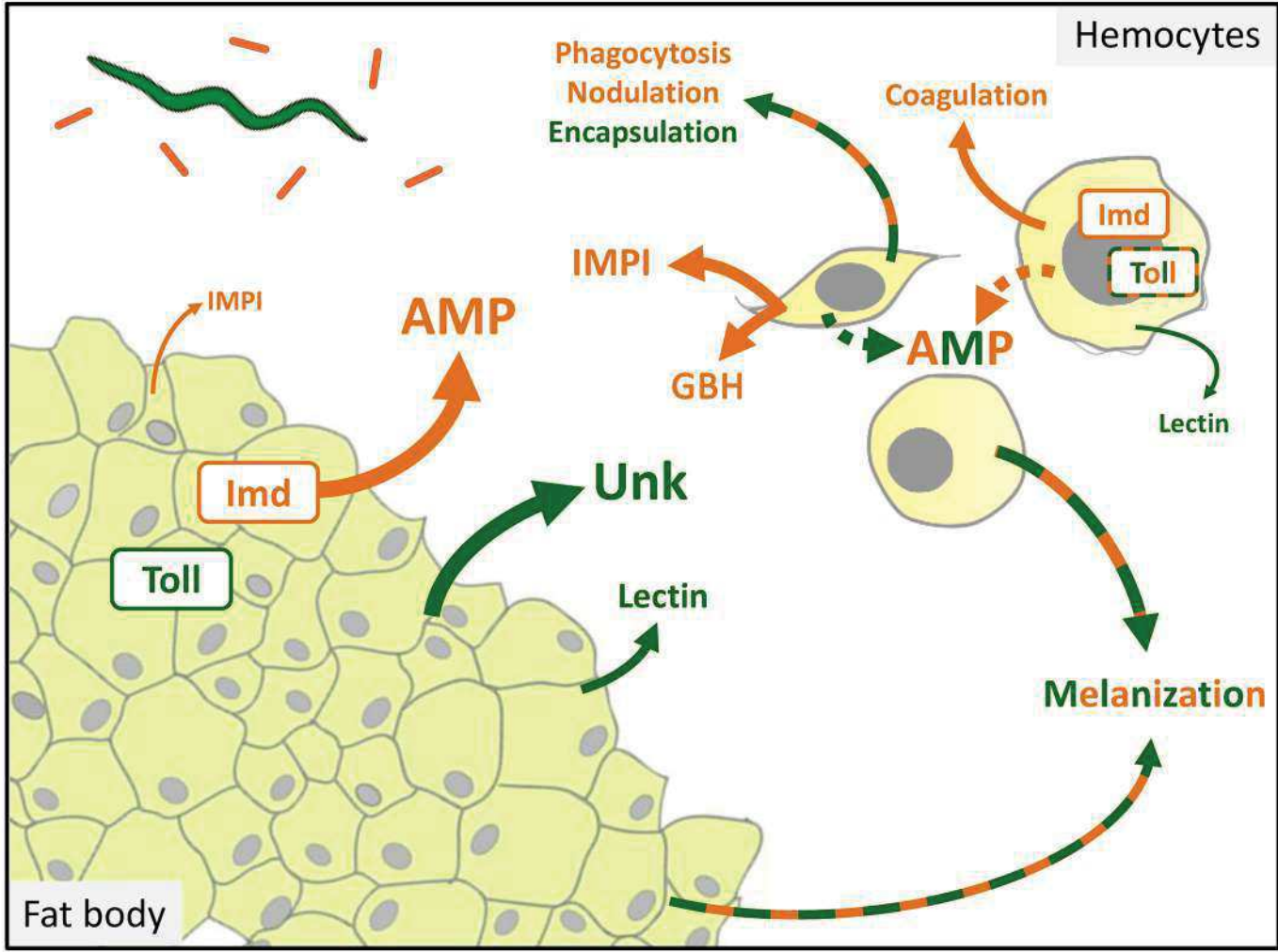


Figure 6



## 1181 **Supporting Information Legends**

1182 **Supplementary Table 1. Primers sequences and genes used in this study.**

1183 **Supplementary Table 2. Hemocytes and fat body RNAseq results for *S. frugiperda*'s immune genes.**

1184 RNAseq raw data were retrieved from the study of Huot et al. (2019) in which three independent  
1185 experiments were performed with N=9 larvae exposed to 150 NBCs or to a Ringer sterile solution for 15  
1186 hours. Following pseudoalignment with the Kallisto software, differential expression between the infested  
1187 and the control conditions was analyzed with the Sleuth software using statistical thresholds of 0.01 for q-  
1188 value (equivalent of adjusted p-value), -1 and +1 for Beta value (biased equivalent of log2 fold change)  
1189 and 5 for pseudocount means. The statistics corresponding to the transcripts that were considered as  
1190 significantly up- or down-regulated are highlighted in red and blue, respectively. The normalized  
1191 pseudocounts are also indicated for each individual sample, with HCn15 and FBn15 corresponding to  
1192 control larvae and HCi15 and FBi15 corresponding to infested larvae. Blast hits on the *Drosophila* and nr  
1193 NCBI databases were obtained by blastx with the Blast2GO software. (A) Immune genes previously  
1194 annotated in the *S. frugiperda*'s genome. (B) Newly identified *S. frugiperda*'s immune genes.

1195 **Supplementary Table 3. Hemocytes and fat body RNAseq results for the Unk and GBH putative**

1196 **new immune genes.** RNAseq raw data were retrieved from the study of Huot et al. (2019) in which three  
1197 independent experiments were performed with N=9 larvae exposed to 150 NBCs or to a Ringer sterile  
1198 solution for 15 hours. Following pseudoalignment with the Kallisto software, differential expression  
1199 between the infested and the control conditions was analyzed with the Sleuth software using statistical  
1200 thresholds of 0.01 for q-value (equivalent of adjusted p-value), -1 and +1 for Beta value (biased  
1201 equivalent of log2 fold change) and 5 for pseudocount means. The statistics corresponding to the  
1202 transcripts that were considered as significantly upregulated are highlighted in red. The normalized  
1203 pseudocounts are also indicated for each individual sample, with HCn15 and FBn15 corresponding to  
1204 control larvae and HCi15 and FBi15 corresponding to infested larvae.

1205 **Supplementary Fig 1. Verification of *S. carpocapsae* axenicity.** Electrophoresis gel showing the  
1206 absence of bacterial contaminants in the axenized nematodes used for experimental infections. Total  
1207 DNA from ground infective stage nematodes was extracted a few hours after each experimental infection  
1208 (fresh axenic *S.c.*) and after several days of storage without antibiotics (stored axenic *S.c.*). The absence  
1209 of bacterial contaminations was assessed by agarose gel electrophoresis after PCR amplification of the  
1210 16S rRNA gene with universal primers and of the *Xenorhabdus*-specific XNC1\_0073 gene (encoding a  
1211 putative TonB-dependent heme-receptor). Whole NBCs (NBC) and a pure suspension of *X. nematophila*  
1212 (*X.n.*) were used as positive controls. A pure suspension of *Pseudomonas protegens* (*P.p.*) was used as  
1213 negative control of putative TonB-dependent heme-receptor amplification. The results indicate no  
1214 bacterial contamination is detected in the sterile axenic nematodes used for experimental infections and



1215 that even after several days of storage without antibiotics, the *X. nematophila* population did not recover  
1216 within these nematodes.

1217 **Supplementary Fig 2. Temporal monitoring of nematobacterial infestation parameters.** (A) Dotplot  
1218 showing the number of *S. carpocapsae* nematodes detected in the midgut alimentary bolus at several  
1219 times after contact with 150 NBCs. Dot colors correspond to 3 independent experiments on N=3 larvae  
1220 per time point. (B) Curve showing the temporal evolution of *X. nematophila* concentration (+/-SEM) in  
1221 the hemolymph across the time post-infestation. Three independent infestation experiments were  
1222 performed with 3 pools of 3 larvae per time point. Hemolymph was collected by bleeding and *X.*  
1223 *nematophila* was quantified by CFU counting on selective culture medium containing erythromycin. (C)  
1224 Curve showing the temporal evolution of *S. frugiperda* larvae survival percentage (+/- SEM) across the  
1225 time post-infestation. Three independent infestation experiments were performed on N=20 larvae per  
1226 experiment.

1227 **Supplementary Fig 3. Comparison of the main infection parameters after independent injections of**  
1228 **the nematobacterial complex, of axenic *S. carpocapsae* and of *X. nematophila*.** (A) Curves showing  
1229 the temporal evolution of *X. nematophila* concentration (+/-SEM) after independent injections of either  
1230 10 NBCs or 200 *X. nematophila* (*X.n.*). Three independent injection experiments were performed with 3  
1231 pools of 3 larvae per time point. Hemolymph was collected by bleeding and *X. nematophila* was  
1232 quantified by CFU counting on selective culture medium containing erythromycin. (B) Curves showing  
1233 the temporal evolution of *S. frugiperda* larvae survival percentage (+/- SEM) after independent injections  
1234 of either 10 NBCs , 10 axenic *S. carpocapsae* (*S.c.*) or 200 *X. nematophila* (*X.n.*). Three independent  
1235 injection experiments were performed on N=20 larvae per experiment. No insect death was reported for  
1236 control buffer-injected larvae. (C) Histogram showing the parasitic success (+/- SEM) (i.e.: number of  
1237 larvae with NBC emergence on total number of infested larvae) after independent injections of either 10  
1238 NBCs or 10 axenic *S. carpocapsae* (*S.c.*). Three independent injection experiments were performed on  
1239 N=20 larvae per infection type and per experiment.

1240 **Supplementary Fig 4. Alignment of deduced amino acid sequences of Unks from *S. frugiperda* with**  
1241 **those of *S. litura* and *S. littoralis*.** Nucleotide sequences were retrieved by blastn on *S. litura* and *S.*  
1242 *littoralis* genomes.

**Supplementary Table 1. Primers sequences and genes used in this study**

Gene name	Transcript ID	Primer	Sequence
Relish	GSSPFG00022750001.3-RA	Relish-F	5' -TATGGCACCAACAAAACGAA-3'
	GSSPFG00033008001.5-RA		
	GSSPFG00035341001.3-RA		
	GSSPFG00024458001.3-RA	Relish-R	5' -CGATACCACCGAACCTGACT-3'
	GSSPFG00035289001.5-RA		
	GSSPFG00035420001.3-RA		
Pirk	GSSPFG00019499001-RA	Pirk-F	5' -AGATCGTTGGGAACAACACTGC-3'
		Pirk-R	5' -ACTGCACTCGGTACACCTTTC-3'
Toll	GSSPFG00005906001.3-RA	Toll-F	5' -AGCGCACTTTTCATTTTCGT-3'
		Toll-R	5' -ATCCGCTTGTATCGCAGTCT-3'
Pelle	GSSPFG00023708001.3-RA	Pelle-F	5' -GTTTTCAAAGGCGAATGGAA-3'
		Pelle-R	5' -CCTCCACCCATTAGCTGGTA-3'
Cactus	GSSPFG00001145001.2-RA	Cactus-F	5' -ACTGACACACAGACCCACACA-3'
	GSSPFG00035666001.2-RA	Cactus-R	5' -TCATCACAGCGAGGTGTAGC-3'
PGRP-S1	GSSPFG00035407001.3-RA	PGRP-S1-F	5' -GTACGCATCGCAATCAGGTA-3'
	GSSPFG00035271001.3-RA	PGRP-S1-R	5' -CTTTGGAACGAGCACCTAGC-3'
	GSSPFG00035260001.5-RA		
PGRP-S6	GSSPFG00019359001.4-RA	PGRP-S6-F	5' -TCCCTACAACCTCCCATTCG-3'
	GSSPFG00006503001.4-RA	PGRP-S6-R	5' -CAGCCGTGGTCATCAATATG-3'
GNBP3	GSSPFG00000179001.3-RA	GNBP3-F	5' -CCAAGGTGCCCTCATCTTTA-3'
	GSSPFG00019060001.5-RA	GNBP3-R	5' -TGATGCATAGCTTCCGTCAG-3'
Attacin A2	GSSPFG00015239001.3-RA	AttA2-F	5' -GTGCCCAACTTCAACACGTA-3'
		AttA2-R	5' -GTAGTCCTTGCGGTCCAAGA-3'
Attacin B1	GSSPFG00024578001.4-RA	AttB1-F	5' -GACTGTCCCAAGTCCTGAGC-3'
		AttB1-R	5' -TCCAATGGCACTGAACACAT-3'
Cecropin B3	GSSPFG00030458001.5-RA	CecB3-F	5' -GTCAGCGCCGCGCCAGA-3'
		CecB3-R	5' -TTGGCTGCACCCAACACCT-3'
Cecropin D	GSSPFG00030456001.4-RA	CecD-F	5' -ATCTGCTTCTGGCTGTGTC-3'
		CecD-R	5' -CCTCTTCGCTAGATCCTCCA-3'
Gloverin 3	GSSPFG00003522001.3-RA	Glo3-F	5' -TTTTGTGTTTCGCTGCTGTC-3'
		Glo3-R	5' -GGCCAAAAGACCAGAATCA-3'
Lebocin 2	GSSPFG00035421001.3-RA	Leb2-F	5' -AGCAAAAGGACCTCAAGCAG-3'
		Leb2-R	5' -CACGGCGTAAATAGGCATCT-3'
Gallerimycin	GSSPFG00011908001.6-RA	Gal-F	5' -ATGAAGGCTTGCGTGGTTCT-3'
		Gal-R	5' -CACCCGACTTGTAACCTCGT-3'
Moricin 2	GSSPFG00035989001.2-RA	Mor2-F	5' -AAGCTGTTTCGGTCTCGTTGT-3'
		Mor2-R	5' -GGATGTCGCCTAGTTGTGGT-3'
Diapausin 5	GSSPFG00018767001.3-RA	Dia5-F	5' -ACCTTTGTGCTGCTCCTCAT-3'
		Dia5-R	5' -CAGGCCTAGTTGGTGATCGT-3'

Gene name	Transcript ID	Primer	Sequence
PPAE2	GSSPFG00023419001.3-RA	PPAE2-F	5' -TACGCGTGTCACAACCTCTC-3'
		PPAE2-R	5' -CATGCCTTGTTTCTCATCGCG-3'
Snake-like 2	GSSPFG00033676001-RA	Snake-like-F	5' -TTGAGGAGTTGCAGTGGTTG-3'
		Snake-like-R	5' -GGGGGTGTTTGTATGATGTTTC-3'
DDC	GSSPFG00007066001-RA	DDC-F	5' -ATCGCCTGCATTGGTTTTAC-3'
		DDC-R	5' -CGTAAAATGGTGCGGTTCTT-3'
Kr-like factor 1	GSSPFG00016180001-RA	Kr-like1-F	5' -TCTCCTTGAAGCATTGAGCA-3'
		Kr-like1-R	5' -AAACGCACCCAACCTTTGAC-3'
Integrin $\beta$ -like	GSSPFG00000669001-RA	Int $\beta$ -like-F	5' -AATGGTGCAGGGAACGTAAG-3'
		Int $\beta$ -like-R	5' -TGGGCTTTGCTTTAATTTTCG-3'
Hemolin	GSSPFG00007500001.2-RA	Hemolin-F	5' -AAGAGGCTGCTCATCAAGGA-3'
		Hemolin-R	5' -ATGGCGACATCTTGACCTTC-3'
Tsp-like 3	GSSPFG00006818001.1-RA	Tsp-like3-F	5' -TTCTTCTCACCAGCCAGCTT-3'
		Tsp-like3-R	5' -GGTCCTCAGGTTCTCATCCA-3'
Tg-like	GSSPFG00016279001-RA	Tg-like-F	5' -ATGGAACGCGAGGACATTAC-3'
		Tg-like-R	5' -GGACCCCTTCACCTTATGT-3'
CLECT (ccBV)	GSSPFG00023677001.2-RA	ccBV lect-F	5' -TAATGCTTCTGCCCGTGGTT-3'
		ccBV lect-R	5' -GAGCATTCAATCCGTGCGAC-3'
Galectin 1	GSSPFG00017106001-RA	Galect_1-F	5' -AGTCAAATCCAACGGGTGTC-3'
		Galect_1-R	5' -TGCACCCTTAACGACCATTT-3'
IMPI-like 3	GSSPFG00027637001-RA	IMPI-like3-F	5' -TTGCAAGGAGATGCAGAATG-3'
	GSSPFG00030016001-RA	IMPI-like3-R	5' -TAGCGGTAGCCACAATTTGA-3'
GBH1	GSSPFG00026945001-RA	GBO1-F	5' -CGGAGTTTACAGGGGCATTA-3'
		GBO1-R	5' -CGCGATGTTTTTGTCTTTGA-3'
GBH3	GSSPFG00011909001.1-RA	GBO3-F	5' -GGTGTCGAGTTGGGAATCAT-3'
		GBO3-R	5' -TTCGTTGGAACATGGACTCA-3'
Unk1	GSSPFG00030863001-RA	Unk1-F	5' -AACTCCAGAATGCACGAACC-3'
		Unk1-R	5' -CTAGCAAACCAGGCGAACTC-3'
Unk2	GSSPFG00026931001-RA	Unk2-F	5' -ACGGTGACCACAACGTCATA-3'
		Unk2-R	5' -CGAGGGCGGTACATAAATTG-3'
Unk3	GSSPFG00026933001-RA	Unk3-F	5' -AGGAGACACCAATCGCAAAG-3'
		Unk3-R	5' -CCAGCAGCAAGAATGTTGAA-3'
Unk4	GSSPFG00026935001-RA	Unk4-F	5' -ACTAATGGGCTCCCTCCTGT-3'
	GSSPFG00022683001-RA	Unk4-R	5' -GTAGTTGGGGATCCTGCTGA-3'
Unk5	GSSPFG00026936001-RA	Unk5-F	5' -CAGAACAGCGACCTCAATCA-3'
	GSSPFG00022684001-RA	Unk5-R	5' -TGTGTCGTTGGATTGGTTGT-3'
Rpl32	GSSPFG00020532001-RA	Rpl32-F	5' -TACAATCGTCAAAAAGAGGACGA-3'
		Rpl32-R	5' -AAACCATTGGGTAGCATGTGA-3'
EF1 $\alpha$	GSSPFG00002766001-RA	EF1 $\alpha$ -F	5' -GACGTATACAAAATCGGTGGTATT-3'
		EF1 $\alpha$ -R	5' -GATTTGATGGATTTAGGGTTGTCT-3'











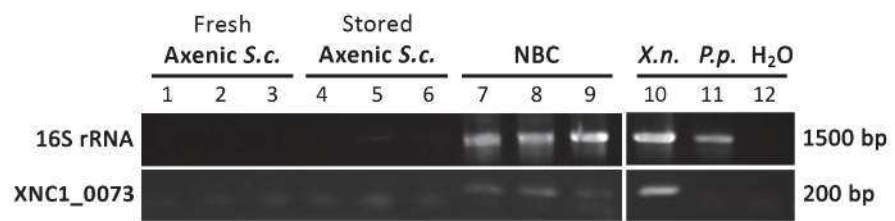


**TSupplementary Table 3. Hemocytes and fat body RNAseq results for the Unk and GBH putative new immune genes**

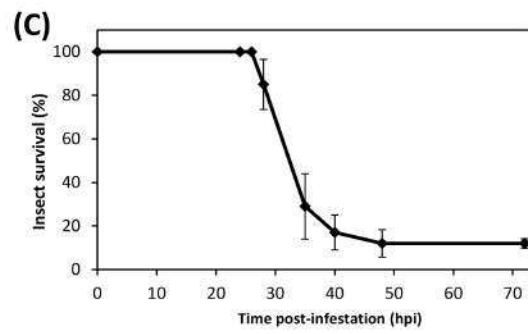
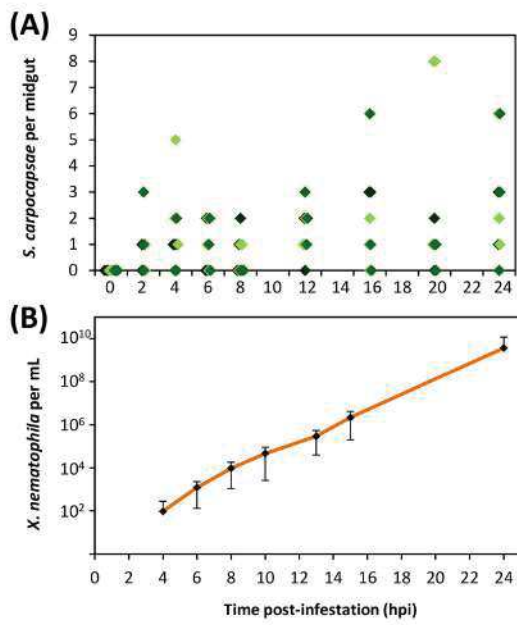
Category	Gene name	Transcript ID	Hemocytes								Fat body							
			Beta	qval	1HCn15	3HCn15	5HCn15	1HCi15	3HCi15	5HCi15	Beta	qval	1FBn15	3FBn15	5FBn15	1FBI15	3FBI15	5FBI15
Unknown cluster	Unk1	GSSPFG00030863001-RA	0.66	6E-01	5.7	6.1	14.1	66.0	5.3	9.9	7.17	2E-201	4.9	4.4	3.7	3543.8	2240.8	4791.4
	Unk2	GSSPFG00026931001-RA	-0.10	9E-01	1.7	1.4	1.7	1.4	1.8	1.2	3.68	2E-41	9.2	21.6	10.9	295.9	277.2	342.0
	Unk3	GSSPFG00026933001-RA	2.75	2E-02	0.2	0.8	0.5	39.1	2.0	4.4	8.04	8E-160	2.7	1.6	1.1	3404.7	2507.6	3836.0
	Unk4	GSSPFG00022683001-RA	5.13	8E-05	0.0	0.0	0.0	49.0	1.3	2.0	10.52	4E-44	0.0	0.0	0.3	2589.1	1474.0	2222.5
		GSSPFG00026935001-RA	NA	NA	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	1.0	10.83	2E-197	0.0	0.0	0.0	1567.4	1304.0	1678.9
	Unk5	GSSPFG00022684001-RA	2.19	4E-03	2.0	1.9	1.6	56.2	7.0	10.6	6.02	1E-172	4.7	7.4	5.8	949.2	1916.5	1653.3
		GSSPFG00026936001-RA	1.11	9E-03	0.5	0.4	0.6	1.9	0.8	2.3	6.06	3E-40	10.3	9.2	3.7	2087.0	1018.2	2700.5
Genes with Bacterial Homology	GBH1	GSSPFG00026945001-RA	5.56	2E-21	0.0	0.1	0.0	7.5	22.2	12.9	NA	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
	GBH2	GSSPFG00035796001.1-RA	2.82	3E-04	0.1	0.0	0.0	0.7	1.1	1.3	3.11	1E-01	0.0	0.3	0.0	0.5	10.4	0.2
	GBH3	GSSPFG00011909001.1-RA	6.99	6E-125	2.9	2.8	2.9	1733.9	4213.0	3962.2	5.94	1E-23	0.0	0.0	0.0	25.8	5.6	11.4

The statistics of the transcripts that were considered as significantly upregulated (Sleuth : Beta>1; qval < 0.01; pseudocounts > 5 in all the samples of at least one condition) are highlighted in red. The Beta value gives a biased estimate of the log2 fold change. The qvalue (qval) is an equivalent of the adjusted p-value. The following columns give the normalized pseudocounts (Kallisto) for each individual sample, with HCn15 and FBn15 corresponding to control larvae and Hci15 and FBI15 corresponding to infested larvae.

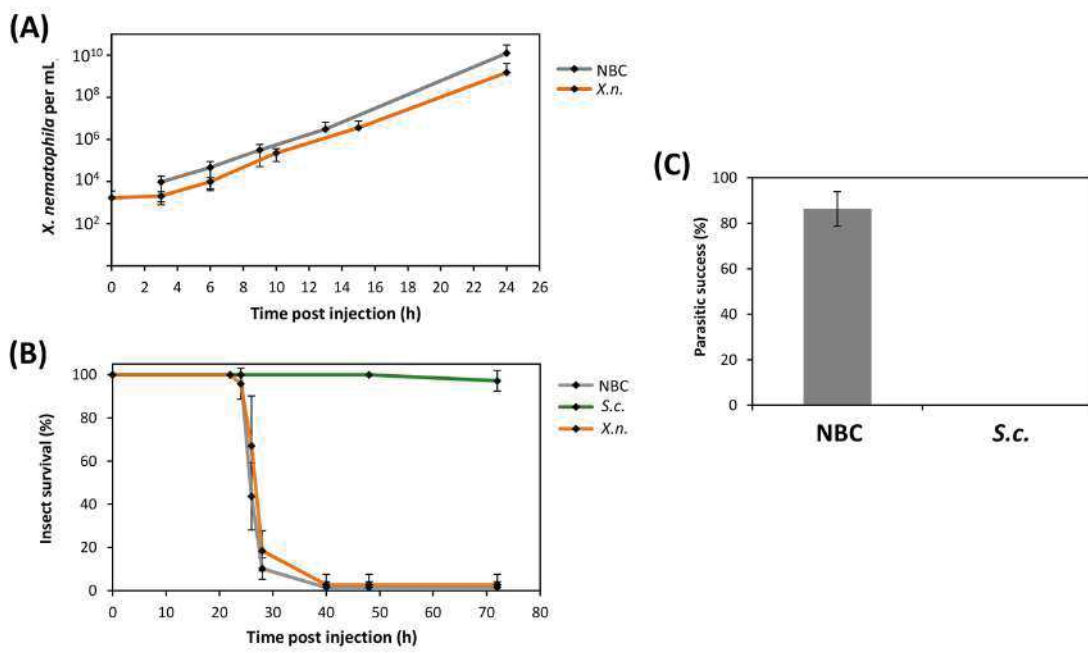
# Supplementary Fig 1



# Supplementary Fig 2



### Supplementary Fig 3





### **III. Recherche des fonctions de potentiels nouveaux effecteurs de l'immunité fortement surexprimés en réponse au CNB**

A l'issue de ces analyses descriptives, l'aspect que nous avons voulu clarifier en premier est celui de la participation des clusters des *UNKs* et des *GBHs* aux réponses de l'insecte au CNB. Comme indiqué précédemment, plusieurs gènes de ces clusters sont parmi les plus fortement surexprimés après infection, aussi bien dans les hémocytes et le corps gras que dans l'intestin moyen. Certains *UNKs* sont également parmi les premiers gènes surexprimés au cours du processus infectieux. Nos résultats indiquent de plus que les *UNKs* et les *GBHs* présentent des profils d'expression tissu- et partenaire-spécifiques, ce qui suggère qu'ils ne sont pas simplement induits en réponse à un stress, mais qu'ils sont impliqués dans des aspects particuliers de la réponse de l'insecte au CNB.

L'étude des fonctions de ces gènes sur le modèle *Spodoptera frugiperda* ne peut être facilement réalisée via les techniques de manipulation génétique qui ont été utilisées sur les modèles *Drosophila melanogaster* et *Manduca sexta*. Tout d'abord, comme chez divers lépidoptères, l'extinction de l'expression des gènes par ARN interférence n'a que rarement fonctionné sur l'espèce *S. frugiperda* (Terenius *et al.*, 2011 ; Yoon *et al.*, 2017). Par ailleurs, les méthodes de mutagenèse dirigée sont encore longues et coûteuses à mettre en place sur ce modèle. Afin de caractériser les fonctions des gènes *UNKs* et *GBHs*, nous avons donc décidé dans un premier temps d'utiliser une combinaison d'analyses bioinformatiques de leurs séquences nucléotidiques et protéiques et de tests d'activité sur des protéines et peptides produits à partir de séquences théoriques. Les premiers résultats obtenus sont présentés dans cette dernière section.

#### **A. Matériels et méthodes**

##### **1. Analyse *in silico* des séquences nucléotidiques**

Les annotations automatiques des gènes *UNKs* et *GBHs* ont été vérifiées à l'aide des versions OGS\_2.2 et OGS\_5.0 du génome de *Spodoptera frugiperda*, qui ont été obtenues à partir d'individus et de séquençages indépendants. Elles ont été analysées manuellement sur la plateforme bioinformatique BIPAA de l'Institut National de la Recherche Agronomique (<https://bipaa.genouest.org/is>).

La recherche de motifs de fixation de facteurs de transcription au sein des clusters des UNKs et des GBHs, ainsi que des clusters des *défensines*, *moriciens* et *cécropines* de *S. frugiperda*, a été réalisée à l'aide de la suite logicielle MEME (Bailey *et al.*, 2009). Les séquences consensus correspondant aux motifs κB de diverses espèces du genre *Drosophila* (GGRDNNHHBS ; Copley *et al.*, 2007) ou de l'espèce *Drosophila melanogaster* (GGGAAAACCC, GGGGATCCCC, GGGGATTTTT ; Busse *et al.*, 2007) ont été recherchées à l'aide de l'outil MAST (Bailey and Gribskov, 1998). Les recherches de motifs sans *a priori* ont été réalisées à l'aide de l'outil MEME (Bailey and Elkan, 1994).

## **2. Analyse *in silico* des séquences protéiques**

Les séquences protéiques UNKs et GBHs ont été alignées à l'aide de l'outil en ligne Multalin (Corpet, 1988). Les recherches de peptides signaux ainsi que de domaines fonctionnels au sein de ces séquences ont été réalisées à l'aide des outils d'annotation SMART (Letunic *et al.*, 2018) et InterProScan (Jones *et al.*, 2014). La recherche de propeptides potentiels a été réalisée à l'aide de l'outil de prédiction des sites de clivage des proprotéines convertases de type Subtilisin/Kexin ProP (Duckert *et al.*, 2004).

Pour les séquences protéiques courtes et susceptibles de coder des PAMs, la composition en résidus glycine, proline et cystéine, ainsi que le point isoélectrique théorique ont été déterminés à l'aide de ProtPARAM (Gasteiger *et al.*, 2005). Les structures secondaires des peptides théoriques ont été prédites avec l'outil CFSSP (Kumar *et al.*, 2013).

## **3. Production d'UNK1 et de la Cécropine C par synthèse chimique**

Le peptide UNK1 et la Cécropine C de *S. frugiperda* ont été produits par synthèse chimique sur support solide (méthode SPPS, pour solid phase peptide synthesis) par l'entreprise ProteoGenix (Schiltigheim, France). Pour l'UNK1, 100 mg de poudre lyophilisée à 59% de pureté ont été obtenus puis dissous dans 1.2 mL de solution à pH neutre de 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl:Acétonitrile (3:1) afin d'obtenir une suspension à environ 5,9 mM de peptide. Pour la Cécropine C, 100 mg de poudre lyophilisée à 55% de pureté ont été dilués de la même manière pour obtenir une concentration équivalente. Les deux suspensions ont été stockées à -20°C avant utilisation.

## 4. Production d'UNK4 en système bactérien

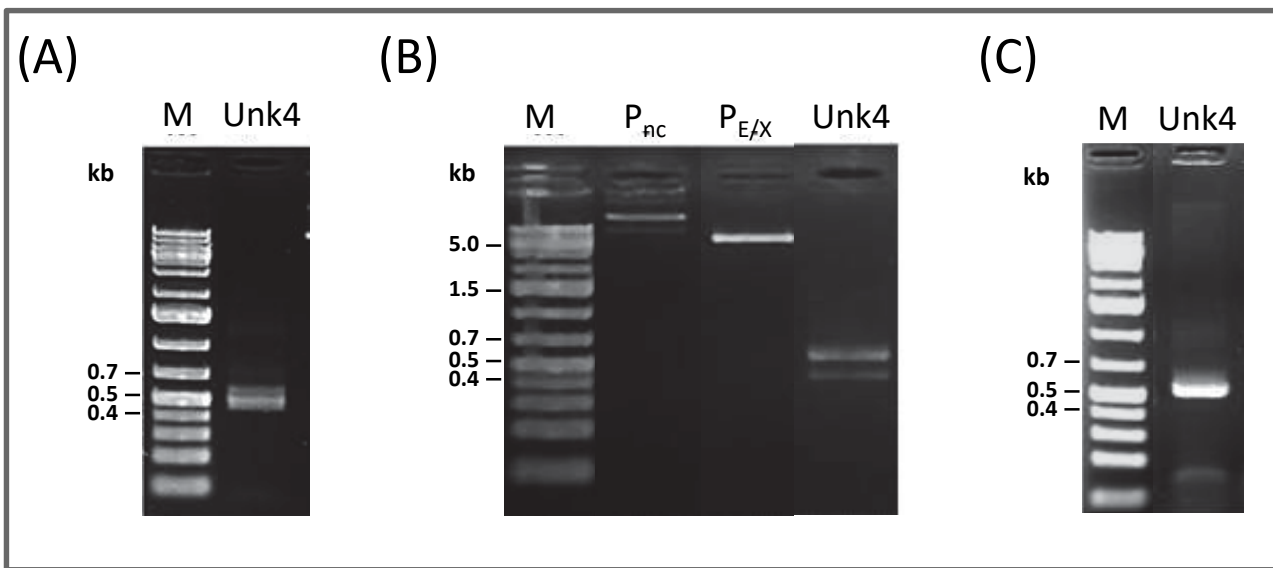
### 4. a. Synthèse de l'insert

Les ADNc correspondant au gène *UNK4* ont été obtenus par transcription inverse des ARNs totaux de corps gras de larves *S. frugiperda* exposées au CNB pendant 10 heures. Les protocoles et réactifs utilisés sont indiqués dans les articles 1 et 2. Les ADNc ont ensuite été amplifiés par PCR haute fidélité à l'aide du kit iProof<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad). Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur T100 (Bio-Rad), avec une phase de dénaturation initiale de 5 min à 98°C, 5 cycles de 30 sec de dénaturation à 98°C, 1 min d'hybridation à 55°C et 1 min d'élongation à 72°C, puis 35 cycles de 30 sec à 98°C, 1 min à 60°C et 1 min à 72°C suivis d'une phase d'extension terminale de 10 min à 72°C. Les amorces (F : 5'-GGA-ATT-CGA-CCT-ATT-TCA-TTG-TAC-ACC-3' ; R : 5'-CCG-CTC-GAG-CTA-TTT-TTC-TTT-GGC-TGC-TG-3') ont été dessinées à l'aide du logiciel Seqbuilder (DNASTAR), de façon à obtenir une séquence d'ADN correspondant au peptide UNK4 dépourvu de son peptide signal et à ajouter un site de restriction EcoRI en 5' de la séquence et un site de restriction XhoI en 3'. La taille du produit de PCR a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 15A).

### 4. b. Clonage de l'insert dans le vecteur d'expression

Les amplicons ont été clonés dans le vecteur d'expression pET28a(+), qui comprend un gène de résistance à la kanamycine, un promoteur T7, un opérateur Lac et une séquence codant une étiquette histidine en amont d'un site de clivage à la thrombine. 150 ng de vecteur ou 1.5 µg d'amplicon ont été préincubés 1 h 30 à 37°C dans un volume total de 56 µL contenant 6 µL de tampon 10x CutSmart (Biolabs). 2 µL d'enzyme XhoI et 2 µL d'enzyme EcoRI à 10 U/µL (Biolabs) ont ensuite été ajoutés et les ADNs ont été digérés pendant 1 h à 37°C. Les produits de digestion ont été purifiés à l'aide du kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research), et leurs intégrités ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 15B). 50 ng de vecteur et 150 ng d'insert ont ensuite été incubés une nuit à 4 °C avec 1 µL de T4 DNA ligase à 5 U/µL (Thermofisher Scientific) et 5 µL de tampon Rapid ligation 2x (Promega) dans un volume total de 10 µL.





**Figure 15 : Contrôles de la taille et de l'intégrité de l'insert et du vecteur au cours du clonage et après transformation de la bactérie productrice.** Les contrôles ont été effectués par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. (A) Contrôle de l'amplification d'UNK4 par PCR haute fidélité. La taille attendue pour l'amplicon est de 534 pb. (B) Contrôle de l'intégrité de l'insert et du vecteur pET28a(+) après digestion enzymatique par EcoRI et XhoI. (C) Contrôle de l'intégration de l'insert dans le vecteur après transformation de *Escherichia coli* Rosetta Gami2.

#### 4. c. Transformation de la bactérie productrice

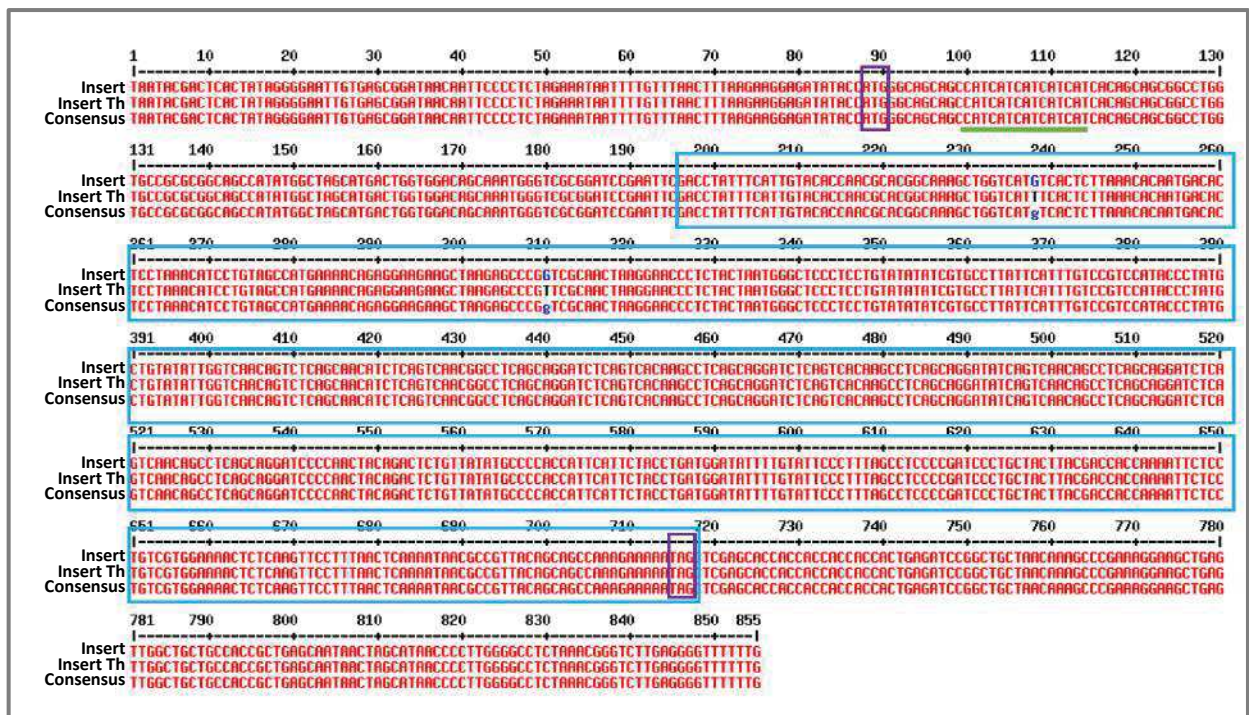
La production du peptide a été réalisée dans la bactérie compétente *Escherichia coli* Rosetta Gami2. La transformation de la bactérie par électroporation a été initiée par ajout de 3 µL de suspension contenant les produits de ligation à 40 µL de suspension bactérienne dans un électroporateur Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) réglé à 2,5 kV et 25 µF. Les bactéries ont ensuite été incubées 1 h à 37°C dans 500 µL de milieu nutritif superoptimal avec inhibition catabolique (SOC).

La sélection des bactéries ayant acquis la résistance à la kanamycine a été réalisée sur gélose nutritive ordinaire (GNO) supplémentée avec 34 µg/mL de chloramphénicol, 50 µg/mL de streptomycine, 12.5 µg/mL de tétracycline et 20 µg/mL de kanamycine. Les clones ayant intégré l'insert ont ensuite été sélectionnés par PCR sur colonie. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 20 µL contenant 1 µL d'amorces à 10 µM, 0.25 µL de Taq DNA polymérase (Invitrogen) à 5 U/µL, 2.5 µL de dNTP à 2 mM et 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub>. Un thermocycleur T100 (Bio-Rad) a été utilisé, avec une phase de dénaturation initiale de 5 min à 98°C et 30 cycles de 30 sec à 98 °C, 1 min à 60°C et 1 min à 72°C suivis d'une élongation terminale de 10 min à 72°C. La présence de l'insert a été déterminée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 15C).

L'unique clone sélectionné a ensuite été mis en culture une nuit à 37°C dans 5 mL de milieu LB supplémenté avec les antibiotiques indiqués précédemment (section A/ 4. c.). Après une nuit, 1.6 mL de la culture a été conservé à -80°C dans du glycérol à 20% et les 3.4 mL restants ont été utilisés pour purifier l'ADN plasmidique des bactéries avec le kit GenElute PlasmidMiniPrep (Merck). La séquence correspondant à l'insert a ensuite été séquencée par l'entreprise MWG Biotech (Ebersberg, Allemagne) à l'aide d'amorces spécifiques du promoteur et du terminateur T7 localisés de part et d'autre de l'insert au sein du plasmide pET28a(+). La validité de la séquence insérée dans le clone a ainsi pu être confirmée par alignement avec la séquence théorique de l'insert (Figure 16).

#### 4. d. Production et purification

La production de la protéine UNK4 par les bactéries transformées a tout d'abord été vérifiée dans 25 mL de milieu LB supplémenté avec 20 µg/mL de kanamycine. La culture a étéensemencée avec 1 mL de préculture du clone sélectionné, puis placée à 37°C sous agitation. A l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0.5 à 0.7, l'expression d'*UNK4* a été induite



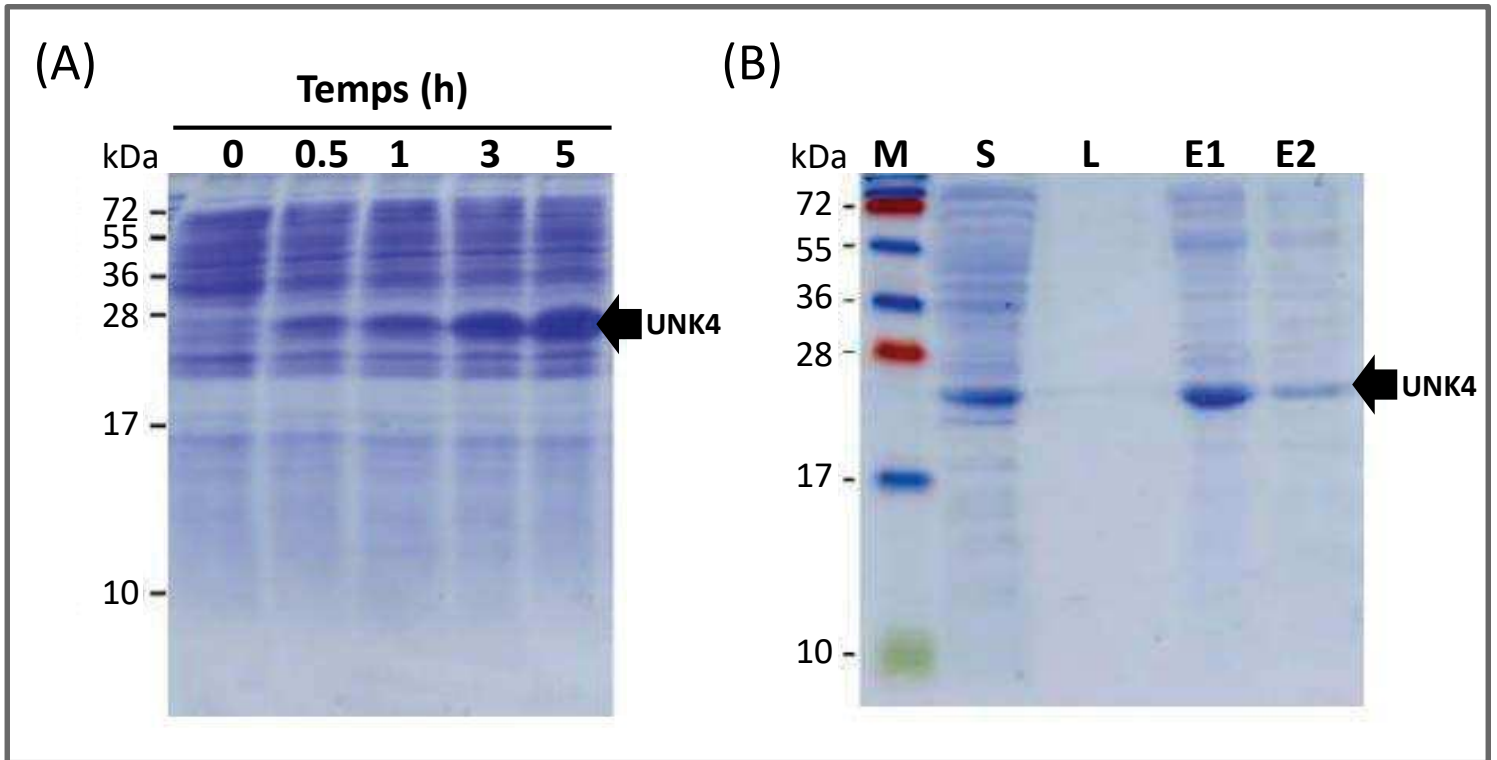
**Figure 16 : Validation de la séquence de l'insert après transformation de la bactérie productrice.** La séquence de l'insert intégré dans les bactéries *Escherichia coli* Gami2 a été obtenue par séquençage Sanger puis alignée à sa séquence théorique (Insert Th). Les encadrés violets correspondent aux codons start et stop de l'ADNc UNK4, l'encadré bleu correspondant à la séquence codant la protéine UNK4 et le trait vert correspond à la séquence codant l'étiquette histidine.

par ajout d'IPTG à une concentration finale de 0.5 mM. Des aliquotes de la culture ont été prélevés au temps 0, puis aux temps 0.5, 1, 3 et 5 heures. La densité optique de la culture a été mesurée en parallèle, afin de normaliser le nombre de bactéries par aliquote. Les aliquotes ont ensuite été centrifugés 15 min à 5000 g, puis les culots bactériens ont été solubilisés dans 25 µL de tampon de charge à pH 6.8 (Tris à 3.2 M, Glycérol à 0.2 M, Bleu de bromophénol à 13.4 M, SDS à 2.9 M dans de l'eau milli-Q, HCl) supplémenté avec 0.5 µL de β-mercaptoéthanol (Biorad). Après une incubation de 10 min à 95°C, les échantillons ont été déposés sur gel de polyacrylamide à 20% pour une migration de 5 heures à 150 V, 400 mA et 100 W. La taille et l'induction de la production de la protéine ont été vérifiées par coloration du gel au bleu de Coomassie (Figure 17A). La production de la protéine UNK4 à grande échelle a été réalisée dans les mêmes conditions, dans 1 L de culture bactérienne. Après 5 heures, la totalité de la culture a été centrifugée à 5000 g et les culots bactériens ont été lavés deux fois dans du PBS avant d'être conservés à -80°C.

La protéine UNK4 a ensuite été purifiée sur résine Ni-NTA (Nickel nitrilotriacétique) – agarose (Fisher Scientific). Les culots bactériens ont été resuspendus dans 10 mL de PBS, puis soniqués 10 fois 10 sec sur glace à l'aide d'un sonicateur Vibra-Cell (Fisher Scientific). Les débris ont ensuite été centrifugés 15 min à 3000 g et le surnageant a été incubé une nuit à 4°C avec 1 mL de résine Ni-NTA-agarose, sous agitation douce. La résine a été centrifugée 2 min à 1000 g, puis lavée 5 fois dans du PBS. Les protéines retenues grâce à leurs étiquettes histidine ont été éluées avec 0.5 mL de PBS contenant 250 mM d'imidazole (Sigma-Aldrich), puis avec 0.5 mL de PBS contenant 500 mM d'imidazole. La pureté des échantillons a ensuite été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12 % selon le protocole indiqué précédemment (Figure 17B). La concentration en protéines des éluats a été estimée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) à l'aide d'un spectrophotomètre Infinite 200 (Tecan) et d'une gamme étalon. La concentration de suspension protéique obtenue était d'environ 0.12 mM, puis elle a été conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

## 5. Antibiogrammes

Les activités des UNKs produits vis-à-vis de *X. nematophila* et d'autres bactéries à Gram négative ont été évaluées par antibiogramme sur gélose de Mueller-Hinton. L'activité d'UNK4 a été testée vis-à-vis des espèces *Xenorhabdus nematophila* (souche F1), *X. bovienii* (souche



**Figure 17 : Contrôle de la production de la protéine UNK4 et estimation de sa pureté après passage sur résine Ni-NTA.** La production et la pureté de la protéine UNK4 ont été contrôlées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12%. (A) Protéines extraites par sonication de *Escherichia coli* Rosetta Gami2 à différents temps après induction de la production d'UNK4 par ajout d'IPTG. La quantité de bactéries lysées a été normalisée entre les différents temps. (B) Protéines obtenues après sonication (S), lavage sur résine Ni-NTA (L), élution à 250 mM d'imidazole (E1) et élution à 500 mM d'imidazole (E2).

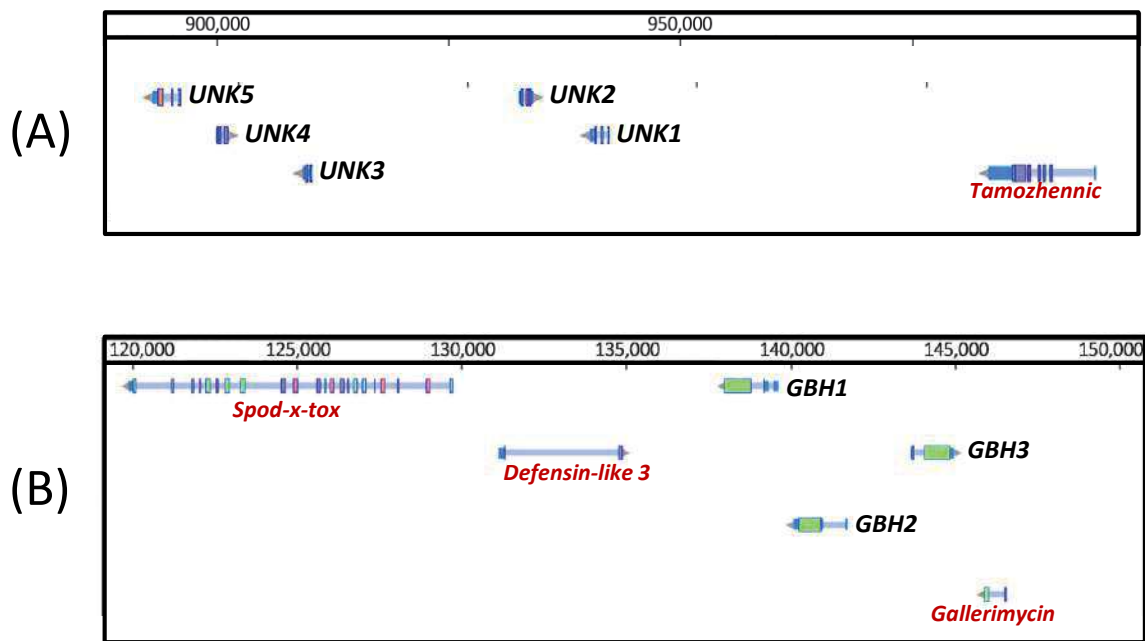
CS03), *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter cloacae*. En raison d'une faible quantité de peptide UNK1, ses activités n'ont été testées que sur les espèces *X. nematophila* (souche F1), *X. bovienii* (souche CS03), *E. coli* et *E. cloacae*. Les bactéries ont été cultivées dans 5 mL de milieu LB à 28°C (*X. nematophila* et *X. bovienii*) ou à 37°C (autres bactéries) jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,8. Les suspensions ont ensuite été diluées par 1000 (*X. nematophila* F1, *X. bovienii* CS03) ou par 10000 (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. cloacae*) avant d'être déposées sur la gélose par inondation et retrait du volume en excès. Après séchage, des dépôts de 10 µL de différentes dilutions des suspensions d'UNK1 ou d'UNK4 ont été effectués. Des dépôts de dilutions de la suspension de Cécropine C ont été utilisés comme contrôles positifs et des dépôts de tampon de solubilisation (UNK1, Cécropine C) ou d'éluion (UNK4) ont été utilisés comme contrôles négatifs. La lecture des résultats a été effectuée après une nuit d'incubation aux températures indiquées précédemment.

## **B. Résultats**

### **1. Analyses *in silico* des séquences nucléotidiques et protéiques**

#### **1. a. Analyse des séquences nucléotidiques**

Avant d'examiner les caractéristiques des clusters des *UNKs* et des *GBHs* de façon détaillée, nous avons examiné la qualité des annotations automatiques des gènes qui les composent. Pour cela, nous avons évalué la qualité du séquençage et observé les structures et les tailles des gènes prédits. Les prédictions indiquent que les 5 *UNKs* identifiés ont des tailles comprises entre 1480 et 2865 paires de bases, ainsi qu'un codon start, un codon stop et 3 exons par gène (Figure 18A). L'ensemble de ces paramètres est conforme à la structure des gènes eucaryotes. Les séquences sont par ailleurs de bonne qualité et similaires entre les deux versions indépendantes, OGS2.2 et OGS5.0, du génome de *S. frugiperda*, sauf pour l'*UNK3*, qui présente une séquence intronique indéfinie sur l'une des deux versions du génome de l'insecte. Tout comme les *UNKs*, les 3 gènes du cluster des *GBHs* possèdent des structures classiques de gènes eucaryotes, avec des tailles allant de 1184 à 1652 pb et 2 à 3 exons par gène (Figure 18B). Leurs séquences sont de bonne qualité.



**Figure 18 : Structures et environnements génomiques des gènes *UNKs* et *GBHs* chez *Spodoptera frugiperda*.** Les images des clusters des *UNKs* (A) et des *GBHs* (B) ont été obtenues à partir de la version OGS5.0 du génome de *S. frugiperda* sur la plateforme BIPAA de l'INRA. Les prédictions de régions transcrites sont indiquées par des rectangles et les prédictions de régions traduites sont indiquées par des rectangles avec bordures.

Les prédictions de gènes semblant valides, nous nous sommes ensuite intéressés aux modes d'induction transcriptionnelle des *UNKs* et *GBHs*. Etant donné leurs forts niveaux d'expression après infection, notre principale hypothèse était qu'ils soient induits par la voie Imd et/ou par la voie Toll. Nous avons donc commencé par rechercher des séquences similaires aux motifs  $\kappa$ B identifiés chez des espèces du genre *Drosophila* au sein de chaque cluster. Pour le cluster des *UNKs* comme pour celui des *GBHs*, cette analyse a donné des résultats négatifs. Toutefois, le même type d'analyse sur des clusters de PAMs n'a également donné aucun résultat, ce qui suggère que les motifs  $\kappa$ B ne sont pas conservés entre les Drosophiles et *S. frugiperda*. Afin d'élargir notre recherche à des séquences inconnues et/ou à des motifs reconnus par d'autres facteurs de transcription, nous avons ensuite procédé à des analyses sans *a priori* d'enrichissement en motifs. Ces analyses n'ont encore une fois révélé aucun résultat probant, aussi bien au niveau des clusters de gènes inconnus qu'au niveau des clusters de PAMs.

En résumé, l'analyse des séquences nucléotidiques des clusters des *UNKs* et des *GBHs* a révélé que les prédictions de gènes semblent valides, mais elle n'a pas permis d'identifier les facteurs de transcription induisant leurs expressions.

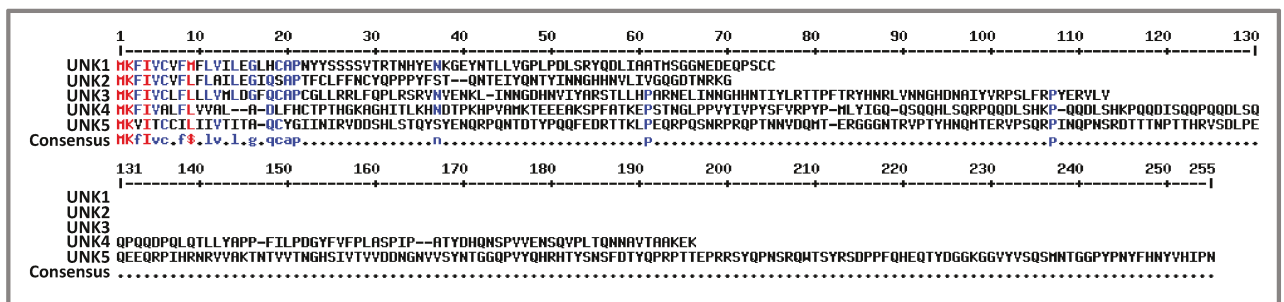
#### **1. b. Analyse des séquences protéiques**

Afin d'en apprendre davantage sur les fonctions des gènes inconnus, nous avons ensuite examiné de façon détaillée les séquences protéiques correspondant à chacun des gènes *UNKs* et *GBHs*. Cet examen a permis d'établir que les protéines *UNKs* sont hétérogènes en séquences, mais aussi en tailles. *UNK1* et *UNK3* sont en effet les seules à avoir des tailles proches de celles des PAMs de l'insecte avant maturation, soient d'environ 70 résidus. Les prédictions indiquent par ailleurs qu'*UNK1* pourrait être mûri par clivage protéolytique, donnant un peptide de 44 acides aminés. En revanche, *UNK2*, 4 et 5 ont des tailles plus importantes, de 113 à 253 résidus, et ne semblent pas comprendre de propeptide (Figure 19A ; Tableau 1). Malgré ces différences, les prédictions indiquent que tous les *UNKs* possèdent un peptide signal, ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de facteurs sécrétés.

Dans le cas d'*UNK1* et *UNK3*, notre première hypothèse était qu'ils puissent correspondre à de nouveaux PAMs. Nous avons donc examiné leurs points isoélectriques, leurs compositions en prolines, en glycines et en cystéines, ainsi que leurs éventuels ponts disulfure et structures secondaires dans le but d'identifier des propriétés caractéristiques des différentes familles de



(A)



(B)

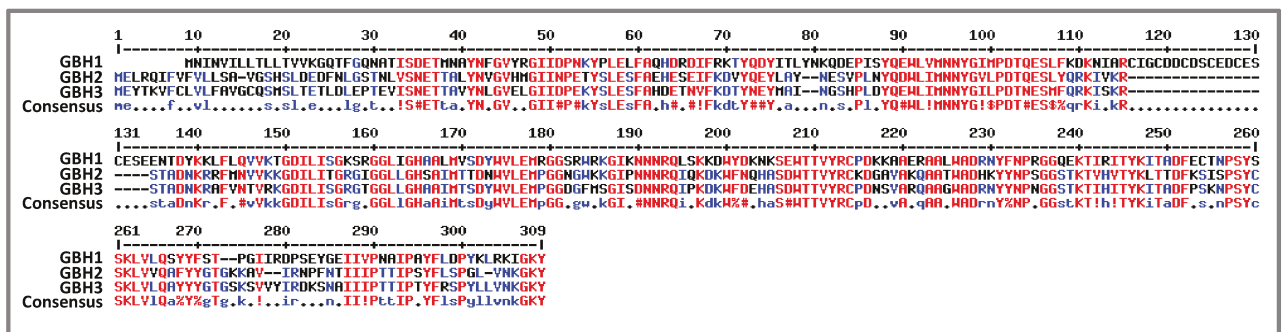


Figure 19 : Alignements des séquences protéiques correspondant aux *UNKs* et aux *GBHs*. Les séquences des protéines correspondent à des prédictions réalisées à partir des gènes *UNKs* (A) et *GBHs* (B).

PAMs connues chez les insectes. Nos analyses ont révélé que quel que soit leur degré de maturation (avec ou sans peptide signal et propeptide), les UNK1 et 3 ne semblent pas présenter de propriétés caractéristiques des PAMs des insectes. Tout d'abord, leurs points isoélectriques sont nettement inférieurs à 7, ce qui suggère qu'ils sont chargés négativement. Ils ne sont par ailleurs pas enrichis en prolines ou en glycines, et ils ne possèdent pas les 6 résidus cystéine et 3 à 4 ponts disulfure caractéristiques des Défensines (Tableau 2). Enfin, les prédictions n'ont pas révélé la présence de structures secondaires caractéristiques des grandes familles de PAMs, telles que de longues hélices  $\alpha$  (Figure 20). Ce dernier élément n'est toutefois que peu informatif étant donné que la plupart des PAMs acquièrent leur conformation tridimensionnelle uniquement dans l'environnement hydrophobe des membranes lipidiques de leurs cibles (Yi *et al.*, 2014).

Afin d'en apprendre davantage sur les fonctions potentielles des UNKs, nous avons également recherché la présence de domaines fonctionnels ou de séquences caractéristiques de superfamilles de protéines au sein des séquences protéiques. Ces analyses n'ont révélé aucune correspondance significative avec un domaine fonctionnel ou une superfamille connue de protéines. De plus, les quelques correspondances s'approchant de la significativité ( $e\text{-value} < 1$ ) sont très hétérogènes, avec par exemple un domaine de liaison à l'ADN au sein d'UNK2, une séquence caractéristique de la superfamille des protéases à cystéine au sein de l'UNK3 et une séquence caractéristique de constituants de la machinerie de traduction au sein de l'UNK4 (Tableau 1).

Contrairement aux UNKs, les 3 protéines GBH ont des tailles très similaires, d'environ 300 résidus, et présentent d'importantes homologies de séquences. Toutefois bien que GBH1 et GBH3 possèdent toutes deux un peptide signal, il semble que GBH2 n'en possède pas, ce qui pourrait être lié à des divergences fonctionnelles et/ou à un phénomène de pseudogénéisation de *GBH2* (Figure 19B ; Tableau 1).

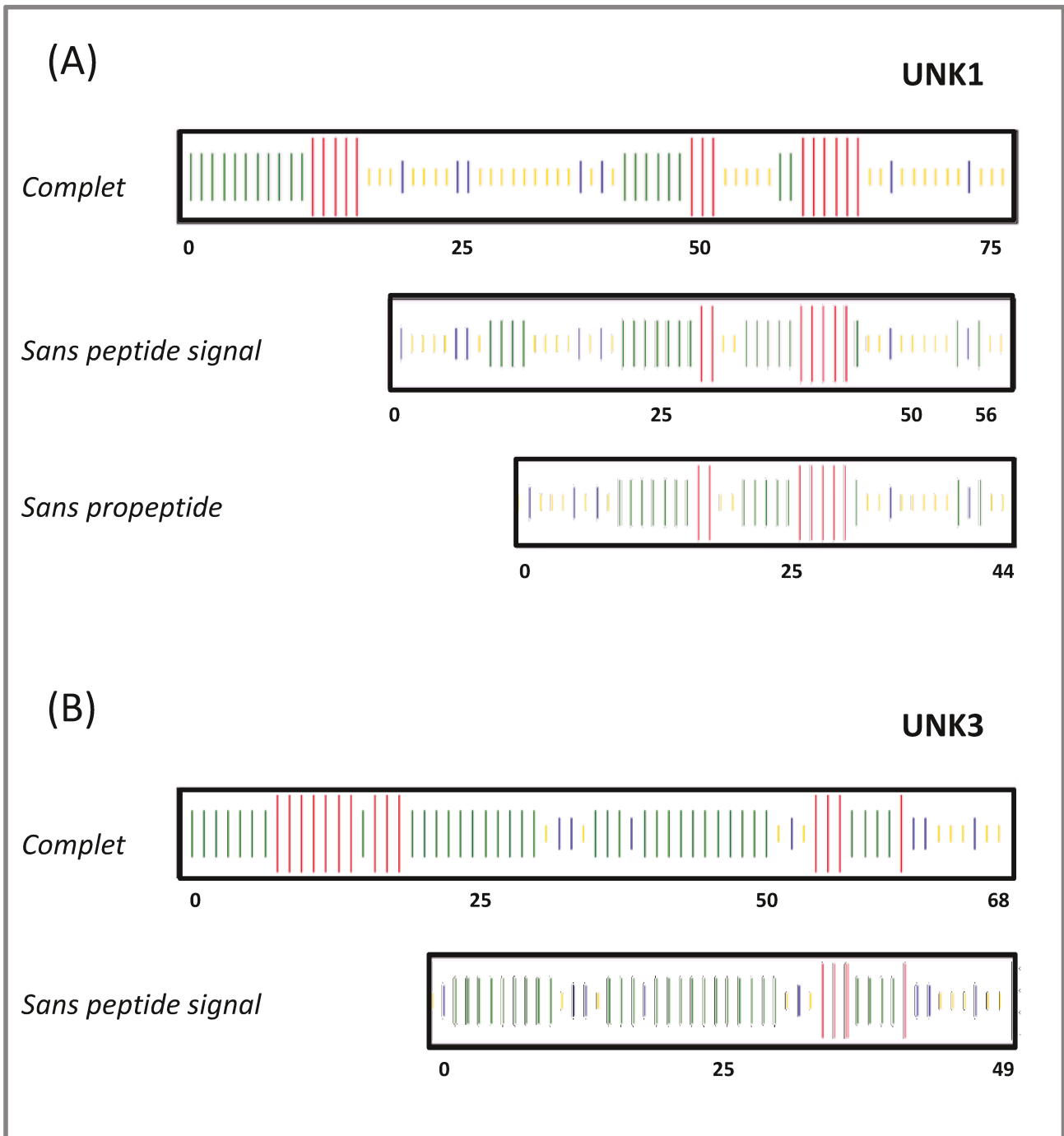
L'analyse de la séquence de GBH1 n'a révélé que des correspondances non-significatives, avec des séquences de protéines liant les dinucléotides NAD ou NADP et de protéines de type Ferritine, qui lient le Fer. En revanche, l'analyse des séquences de GBH2 et GBH3 a révélé des correspondances significatives avec des séquences caractéristiques de la superfamille des protéases à cystéine de type Papaïne. Chez les insectes, ces protéases incluent les Cathepsines B et L ainsi que la Cathepsine plasmatique 26-29-p. Ces protéases peuvent être

**Tableau 1: Recherche de domaines fonctionnels et de sites de maturation au sein des protéines UNKs et GBHs prédites**

Protéine / Peptide	Taille (résidus)	Peptide signal (position)	Propeptide (position)	SMART			InterProScan	
				Domaine / Superfamille	Position	E-value	Domaine / Superfamille	Position
UNK1	75	1-19	20-31	x	x	x	x	x
UNK2	113	1-19	x	Domaine de liaison à l'ADN	20-61	0,37	x	x
UNK3	69	1-19	x	Superfamille Protéase à cystéine	36-66	0,17	x	x
UNK4	187	1-19	x	x	x	x	x	x
UNK5	253	1-20	x	Domaine PUF2850 : Bactérien, non-caractérisé	130-201	0,17	x	x
				Superfamille Constituant de la machinerie de traduction	148-165	0,77		
GBH1	300	1-16	x	Superfamille Protéines à pli de Rossmann liant le NAD(P)	131-174	0,14	x	x
				Superfamille Protéines de type Ferritine	181-233	0,52		
GBH2	232	x	1-67	x	x	x	Superfamille Protéase à cystéine de type Papaïne	80-207
GBH3	295	1-24	25-119	Domaine CHAP : Amidohydrolase/peptidase à cystéine histidine-dépendante	82-168	0,17	Superfamille Protéase à cystéine de type Papaïne	131-258

**Tableau 2: Recherche de caractéristiques biochimiques de peptides antimicrobiens au sein d'UNK1 et d'UNK 3**

Protein / Peptide	Etat	Taille (résidus)	Point isoélectrique	Composition		
				Taux de Glycine (%)	Taux de Proline (%)	Nombre de cystéines
UNK1	Complet	75	4,78	6,7	5,3	4
	Sans peptide signal	56	4,43	7,1	7,1	2
	Sans propeptide	44	4,19	9,1	6,8	2
UNK3	Complet	69	5,99	7,4	5,9	3
	Sans peptide signal	50	6,94	8,2	8,2	2



**Figure 20 : Prédications de structures secondaires des peptides UNK1 et UNK3.** Les structures secondaires correspondant aux séquences prédites de UNK1 (A) et UNK3 (B) ainsi qu'à leurs formes matures ont été analysées à l'aide de l'outil de prédiction CFSSP. Les couleurs rouge, verte, bleue et jaune indiquent respectivement les structures en hélice  $\alpha$ , en feuillet  $\beta$ , les tours et les régions sans structure définie.

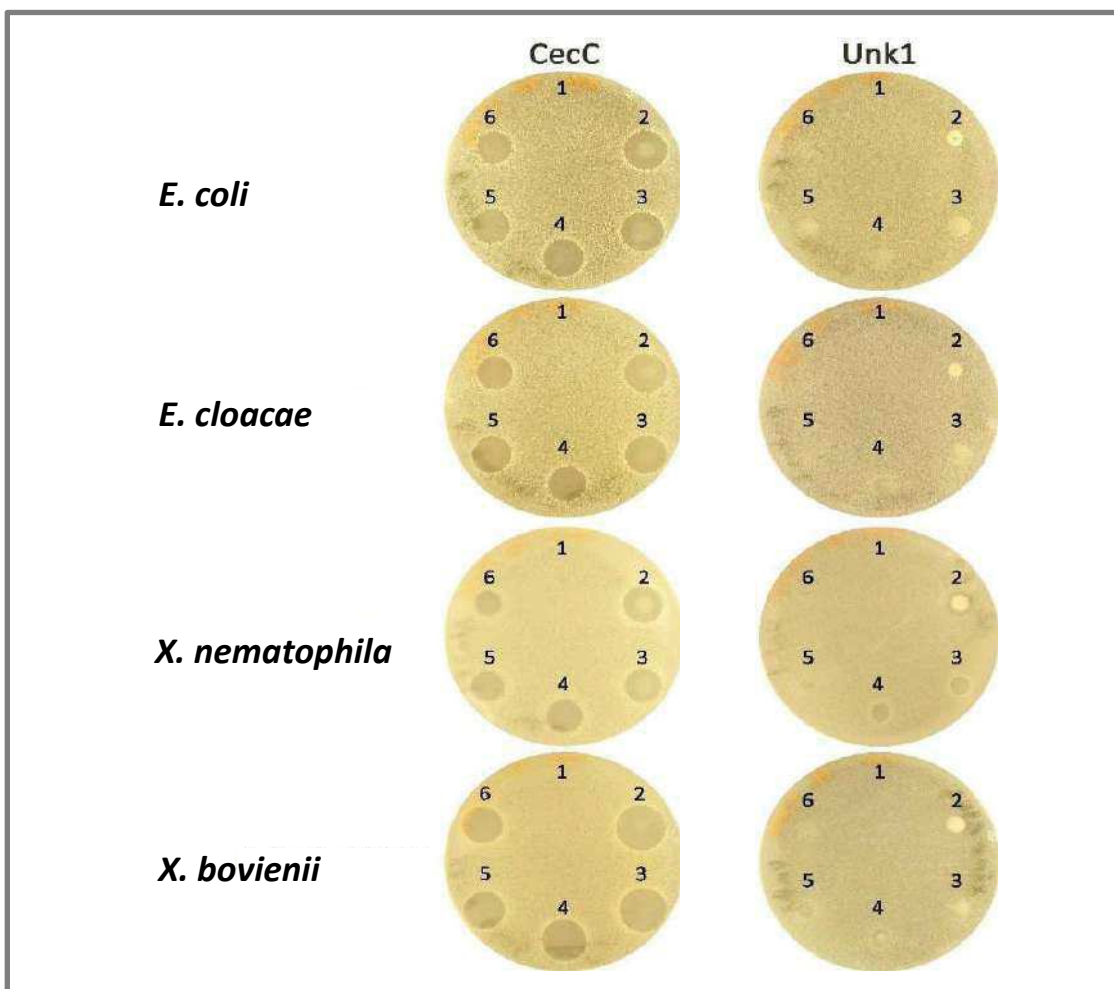
impliquées dans divers processus développementaux et immunitaires, incluant par exemple l'activation de la voie Toll en réponse à un danger ou encore les réponses antivirales (Homma *et al.*, 2013 ; Saikhedkar *et al.*, 2015 ; Issa *et al.*, 2018). Une correspondance non- significative (e-value de 0,17) avec un domaine CHAP a également été identifiée pour GBH3. Il s'agit d'un domaine caractéristique d'amidohydrolases et de protéases à cystéine de bactéries, archées, bactériophages et protozoaires, qui sont généralement impliquée dans la dégradation du peptidoglycane (Tableau 1).

En résumé, l'analyse des séquences protéiques UNKs et GBHs a révélé que l'ensemble des UNKs et 2 des 3 GBHs pourraient coder des facteurs sécrétés. Tandis que les UNKs sont hétérogènes et ne semblent pas correspondre à des familles de protéines ou de PAMs connues, les GBHs présentent d'importantes homologues de séquence et pourraient correspondre à des protéases à cystéine.

## **2. Evaluation *in vitro* des activités antibactériennes d'UNK1 et UNK4**

Afin d'étudier de façon plus directe les fonctions des UNKs, nous avons fait produire le peptide UNK1 (complet) par synthèse chimique et nous avons produit la protéine UNK4 (dépourvue de peptide signal) en système bactérien. Les UNKs étant fortement surexprimés dans le corps gras et possédant des peptides signaux, une hypothèse vraisemblable est qu'ils agissent en tant qu'effecteurs de l'immunité de l'insecte. Pour des raisons pratiques, le premier aspect que nous avons voulu tester dans le cadre de l'étude de la réponse au CNB est celui de leurs éventuelles activités vis-à-vis des bactéries à Gram négative et de *X. nematophila*. Nous avons pour cela réalisé des dépôts de différentes dilutions de peptides sur des tapis bactériens de *X. nematophila* et de diverses bactéries à Gram négative, puis nous avons observé leurs effets sur la croissance des bactéries.

Les résultats obtenus pour le peptide UNK1 montrent que la suspension brute et ses dilutions au demi, au quart et au 8<sup>ème</sup> induisent une inhibition de la croissance de *Xenorhabdus nematophila* (souche F1) (Figure 21). Ces dilutions correspondent à une plage de concentrations de 0.7 à 5.9 mM (voir Matériels et Méthodes 3.). L'activité semble néanmoins être inférieure à celle de la Cécropine C, qui inhibe la croissance de la bactérie à partir d'une concentration de 0.3 mM (dilution au 16<sup>ème</sup> de la suspension), avec des diamètres de halos d'inhibition plus importants (Tableau 3). L'absence de halo d'inhibition pour le dépôt du



**Figure 21 : Test de l'activité antibactérienne du peptide UNK1 vis-à-vis des bactéries à Gram négative.** L'activité antibactérienne du peptide synthétique UNK1 a été évaluée par antibiogramme à l'aide des bactéries *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Xenorhabdus nematophila* F1 et *Xenorhabdus bovienii* CS03. Le peptide synthétique Cécropine C (CecC) a été utilisé comme contrôle positif. (1) tampon de solubilisation dépourvu de peptide; (2) suspension brute (5.9 mM pour UNK1 et 5.5 mM pour CecC); (3) dilution par 2 de la suspension; (4) dilution par 4 de la suspension; (5) dilution par 16 de la suspension. Les diamètres des halos d'inhibition sont indiqués dans le tableau 3.

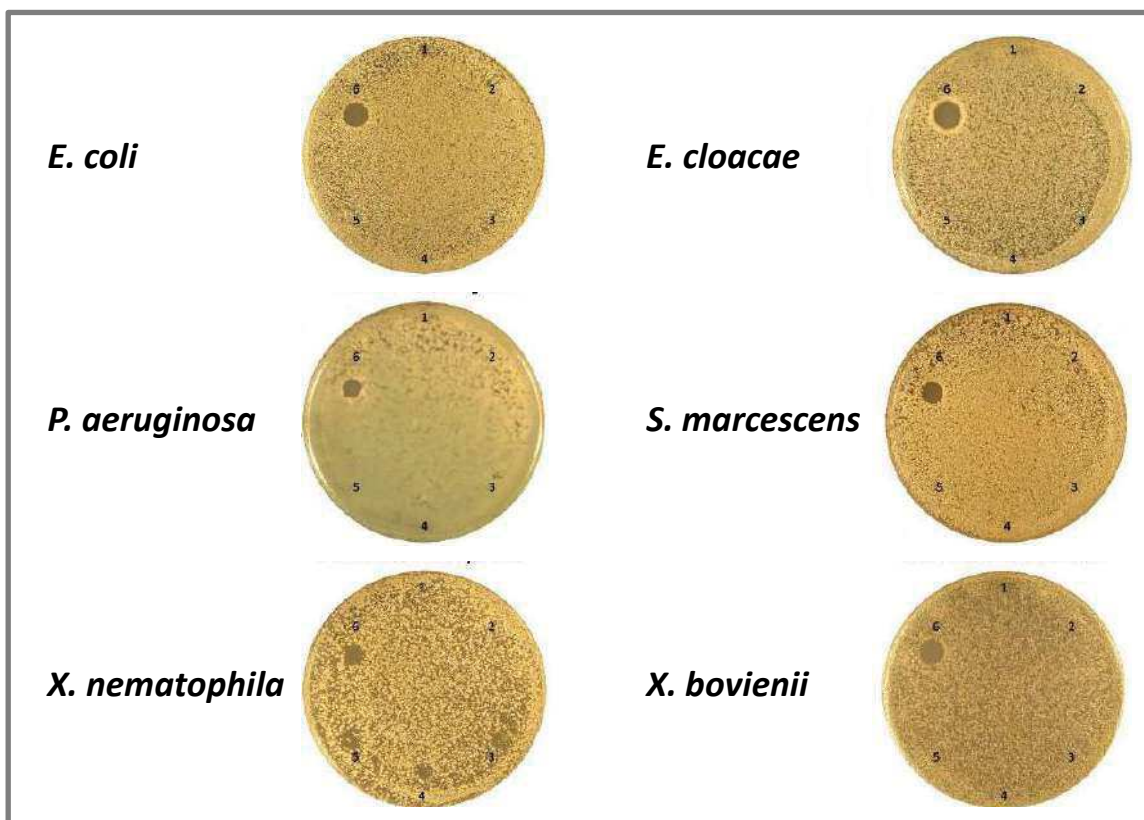
**Tableau 3 : Diamètres des halos d'inhibition de croissance observés après dépôt du peptide UNK1 sur tapis bactérien.** Les diamètres sont indiqués en mm. La Cécropine C a été utilisée comme contrôle positif.

Bactérie Peptide	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Xenorhabdus nematophila</i> F1		<i>Xenorhabdus bovienii</i> CS03	
	CecC	UNK1	CecC	UNK1	CecC	UNK1	CecC	UNK1
<b>Brut</b>	15.2	-	14.6	-	14.0	8.9	17.8	-
<b>1/2</b>	15.2	-	14.0	-	12.7	6.3	16.5	6.3
<b>1/4</b>	14.0	-	12.7	-	12.1	6.3	15.2	6.3
<b>1/8</b>	12.7	-	12.7	-	11.4	6.3	14.6	6.3
<b>1/16</b>	11.4	-	12.1	-	8.9	-	14.0	-

tampon de solubilisation d'UNK1 suggère que le peptide est bien responsable de cette activité. Toutefois, la pureté du peptide n'étant que de 59% (voir Matériels et Méthodes 3.), il est possible que d'autres protéines ou substances soient impliquées dans cette activité. L'activité antibactérienne de la suspension d'UNK1 a également été testée sur les bactéries à Gram négative *X. bovienii* (souche CS03), *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*. Les résultats obtenus indiquent qu'elle possède une activité similaire à celle observée pour *X. nematophila* (souche F1) vis-à-vis de *X. bovienii* (souche CS03). Cette activité est visible pour les dilutions au demi, au quart et au 8<sup>ème</sup> de la suspension, mais pas pour la suspension brute, probablement en raison d'une mauvaise solubilisation du peptide (Figure 21, Tableau 3). Contrairement à la Cécropine C, qui présente des activités similaires vis-à-vis de toutes les bactéries testées, la suspension d'UNK1 ne présente aucune activité vis-à-vis des bactéries n'appartenant pas au genre *Xenorhabdus* (Figure 21).

Les résultats obtenus pour la protéine UNK4 indiquent que les dilutions au quart, au 16<sup>ème</sup> et au 64<sup>ème</sup> de la suspension inhibent la croissance de *X. nematophila* (souche F1) (Figure 22 ; Tableau 4). Ces dilutions correspondent à des concentrations de l'ordre de 30 à 1.8  $\mu\text{M}$  (voir Matériels et Méthodes 4. b.). L'activité de la suspension semble légèrement inférieure à celle obtenue pour la Cécropine C, qui n'a été mesurée que pour la dilution au 16<sup>ème</sup> de la suspension de PAM. Tout comme l'UNK1, l'UNK4 n'est pas pur au sein de la suspension, qui comprend notamment des contaminations par d'autres protéines (Figure 17B). D'autres facteurs pourraient donc être impliqués dans cette activité malgré l'absence de halo d'inhibition pour le dépôt correspondant au tampon d'élution de la protéine UNK4 recombinante. L'activité d'UNK4 a également été testée vis-à-vis des bactéries à Gram négative *X. bovienii* (CS03), *E. coli*, *E. cloacae* ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia entomophila*. Aucune activité antibactérienne n'a été détectée vis-à-vis de ces bactéries quelle que soit la dilution de la suspension d'UNK4 (Figure 22).

En résumé, l'analyse des effets sur la croissance des bactéries à Gram négative du peptide UNK1 et de la protéine UNK4 produits suggère qu'UNK1 est spécifiquement actif vis-à-vis des bactéries du genre *Xenorhabdus* et qu'UNK4 est spécifiquement actif contre *X. nematophila*. Ces expériences préliminaires nécessitent toutefois d'être répétées dans des conditions plus standardisées, et avec des suspensions pures d'UNK1 et d'UNK4 pour aboutir à des conclusions solides.



**Figure 22 : Test de l'activité antibactérienne de la protéine UNK4 vis-à-vis des bactéries à Gram négative.** L'activité antibactérienne de la protéine recombinante UNK4 a été évaluée par antibiogramme à l'aide des bactéries *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. marcescens*, *Xenorhabdus nematophila* F1 et *Xenorhabdus bovienii* CS03. (1) tampon d'éluat à 250 mM d'imidazole; (2) éluât d'UNK4 brut (0.12 mM), (3) éluât d'UNK4 dilué par 4; (4) éluât d'UNK4 dilué par 16; (5) éluât d'UNK4 dilué par 64; (6) Suspension de CecC à 0.3 mM utilisée comme contrôle positif. Les diamètres des halos d'inhibition sont indiqués dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Diamètres des halos d'inhibition de croissance observés après dépôt de la protéine UNK4 sur tapis bactérien.** Les diamètres sont indiqués en mm. La Cécropine C a été utilisée comme contrôle positif.

Bactérie Peptide/Protéine	<i>Escherichia coli</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CecC	Unk4	CecC	Unk4	CecC	Unk4
Brut		-		-		-
1/4		-		-		-
1/16		8.8		9.8		6.2
1/64		-		-		-

Bactérie Peptide/Protéine	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Xenorhabdus nematophila</i> F1		<i>Xenorhabdus bovienii</i> CS03	
	CecC	Unk4	CecC	Unk4	CecC	Unk4
Brut		-		-		-
1/4		-		-		-
1/16		7.7		7.2		8.8
1/64		-		-		-



## C. Discussion

La présente étude constitue l'amorçage de la caractérisation fonctionnelle de deux clusters de gènes inconnus, les *UNKs* et les *GBHs*, fortement surexprimés chez *S. frugiperda* en réponse à l'infection par le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila*.

L'étude des séquences des 3 gènes *GBHs* a révélé qu'ils possèdent des structures classiques de gènes eucaryotes et qu'ils semblent coder des protéines homologues entre elles. Parmi elles, *GBH1* et *GBH3* présentent un probable peptide signal et *GBH2* et *GBH3* présentent une séquence caractéristique de protéase à cystéine de type Papaine. Chez les insectes, cette famille de protéines inclut les Cathepsines B et L ainsi que la Cathepsine 26-29-p de *D. melanogaster*. Les Cathepsines B et L sont exprimées dans différents tissus, où elles peuvent être intra- ou extracellulaires. Elles participent notamment à la libération des réserves nutritives chez l'embryon (Medina *et al.*, 1988 ; Cho *et al.*, 1999), à la mue (Liu *et al.*, 2006), à la dégradation des tissus des insectes lors de la nymphose (Saikhedkar *et al.*, 2015), à la digestion des nutriments (Koo *et al.*, 2008 ; Waniek *et al.*, 2012), à l'induction de processus d'autophagie et d'apoptose ainsi qu'à la réponse antivirale (Saikhedkar *et al.*, 2015). La cathepsine plasmatique 26-29-p de *D. melanogaster* est quant à elle principalement connue pour son rôle dans l'activation de la voie Toll en réponse à des protéases exogènes (Issa *et al.*, 2018). Ce type de protéine peut donc être impliqué dans une grande variété de processus, ce qui ne permet pas d'émettre d'hypothèse précise sur leurs fonctions dans le cadre de la réponse au CNB. Dans le cas de *GBH3*, une faible correspondance avec un domaine CHAP a également été identifiée. Ce domaine est caractéristique de protéines possédant des activités amidasique et/ou protéasique impliquées dans la dégradation du peptidoglycane (Bateman and Rowlings, 2003). Dans le cadre de la réponse au CNB, une telle activité pourrait intervenir dans la destruction de *X. nematophila* ou dans la régulation de la réponse immunitaire à la bactérie. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que nous avons montré dans l'article 2 que les *GBHs* sont principalement surexprimés en réponse au symbiote bactérien. Un autre aspect intéressant est que le domaine CHAP a uniquement été retrouvé chez des procaryotes, des bactériophages et des protozoaires (Bateman and Rowlings, 2003). Dans l'article 1, nous avons émis l'hypothèse d'une acquisition des *GBHs* par transfert horizontal de gènes bactériens chez les lépidoptères. La présence d'un domaine fonctionnel habituellement non-identifié chez les eucaryotes supérieurs, mais retrouvé chez diverses bactéries et

bactériophages au sein de GBH3 ne serait pas surprenante dans ce cas de figure. Pour aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle de GBH3 nous avons fait produire la protéine en cellules d'insectes sur la base de sa séquence théorique. L'échantillon de protéine reçu n'a toutefois pas pu être utilisé, principalement en raison de contaminations bactériennes. Nous envisageons donc de produire nous-mêmes la protéine en système bactérien et dans des conditions stériles, afin d'être en mesure de tester ses potentielles activités enzymatiques et antibactériennes. Dans le cas où cette protéine aurait une fonction analogue à celle de la Cathepsine 26-29-p de *D. melanogaster*, nous envisageons également de procéder à des co-injections de protéases connues pour cliver Persephone chez *D. melanogaster* avec ou sans anticorps anti-GBH3 et de mesurer ensuite l'effet de l'inactivation de GBH3 sur l'expression de gènes immunitaires.

L'étude bioinformatique du cluster des *UNKs* a tout d'abord montré que les prédictions des 5 gènes *UNKs* semblent valides malgré une légère incertitude pour *UNK3*. Elle a également montré que les protéines *UNKs* prédites sont hétérogènes en taille et en séquence, mais semblent toutes posséder un peptide signal. Les analyses réalisées n'ont à ce stade pas permis d'identifier de domaine fonctionnel ou de séquence caractéristique de famille de protéines connue de façon fiable. Par ailleurs, l'analyse des séquences des peptides *UNK1* et *UNK3* a révélé que leurs compositions en acides aminés et leurs structures ne correspondent pas à celles des PAMs connus chez les insectes. Les tests d'activité réalisés sur le peptide *UNK1* (complet) et la protéine *UNK4* (dépourvue de peptide signal) ont en revanche révélé des pistes de travail intéressantes. En effet, les tests réalisés sur des échantillons de bactéries à Gram négative suggèrent qu'*UNK1* est spécifiquement actif contre les bactéries du genre *Xenorhabdus* et qu'*UNK4* est spécifiquement actif contre *X. nematophila*. Dans l'article 2, nous avons montré (en annexe) que le cluster des *UNKs* n'est retrouvé que chez des lépidoptères de la famille Noctuidae. La plupart des insectes de cette famille, dont *S. frugiperda*, sont retrouvés à la surface ou dans les couches superficielles du sol à leurs stades larvaires et/ou lors de leur métamorphose (Sparks, 1979 ; Oliver, 1981). Le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* utilisant la stratégie de chasse de l'embuscade et ayant pour hôtes naturels différentes espèces de lépidoptères et coléoptères (voir Introduction, section B/2.), une co-évolution entre *S. frugiperda* et le CNB paraît plausible et pourrait expliquer cette spécificité. Dans l'article 2, nous avons également montré que les gènes *UNKs* sont

spécifiquement induits par le partenaire nématode du CNB. La découverte d'une activité antibactérienne de ces gènes est donc surprenante, mais encore une fois vraisemblable dans un contexte de co-évolution insecte-CNB. Malgré leur grand intérêt pour l'étude des réponses immunitaires des insectes aux CNBs, ces résultats sont encore très préliminaires et doivent donc être confirmés et précisés par de nombreuses expériences complémentaires. Tout d'abord, la pureté d'UNK1 et d'UNK4 dans les suspensions utilisées n'étant pas garantie, il est possible que d'autres facteurs soient impliqués dans les activités qui ont été observées. Des étapes de purification supplémentaires des UNK1 et 4 sont donc requises pour aboutir à des conclusions claires sur leurs activités. Par ailleurs, nous n'avons pas de preuve qu'UNK1 et UNK4 soient réellement produits et sécrétés chez l'insecte et le cas échéant, nous ne connaissons pas avec certitude la séquence des peptides matures. Des Western blots sur les protéines plasmatiques de l'insecte et des séquençages selon la méthode d'Edman (Edman, 1950) pourraient permettre de clarifier ces points et d'utiliser des molécules adaptées pour réaliser de nouveaux tests d'activité. De la même manière, l'étiquette histidine de la protéine recombinante UNK4 n'a pas été supprimée avant les tests réalisés lors de la présente étude. Il serait plus rigoureux d'effectuer une digestion par la thrombine pour la supprimer (voir Matériels et Méthodes 4. b.) avant de réaliser de nouveaux tests. Un autre point à préciser rapidement pour aboutir à des conclusions claires concernant l'implication des UNK1 et 4 dans la réponse de l'insecte au CNB est celui de leurs éventuelles activités vis-à-vis du partenaire nématode. Pour tester ces activités nous envisageons des tests de mobilité (Nitao *et al.*, 1999) sur *S. carpocapsae* et sur d'autres nématodes, ainsi que des tests de liaison au nématode ou à des constituants de sa cuticule. Enfin, les UNKs étant très hétérogènes, les fonctions de chaque gène du cluster devront être étudiées afin d'identifier l'ensemble des participations possibles du cluster aux réponses de l'insecte au CNB.

Pour aller plus loin dans l'analyse du dialogue entre chaque membre du CNB et le système immunitaire de *S. frugiperda*, les deux derniers points que nous souhaiterions éclaircir pour les UNKs et les GBHs sont (i) le devenir des peptides et protéines après infection, qui pourra être étudié par Western Blot au cours du temps post-infection et (ii) les voies d'induction transcriptionnelle des gènes. Pour ce dernier aspect, les méthodes bioinformatiques d'identification de motifs de fixation de facteurs de transcription semblent être insuffisantes. Nous envisageons donc d'utiliser des approches de biologie moléculaire, tels que le « foot

printing » et le « promoter bashing » pour identifier des séquences régulatrices (Kamvysselis, 1999), ou encore le CHIPseq (Raha *et al.*, 2010) pour identifier les facteurs de transcription impliqués.

En conclusion, nos résultats préliminaires sont prometteurs et suggèrent que la caractérisation fonctionnelle des *UNKs* et des *GBHs* pourrait être très informative aussi bien du point de vue de l'étude des bases moléculaires des réponses immunitaires des lépidoptères aux CNBs, que de celui de l'étude de l'évolution des répertoires de gènes immunitaires chez les insectes, avec des possibilités de transfert horizontal de gènes bactériens et de spécialisations très fortes de certains effecteurs. De nombreux travaux complémentaires et de validation de nos premiers résultats doivent néanmoins être réalisés avant de pouvoir aborder les questions relatives à ces deux aspects.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de la présente étude était de participer au développement de notre connaissance des aspects moléculaires des réponses immunitaires des insectes aux complexes nématobactériens (CNBs) entomopathogènes au travers d'une analyse détaillée et contextualisée des réponses immunitaires induites face au CNB *Steinernema carpocapsae-Xenorhabdus nematophila* chez le modèle lépidoptère ravageur de cultures *Spodoptera frugiperda*. Conformément à ses objectifs initiaux, cette étude a permis d'obtenir une base de travail de qualité pour la caractérisation moléculaire des réponses immunitaires de l'insecte au CNB, et par la suite du dialogue entre le pathogène et son hôte. Dans un contexte plus global, elle a également permis d'effectuer des avancées d'ordre méthodologique et d'identifier de nouvelles pistes de travail pour l'identification des facteurs moléculaires influençant la réussite ou l'échec de l'établissement du parasitisme des CNBs. L'ensemble de ces aspects seront discutés de façon détaillée dans cette dernière partie.

## **I. Apports méthodologiques pour l'analyse descriptive des réponses immunitaires des insectes aux infections par les complexes nématobactériens entomopathogènes**

Nous avons débuté cette étude par une analyse descriptive topologique des réponses immunitaires de l'insecte à l'infection par le CNB. Pour se faire, nous avons utilisé une approche transcriptomique sur tissus immunocompétents pour décrire de façon globale les réponses immunitaires induites lors de l'infection par le CNB. Nous avons ensuite utilisé une approche d'infection par injection du CNB, du nématode axénique ou du symbiote bactérien pour identifier les participations respectives de chaque partenaire du CNB dans les réponses immunitaires induites. La première approche n'avait jamais été utilisée dans le cadre d'une description moléculaire des réponses immunitaires d'un insecte à un CNB. La seconde approche correspond à l'optimisation de méthodes utilisées par d'autres équipes (Hallem *et al.*, 2007 ; Peña *et al.*, 2015 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017) via un protocole d'infection par injection. Dans cette section, je discuterai des apports et des limites de chacune de ces méthodologies.

## **A. Analyse topologique des réponses transcriptomiques à l'infection par le complexe nématobactérien**

Dans le cadre de notre étude, la description des réponses transcriptomiques des trois principaux tissus immunocompétents confrontés au CNB a permis de décrire avec précision les réponses immunitaires induites dans le corps gras ainsi que dans les hémocytes au temps 15 heures post-exposition au CNB. Comparé aux études transcriptomiques sur insecte entier menées sur d'autres modèles d'interaction CNB-insecte, les types de réponses immunitaires identifiés sont globalement similaires et incluent des réponses antimicrobiennes, de mélanisation, de coagulation ainsi que des réponses cellulaires (Arefin *et al.*, 2014 ; Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017 ; An *et al.*, 2017). Notre étude a toutefois permis d'identifier un nombre plus important de gènes DE impliqués dans chacune de ces réponses, ce qui s'explique d'une part par une meilleure résolution et d'autre part par une identification facilitée des gènes DE susceptibles d'intervenir dans des processus immunitaires. Ces deux améliorations sont particulièrement flagrantes dans le cas des hémocytes, qui sont faiblement représentés à l'échelle de l'insecte entier et dont les réponses peuvent faire intervenir des gènes impliqués dans divers processus biologiques au niveau d'autres types cellulaires. A titre d'exemple, l'analyse transcriptomique sur larve entière de *Drosophila melanogaster* des réponses au même CNB avait uniquement révélé la surexpression de 2 régulateurs, 2 opsonines et 2 récepteurs phagocytaires marquant l'induction de réponses cellulaires (Yadav *et al.*, 2017). La présente analyse a permis l'identification de 3 facteurs de transcription potentiellement impliqués dans l'activation et/ou la différenciation des hémocytes, de 2 récepteurs membranaires et 6 opsonines potentielles, de 6 protéines d'adhérence dont une est impliquée dans l'encapsulation et de 5 autres protéines associées à la phagocytose (Article 2). Un autre apport majeur de cette approche topologique est l'identification des participations respectives de chacun des tissus immunocompétents aux réponses immunitaires induites chez l'insecte. L'étude a par exemple révélé qu'une large gamme de peptides antimicrobiens (PAMs) sont surexprimés dans les hémocytes en réponse à l'infection (Articles 1 et 2), ce qui n'est pas systématiquement observé chez les insectes (Bartholomay *et al.*, 2004 ; Irving *et al.*, 2005 ; Choi *et al.*, 2012 ; Gunaratna and Jiang, 2013 ; Zhang *et al.*, 2015).

Dans le cas de l'intestin moyen, la voie d'entrée principale du CNB dans nos conditions expérimentales, l'interprétation des résultats obtenus est plus complexe. L'analyse des réponses de cet organe a été réalisée à deux temps post-exposition au CNB : le temps 8 heures, qui correspond à 3 heures après les premières détections de *X. nematophila* dans l'hémocœle de l'insecte, et le temps plus avancé de 15 heures, auquel des nématodes sont encore observés dans la lumière intestinale (Articles 1 et 2). A 8 heures, nous n'avons détecté aucune réponse transcriptionnelle significative. A 15 heures, nous avons bien détecté des réponses transcriptionnelles, mais nous n'avons pu identifier que 3 gènes connus de l'immunité et 1 gène potentiellement impliqué dans la régénération de l'épithélium intestinal parmi les gènes surexprimés (Article 1). En raison des probables dommages infligés par le nématode lors de son entrée dans l'hémocœle (Toubarro *et al.*, 2009 ; Toubarro *et al.*, 2010), des réponses immunitaires plus importantes étaient attendues au niveau intestinal. Notre hypothèse pour expliquer les résultats obtenus est que la méthodologie utilisée n'était probablement pas adaptée à la complexité du fonctionnement et des réponses immunitaires de l'intestin moyen. Il a été montré chez *D. melanogaster* que l'intestin moyen peut être subdivisé en plusieurs segments distincts présentant des caractéristiques physiologiques et transcriptionnelles propres (Murakami *et al.*, 1994 ; Marianes and Spradling, 2013 ; Strand and Micchelli, 2013 ; Buchon *et al.*, 2013). L'état physiologique et le statut immunitaire de l'organe sont par ailleurs très dynamiques et varient en fonction de facteurs tels que l'avancement du développement, la perception de stress et la prise de repas (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018). Il est donc probable que la description moléculaire des réponses de l'intestin moyen nécessite l'utilisation d'approches encore plus ciblées et plus contrôlées avec, par exemple, privation de nourriture et temps d'exposition au CNB limité. Par ailleurs, la participation de l'intestin moyen aux réponses immunitaires des insectes peut impliquer des processus affectant considérablement sa physiologie (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018), ce qui pourrait induire des réponses transcriptionnelles variées et nuire à l'interprétation des données transcriptomiques. Des observations microscopiques de l'intestin moyen pourraient donc être d'une aide précieuse pour identifier ces réponses et pour faciliter l'interprétation des données transcriptomiques obtenues.

Ainsi, l'utilisation d'une approche transcriptomique sur tissus immunocompétents semble être très indiquée, en particulier pour la description précise et complète des réponses



immunitaires des hémocytes. En revanche, il semble que le gain en précision associé à l'utilisation d'une approche sur tissu soit encore insuffisant pour analyser les réponses locales aux infections par les CNBs.

## **B. Analyse comparative des réponses transcriptionnelles induites par chaque partenaire**

L'identification des parts respectives de chaque partenaire dans les réponses immunitaires induites par les CNBs a précédemment fait l'objet de deux études transcriptomiques des réponses immunitaires de *D. melanogaster* aux CNBs *S. carpocapsae-X. nematophila* et *H. bacteriophora-P. luminescens*. Dans le cadre de ces études, les insectes ont été indépendamment exposés à des infections naturelles par les CNBs et par les nématodes aposymbiotiques, ainsi qu'à des injections des symbiotes bactériens dans le cas de *H. bacteriophora-P. luminescens*. Étonnamment, la comparaison des réponses transcriptomiques induites à l'issue de ces infections a conduit à l'observation de réponses immunitaires très similaires et n'a pas permis d'identifier de façon claire les réponses imputables à chaque partenaire des deux CNBs (Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). Notre hypothèse pour expliquer ces résultats est que l'infection naturelle par les CNBs et par les nématodes aposymbiotiques pourrait conduire à des co-infections par des microorganismes issus de l'intestin de l'insecte. Dans le but de limiter cet éventuel effet, nous avons décidé pour l'étude des réponses de *S. frugiperda* au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* de procéder par injections indépendantes du CNB et de chaque partenaire dans l'hémocœle de l'insecte. Pour limiter encore les possibilités de co-infections, nous avons également utilisé des nématodes totalement dépourvus de bactéries, ce qui n'avait pas été clairement démontré dans les études réalisées sur *D. melanogaster* (Castillo *et al.*, 2015 ; Yadav *et al.*, 2017). Enfin, nous avons utilisé une approche plus ciblée, mais plus précise d'un point de vue quantitatif, de quantification relative par RT-qPCR (Costa-Silva *et al.*, 2017 ; Everaert *et al.*, 2017) sur des sélections de gènes représentatifs des réponses immunitaires identifiées lors des analyses transcriptomiques.

Cette approche a permis d'identifier de façon claire plusieurs gènes spécifiquement ou principalement induits par le nématode ou par la bactérie au sein des réponses immunitaires des hémocytes et du corps gras. Les gènes induits en réponse au partenaire bactérien incluent

majoritairement des membres de la voie Imd, des PAMs et des opsonines généralement actifs vis-à-vis des bactéries à Gram négative ainsi que quelques autres effecteurs. Les gènes induits vis-à-vis des nématodes incluent une Tétraspasmine associée à l'encapsulation, une protéase à sérine probablement impliquée dans l'induction de la mélanisation, diverses lectines, ainsi que des membres de la voie Toll dans le corps gras (Article 2). Globalement, les réponses induites par chaque partenaire dans les deux tissus semblent être très adaptées à leurs natures respectives, ce qui tend à confirmer la validité de l'approche expérimentale utilisée et sa supériorité par rapport à celle utilisée sur *D. melanogaster*.

Plus récemment, une autre équipe a utilisé une analyse transcriptomique temporelle sur larve entière du lépidoptère *Heliothis virescens* dans le but de discriminer les impacts respectifs de chaque partenaire du CNB *H. bacteriophora*-*P. temperata* sur l'induction des réponses immunitaires au cours de l'infection par le CNB (An *et al.*, 2017). Cette étude a essentiellement permis de montrer que la libération du symbiote bactérien coïncide avec la baisse des niveaux d'induction de divers gènes immunitaires, qui seraient donc principalement induits par le partenaire nématode au début de l'infection. Dans le cadre de notre étude, nous avons suivi la dynamique temporelle au cours du processus infectieux des variations d'expression des gènes représentatifs des réponses immunitaires des hémocytes et du corps gras évoqués dans le paragraphe précédent. L'analyse a essentiellement permis de montrer la stabilité de ces réponses au cours de l'infection et elle n'a pas mis en évidence de chronologie particulière dans l'induction des gènes répondant au nématode et à la bactérie (Article 2). Ces résultats suggèrent que l'approche temporelle, bien qu'informatrice dans le cadre de l'étude du dialogue avec le CNB au cours du processus infectieux, n'est probablement pas adaptée à l'identification des réponses immunitaires induites en réponse à chaque partenaire.

Ainsi, l'utilisation d'une méthode d'infection par injection de CNBs, de nématodes axéniques et de symbiotes bactériens combinée à une méthode de quantification par RT-qPCR semble permettre d'identifier avec plus de précision les réponses immunitaires induites par chaque partenaire des CNBs que les méthodes transcriptomiques temporelles ou utilisant des infections naturelles par les CNBs et par les nématodes aposymbiotiques. Cette méthodologie n'est toutefois pas encore optimale, car la quantification relative par RT-qPCR ne permet pas d'obtenir une vision globale des réponses induites par chaque partenaire ni de la façon dont

elles se combinent au cours du processus infectieux. A l'issue de ces analyses, il semble donc important de déterminer si le gain en précision qui a été observé est dépendant ou non de l'utilisation de cette méthode ciblée de quantification.

## **II. Apports de l'analyse descriptive pour l'étude détaillée du dialogue moléculaire entre le système immunitaire de *S. frugiperda* et le complexe *S. carpocapsae-X. nematophila***

L'ensemble des données recueillies au cours de l'analyse descriptive des réponses immunitaires induites chez *S. frugiperda* en réponse à l'infection par le CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* constitue une base de travail particulièrement riche pour l'étude du dialogue s'établissant entre les deux partenaires du complexe et le système immunitaire de cet hôte. Bien que la caractérisation complète du dialogue soit une perspective à long terme, plusieurs pistes de travail peuvent d'ores-et-déjà être déduites de notre analyse descriptive. Les premières s'inscrivent dans le cadre de la caractérisation fonctionnelle des interactions des gènes de l'immunité des insectes avec le CNB et les secondes s'inscrivent dans le cadre de la caractérisation des stratégies d'échappement immunitaire du CNB. Les pistes de travail les plus prometteuses sont présentées dans cette section.

### **A. Pistes de travail pour la caractérisation moléculaire de la réponse immunitaire**

L'analyse transcriptomique des réponses immunitaires induites dans les hémocytes et le corps gras a permis l'identification d'un total de plus de 132 gènes immunitaires DE lors de l'interaction avec le CNB (Article 2). Une part importante de ces gènes appartient à des voies signalétiques, processus ou familles de gènes dont les rôles dans la réponse aux CNBs entomopathogènes ont été étudiés lors de précédentes études fonctionnelles sur d'autres modèles d'interaction CNB-insecte. Parmi les gènes concernés, on retrouve par exemple des membres la voie Imd, dont l'implication dans la réponse à *X. nematophila* a été démontrée chez *D. melanogaster* (Aymeric *et al.*, 2010), des gènes impliqués dans la coagulation, dont l'implication dans la réponse au CNB *H. bacteriophora-P. luminescens* a été mise en évidence chez le même modèle (Wang *et al.*, 2010 ; HyrsI *et al.*, 2011 ; Kucerova *et al.*, 2016), ainsi que l'Hémoline et les PAMs des familles des Attacines, Cécropines et Moricines, dont les rôles

dans la réponse à la bactérie *P. luminescens* ont quant à eux été mis en évidence sur le modèle *M. sexta* (Eleftherianos *et al.*, 2006a, 2006b). Bien que la caractérisation des fonctions de ces gènes dans la réponse au CNB comporte un intérêt dans le cadre de l'étude de notre modèle d'interaction, leurs identifications ne constituent pas un apport majeur à l'étude des aspects moléculaires des réponses immunitaires des insectes aux CNBs entomopathogènes. En revanche, nous avons identifié plusieurs dizaines de gènes candidats appartenant à des familles ou à des catégories fonctionnelles dont les implications dans les réponses aux CNBs, ou au partenaire responsable de leurs surexpressions chez *S. frugiperda*, n'ont pas encore été étudiées. Parmi elles, les trois catégories qui nous paraissent les plus intéressantes dans le contexte scientifique actuel sont celles des Lectines de type C (CLECT), des Galectines et des Insect metalloproteinase inhibitors (IMPIs). Les CLECT sont des protéines de reconnaissance membranaires ou solubles qui peuvent être impliquées dans la reconnaissance de divers agents infectieux et participer à l'induction de réponses immunitaires variées, telles que la phagocytose, l'encapsulation ou encore la mélanisation (Xia *et al.*, 2018). Les galectines présentent des propriétés adhésives similaires, mais leurs fonctions dans l'immunité des insectes n'ont pas encore été explorées (Pace and Baum, 2002). Nos résultats indiquent qu'aussi bien dans les hémocytes que dans le corps gras, des représentants de ces deux familles sont surexprimés spécifiquement en réponse au partenaire nématode. Ce résultat est particulièrement intéressant en raison d'une part d'un déficit de connaissances concernant les molécules impliquées dans la reconnaissance des nématodes chez les insectes, et d'autre part de la capacité de la lectine de type C IML-2 de *M. sexta* à lier la cuticule des nématodes *Caenorhabditis elegans* et *Brugia malayi* (Yu and Kanost, 2004). Les IMPIs sont des inhibiteurs de métalloprotéases dont les fonctions ont principalement été étudiées chez le modèle lépidoptère *Galleria mellonella*. Il a été montré chez ce modèle que les gènes codant des IMPIs sont surexprimés en réponse à l'injection de protéases exogènes et qu'ils présentent des activités vis-à-vis de diverses protéases issues d'organismes pathogènes (Vilcinskas and Wedde, 2002). Sachant que *S. carpocapsae* et *X. nematophila* sécrètent tous deux des métalloprotéases au cours du processus infectieux (Caldas *et al.*, 2002 ; Hao *et al.*, 2010 ; Jing *et al.*, 2010 ; Massaoud *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2017 ; Chang *et al.*, 2019) et que certaines d'entre elles participent à la suppression des défenses de l'hôte (Caldas *et al.*, 2002 ; Felföldi *et al.*, 2009 ; Massaoud *et al.*, 2011 ), l'analyse des effets des IMPIs identifiés sur la survie de

l'insecte à l'infection nous paraît être d'un intérêt majeur pour l'étude du dialogue entre le CNB et le système immunitaire.

Deux autres catégories de gènes particulièrement intéressantes sont celles des *Unknowns* (*UNKs*) et des *Genes with bacterial homology* (*GBHs*). Ces catégories correspondent en fait à deux clusters de gènes inconnus dont plusieurs membres ont été identifiés parmi les gènes les plus surexprimés en réponse au CNB (Article 1). En dehors de leurs fortes inductions au niveau des trois tissus immunocompétents, l'hypothèse de la participation de ces gènes aux réponses immunitaires de l'insecte découle (i) de leurs localisations génomiques proches de gènes immunitaires (Article 1), (ii) de leurs dynamiques d'expression similaires à celles des gènes immunitaires surexprimés en réponse au CNB et (iii) de leurs profils d'induction partenaire-spécifiques, avec surexpression des *UNKs* en réponse au nématode et surexpression des *GBHs* en réponse à la bactérie (Article 2). La méconnaissance de ces gènes pourrait en partie s'expliquer par leurs restrictions à l'ordre des lépidoptères dans le cas des *GBHs* (Article 1) et à la famille des noctuelles dans le cas des *UNKs* (Articles 1 et 2). Ces spécificités en font des candidats particulièrement intéressants dans le cadre de la recherche de facteurs déterminant les variations de sensibilités aux CNBs au sein de la diversité des insectes.

Les données recueillies lors de notre analyse détaillée des réponses immunitaires induites chez *S. frugiperda* après infection par le CNB ont donc permis l'identification d'une grande diversité de gènes candidats, incluant plusieurs familles ou clusters de gènes dont les fonctions dans les réponses aux CNBs n'ont encore jamais été explorées. La recherche de leurs éventuelles fonctions dans le cadre de la réponse au CNB sera toutefois un travail au long cours, notamment en raison d'importants verrous technologiques empêchant l'utilisation d'approches de génétique inverse telles que celles précédemment utilisées sur les modèles *D. melanogaster* et *M. sexta* (voir Introduction Partie III, sections A/2. et B/2.). En attendant la levée de ces verrous, ces fonctions pourront être étudiées via des approches alternatives, telles que des tests d'activité sur des protéines purifiées ou produites en système hétérologue, des injections des protéines dans l'hémocœle de l'insecte ou encore leurs inactivations *in vivo* par injection d'anticorps dans l'hémocœle de l'insecte.

## **B. Pistes de travail pour l'étude des stratégies d'échappement immunitaire du complexe nématobactérien**

Les stratégies d'échappement immunitaires du CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* ont été très fortement étudiées dans le cadre de leurs interactions avec diverses espèces d'insectes. Ces études ont conduit à l'identification d'un grand nombre de stratégies immunoévasives et immunosuppressives mises en œuvre par l'un ou l'autre des partenaires. Il a par exemple été montré que la cuticule du nématode est non-immunogène chez le coléoptère *Rhynchophorus ferrugineus* (Mastore *et al.*, 2014 ; Binda-Rossetti *et al.*, 2016), et que le nématode libère des facteurs inhibant la coagulation, la mélanisation, les réponses cellulaires et certaines réponses antimicrobiennes chez différents modèles lépidoptères (Gotz *et al.*, 1981 ; Balasubramanian *et al.*, 2009 ; Balasubramanian *et al.*, 2010 ; Toubarro *et al.*, 2013a, 2013b). Il a par ailleurs été montré chez divers modèles lépidoptères que la bactérie sécrète des facteurs cytotoxiques pour les hémocytes et/ou supprimant la production de réponses cellulaires via une inhibition de l'activité de la Phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) (Park and Kim, 2000 ; Brillard *et al.*, 2001 ; Ribeiro *et al.*, 2003 ; Park and Kim, 2003 ; Khandelwal *et al.*, 2004 ; Cowles and Goodrich-Blair, 2005 ; Park and Stanley, 2006 ; Banerjee *et al.*, 2006 ; Shrestha and Kim, 2007 ; Vigneux *et al.*, 2007 ; Chandra *et al.*, 2008 ; Eom *et al.*, 2014 ; Brivio *et al.*, 2018). La bactérie libère également de puissants inhibiteurs de la PO (Park and Kim, 2003 ; Song *et al.*, 2011 ; Crawford *et al.*, 2012 ; Eom *et al.*, 2014) et elle supprime l'activité antimicrobienne de l'hémolymphe de divers insectes (Duvic *et al.*, 2012 ; Binda-Rossetti *et al.*, 2016). Chez les lépidoptères, cette suppression peut faire intervenir un mécanisme de répression transcriptionnelle (Ji and Kim, 2004 ; Park *et al.*, 2007 ; Hwang *et al.*, 2013 ; Darsouei *et al.*, 2017) ainsi que des protéases dégradant les PAMs (Caldas *et al.*, 2002).

Dans le cadre de notre analyse descriptive, nous avons observé des réponses transcriptionnelles donnant des indications sur les stratégies que le CNB utilise ou non sur le modèle *S. frugiperda*. Nous avons également identifié quelques pistes de travail qui pourraient permettre de mieux caractériser des stratégies déjà identifiées.

Tout d'abord et comme indiqué précédemment, l'analyse des réponses induites par chaque partenaire a conduit à l'identification de plusieurs gènes surexprimés en réponse au partenaire nématode. Globalement, ces gènes semblent correspondre à des réponses classiquement induites par ce type de pathogène, telles que l'encapsulation et la mélanisation

(Article 2). Ce résultat suggère que le nématode est bien reconnu par le système immunitaire de *S. frugiperda* et que des réponses immunitaires adaptées sont induites en retour. Il pourrait être intéressant de déterminer si contrairement à ce qui a été observé chez le coléoptère *R. ferrugineus*, le système immunitaire de *S. frugiperda* reconnaît le nématode par l'intermédiaire de sa cuticule ou bien si le nématode est reconnu par d'autres moyens, comme par la perception de facteurs sécrétés au cours du processus infectieux. Notamment, la surexpression de membres de la voie Toll dans le corps gras en réponse à *S. carpocapsae* pourrait suggérer que le nématode induit des réponses immunitaires par une voie analogue à la voie du danger médiatisée par la protéase à sérine Persephone, qui active la voie Toll en réponse à des protéases exogènes chez *D. melanogaster* (Issa *et al.*, 2018). Des expériences d'injection de nématodes tués et de produits de sécrétion du nématode devraient permettre de clarifier ce point.

L'analyse a également révélé que le CNB, tout comme *X. nematophila* seule, induit une forte surexpression de PAMs chez l'insecte (Articles 1 et 2). Ce résultat suggère que les stratégies de répression transcriptionnelle de l'expression des PAMs de *X. nematophila* sont inactives ou loin d'être suffisantes pour expliquer l'échappement de la bactérie aux réponses antimicrobiennes de *S. frugiperda*. Néanmoins, l'analyse des réponses transcriptomiques de l'insecte au temps 15 heures post-exposition au CNB a également révélé la sous-expression de plusieurs activateurs et cofacteurs du facteur de transcription Relish de la voie Imd (Article 2). Bien qu'il puisse s'agir de simples mécanismes de régulation ou de spécification de la réponse immunitaire de l'insecte, une implication dans le mécanisme de suppression transcriptionnelle de l'expression des PAMs précédemment mis en évidence sur d'autres modèles est une possibilité méritant d'être explorée. Pour se faire, la démarche la plus simple serait de commencer par rechercher et purifier les molécules produites par la bactérie qui sont responsables de cet effet immunosuppresseur et d'observer leurs éventuels effets sur l'expression des activateurs et cofacteurs de Relish après injection dans le corps de l'insecte.

### **III. Pistes de réflexion et perspectives ouvertes par l'amorçage de la caractérisation du cluster des *Unknowns***

L'étude des aspects moléculaires des réponses immunitaires des insectes aux CNBs entomopathogènes s'est jusqu'à présent cantonnée à des analyses transcriptionnelles et

fonctionnelles à visées essentiellement descriptives. Ces études ont en grande partie été menées sur le diptère modèle *D. melanogaster*, afin de faciliter l'identification de voies signalétiques, familles de protéines de reconnaissance et groupes d'effecteurs susceptibles d'intervenir dans les réponses immunitaires aux CNBs. Elles ont également été menées sur des modèles lépidoptères ravageurs de cultures, d'une part dans le but de développer cette démarche sur une plus grande diversité d'insectes, mais aussi dans le but de caractériser les interactions des CNBs entomopathogènes avec des insectes d'intérêt agronomique. En aval de ces approches descriptives, l'un des principaux objectifs est d'identifier, à l'échelle moléculaire, des facteurs influençant l'échec ou la réussite des CNBs face au système immunitaire des insectes.

Dans ce contexte, nous avons amorcé la caractérisation fonctionnelle du cluster des *UNKs*, un cluster de cinq gènes inconnus restreint à la famille des noctuelles qui est fortement et précocément surexprimé chez *S. frugiperda* en réponse au CNB *S. carpocapsae-X. nematophila* (Article 1). Nos résultats préliminaires indiquent que les produits de deux gènes du cluster (le peptide UNK1 et la protéine UNK4), qui comprend 5 gènes spécifiquement surexprimés en réponse au partenaire nématode (Article 2), présentent des activités antibactériennes spécifiquement dirigées contre des bactéries du genre *Xenorhabdus* (voir Travaux de thèse Partie III, section B. 2.). Si ces conclusions venaient à être confirmées, la découverte des *UNKs* pourrait constituer un apport majeur pour la poursuite de l'étude des facteurs influençant le succès ou l'échec des CNBs face au système immunitaire des insectes.

Tout d'abord, la spécificité de ces potentiels effecteurs vis-à-vis des bactéries du genre *Xenorhabdus* et leurs surexpressions en réponses au partenaire nématode suggèrent fortement qu'ils ont été acquis et/ou que leurs propriétés ont été impactées par une coévolution avec des CNBs de type *Steinernema-Xenorhabdus*. Cette hypothèse paraît vraisemblable aux vues des spectres d'hôtes naturels de plusieurs CNBs de ce type, dont le couple *S. carpocapsae-X. nematophila* (Peters, 1996). Dans ce cas de figure, la coévolution aurait conduit à l'apparition d'une réponse immunitaire tenant compte de la dualité du pathogène, avec anticipation de la libération du partenaire bactérien via la détection du partenaire nématode, ce qui n'a encore jamais été mis en évidence. Dans le cas des *UNKs*, les effecteurs immunitaires issus de cette coévolution ne présenteraient pas d'homologie de séquence avec des effecteurs connus de l'immunité des insectes (voir Travaux de thèse Partie



III, section B/ 1.). Etant donnée l'abondance des effecteurs antibactériens chez les insectes, notamment au sein de l'immunogénome de *S. frugiperda* et d'autres noctuelles (Xiong *et al.*, 2015 ; Gouin *et al.*, 2017), l'apparition de tels facteurs paraît étonnante, mais elle ouvre des pistes de réflexion pour l'étude des forces évolutives conduisant à l'évolution des répertoires de gènes immunitaires chez les insectes. Par exemple, une hypothèse vraisemblable est que les diverses stratégies immunosuppressives et immunoévasives des CNBs, et plus particulièrement des CNBs à larges spectres d'hôte tels que *S. carpocapsae-X. nematophila* (Peters, 1996), conduisent à l'émergence de facteurs immunitaires atypiques qui seraient insensibles à ces stratégies.

Dans le contexte actuel de l'étude des aspects moléculaires de l'immunité anti-CNB, la découverte des *UNKs* pourrait également aider à l'élaboration de nouvelles stratégies de recherche de gènes candidats susceptibles de jouer un rôle déterminant dans le dialogue avec les CNBs. La possibilité d'acquisition et/ou de spécialisation de gènes immunitaires par co-évolution avec les CNBs met tout d'abord en évidence la pertinence de l'utilisation d'hôtes naturels des CNBs étudiés pour la découverte de nouveaux gènes candidats. Dans le cadre de la recherche de facteurs influençant la sensibilité des insectes aux CNBs, l'utilisation d'espèces phylogénétiquement proches d'hôtes naturels mais ayant acquis des résistances aux CNBs serait également très pertinente. Les pistes de réflexion évoquées dans le paragraphe précédent soulignent également l'importance de la prise en compte des gènes encore inconnus dans le cadre de la recherche de gènes candidats. La méconnaissance de ces gènes pourrait en effet être liée à deux paramètres d'intérêt : une spécialisation dans la réponse aux CNBs et une restriction à un sous-groupe d'insectes ayant co-évolué avec le CNB étudié.

En résumé, la poursuite de notre travail de caractérisation fonctionnelle du cluster des *UNKs* pourrait ouvrir d'importantes perspectives de recherche et aider à l'élaboration de stratégies plus rationnelles d'identification des facteurs moléculaires influençant la sensibilité aux CNBs au sein de la diversité des insectes. Ces stratégies pourraient faire intervenir deux démarches complémentaires. La première serait une démarche essentiellement descriptive similaire à celle utilisée jusqu'à présent, qui permettrait l'identification de voies signalétiques et de grandes familles conservées de gènes immunitaires susceptibles d'intervenir dans les réponses à chaque partenaire des CNBs. La seconde consisterait à rechercher de façon plus spécifique des gènes issus d'une co-évolution avec des CNBs d'intérêt.

# BIBLIOGRAPHIE

1. Abuhatab M, Selvan S, Gaugler R. Role of proteases in penetration of insect gut by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Nematoda, Steinernematidae). *J Invertebr Pathol.* 1995;66(2):125-30. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1074>.
2. Adams BJ, Nguyen KB. Taxonomy and systematics. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p1-33. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
3. Agaisse H, Burrack LS, Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N, Higgins DE. Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. *Science.* 2005;309(5738):1248-51. <https://doi.org/10.1126/science.1116008>.
4. Ahmad ST, Sweeney ST, Lee JA, Sweeney NT, Gao FB. Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the Toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(29):12168-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903134106>.
5. Akai H, Sato S. An ultrastructural study of the haemopoietic organs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol.* 1971;17(9):1665-76. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(71\)90062-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(71)90062-X).
6. Akhurst RJ. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp, bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J Gen Microbiol.* 1982;128:3061-5.
7. Alderwick LJ, Harrison J, Lloyd GS, Birch HL. The mycobacterial cell wall - Peptidoglycan and arabinogalactan. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2015;5(8):a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>.
8. Amcheslavsky A, Jiang J, Ip YT. Tissue damage-induced intestinal stem cell division in *Drosophila*. *Cell Stem Cell.* 2009;4(1):49-61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.016>.
9. An CJ, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang HB, Kanost MR. Functions of *Manduca sexta* hemolymph proteinases HP6 and HP8 in two innate immune pathways. *J Biol Chem.* 2009;284(29):19716-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007112>.
10. An CJ, Kanost MR. *Manduca sexta* serpin-5 regulates prophenoloxidase activation and the Toll signaling pathway by inhibiting hemolymph proteinase HP6. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010;40(9):683-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.07.001>.
11. An R, Suri KS, Jurat-Fuentes JL, Grewal PS. Dynamics of transcriptomic response to infection by the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and its bacterial symbiont *Photorhabdus temperata* in *Heliothis virescens* larvae. *Insect Mol Biol.* 2017;26(5):584-600. <https://doi.org/10.1111/imb.12321>.
12. An RS, Grewal PS. Molecular mechanisms of persistence of mutualistic bacteria *Photorhabdus* in the entomopathogenic nematode Host. *Plos One.* 2010;5(10):e13154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013154>.
13. Andersen SO. Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010;40(3):166-78. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.007>.
14. Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem Mol Biol.* 1995;25(2):153-76. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00052-J](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00052-J).
15. Ao JQ, Ling EJ, Yu XQ. *Drosophila* C-type lectins enhance cellular encapsulation. *Mol Immunol.* 2007;44(10):2541-8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.024>.
16. Aoun RB, Hetru C, Troxler L, Doucet D, Ferrandon D, Matt N. Analysis of Thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *J Innate Immun.* 2011;3(1):52-64. <https://doi.org/10.1159/000321554>.
17. Appel HM, Martin MM. Gut redox conditions in herbivorous Lepidopteran larvae. *J Chem Ecol.* 1990;16(12):3277-90. <https://doi.org/10.1007/Bf00982098>.
18. Arefin B, Kucerova L, Dobes P, Markus R, Strnad H, Wang Z, et al. Genome-wide transcriptional analysis of *Drosophila* larvae infected by entomopathogenic nematodes shows involvement of complement, recognition and extracellular matrix proteins. *J Innate Immun.* 2014;6(2):192-204. <https://doi.org/10.1159/000353734>.

19. Armitage SAO, Sun W, You XT, Kurtz J, Schmucker D, Chen W. Quantitative profiling of *Drosophila melanogaster* Dscam1 isoforms reveals no changes in splicing after bacterial exposure. Plos One. 2014;9(10):e108660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108660>.
20. Arrese EL, Soulages JL. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. Annual review of entomology. 2010;55:207-25. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>.
21. Aso Y, Kramer KJ, Hopkins TL, Whetzel SZ. Properties of tyrosinase and dopa quinone imine conversion factor from pharate pupal cuticle of *Manduca sexta* L. Insect Biochem. 1984;14(4):463-72. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90103-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90103-3).
22. Aymeric JL, Givaudan A, Duvic B. Imd pathway is involved in the interaction of *Drosophila melanogaster* with the entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens*. Mol Immunol. 2010;47(14):2342-8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.05.012>.
23. Ayyaz A, Li H, Jasper H. Haemocytes control stem cell activity in the *Drosophila* intestine. Nat Cell Biol. 2015;17(6):736-48. <https://doi.org/10.1038/ncb3174>.
24. Babcock DT, Brock AR, Fish GS, Wang Y, Perrin L, Krasnow MA, et al. Circulating blood cells function as a surveillance system for damaged tissue in *Drosophila* larvae. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105(29):10017-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709951105>.
25. Baghdiguian S, Boyer-Giglio MH, Thaler JO, Bonnot G, Boemare N. Bacteriocinogenesis in cells of *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens* - Enterobacteriaceae associated with entomopathogenic nematodes. Biol Cell. 1993;79(2):177-85. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90254-C](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90254-C).
26. Bahia AC, Oliveira JHM, Kubota MS, Araujo HRC, Lima JBP, Rios-Velasquez CM, et al. The role of reactive oxygen species in *Anopheles aquasalis* response to *Plasmodium vivax* infection. Plos One. 2013;8(2):e57014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057014>.
27. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Res. 2009;37:W202-8. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>.
28. Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. 1994;2:28-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584402>.
29. Bailey TL, Gribskov M. Methods and statistics for combining motif match scores. J Comput Biol. 1998;5(2):211-21. <https://doi.org/10.1089/cmb.1998.5.211>.
30. Bailey TL, Gribskov M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. Bioinformatics. 1998;14(1):48-54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.1.48>.
31. Bal HK, Grewal PS. Lateral dispersal and foraging behavior of entomopathogenic nematodes in the absence and presence of mobile and non-mobile hosts. Plos One. 2015;10(6):e0129887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129887>.
32. Bal HK, Taylor RAJ, Grewal PS. Ambush foraging entomopathogenic nematodes employ 'Sprinters' for long-distance dispersal in the absence of hosts. J Parasitol. 2014;100(4):422-32. <https://doi.org/10.1645/12-165.1>.
33. Balasubramanian N, Hao YJ, Toubarro D, Nascimento G, Simoes N. Purification, biochemical and molecular analysis of a chymotrypsin protease with prophenoloxidase suppression activity from the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. Int J Parasitol. 2009;39(9):975-84. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.01.012>.
34. Balasubramanian N, Toubarro D, Simoes N. Biochemical study and *in vitro* insect immune suppression by a trypsin-like secreted protease from the nematode *Steinernema carpocapsae*. Parasite Immunol. 2010;32(3):165-75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01172.x>.
35. Banerjee J, Singh J, Joshi MC, Ghosh S, Banerjee N. The cytotoxic fimbrial structural subunit of *Xenorhabdus nematophila* is a pore-forming toxin. J Bacteriol. 2006;188(22):7957-62. <https://doi.org/10.1128/Jb.00787-06>.

36. Banerjee U, Girard JR, Goins LM, Spratford CM. *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis. *Genetics*. 2019;211(2):367-417. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300223>.
37. Bartholomay LC, Cho WL, Rocheleau TA, Boyle JP, Beck ET, Fuchs JF, et al. Description of the transcriptomes of immune response-activated hemocytes from the mosquito vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infect Immun*. 2004;72(7):4114-26. <https://doi.org/10.1128/iai.72.7.4114-4126.2004>.
38. Basbous N, Coste F, Leone P, Vincentelli R, Royet J, Kellenberger C, et al. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LF interacts with peptidoglycan recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO Rep*. 2011;12(4):327-33. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.19>.
39. Basyoni MM, Rizk EM. Nematodes ultrastructure: Complex systems and processes. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016;40(4):1130-40. <https://doi.org/10.1007/s12639-015-0707-8>.
40. Bateman A, Rawlings ND. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(5):234-7. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00061-6).
41. Bedding RA, Molyneux AS. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica*. 1982;28(3):354-9. <https://doi.org/10.1163/187529282X00402>.
42. Belacortu Y, Paricio N. *Drosophila* as a model of wound healing and tissue regeneration in vertebrates. *Dev Dynam*. 2011;240(11):2379-404. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22753>.
43. Benguettat O, Jneid R, Soltys J, Loudhaief R, Brun-Barale A, Osman D, et al. The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *Plos Pathog*. 2018;14(9):e1007279. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007279>.
44. Bidla G, Dushay MS, Theopold U. Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci*. 2007;120(7):1209-15. <https://doi.org/10.1242/jcs.03420>.
45. Binda-Rossetti S, Mastore M, Protasoni M, Brivio MF. Effects of an entomopathogen nematode on the immune response of the insect pest red palm weevil: Focus on the host antimicrobial response. *J Invertebr Pathol*. 2016;133:110-9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.001>.
46. Bird AF, Akhurst RJ. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int J Parasitol*. 1983;13(6):599-606. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(83\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(83)80032-0).
47. Bisch G, Ogier JC, Medigue C, Rouy Z, Vincent S, Tailliez P, et al. Comparative genomics between two *Xenorhabdus bovienii* strains highlights differential evolutionary scenarios within an entomopathogenic bacterial species. *Genome Biol Evol*. 2016;8(1):148-60. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv248>.
48. Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J. Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1175-80. <https://doi.org/10.1038/ni1123>.
49. Bisel J, Myers R, Sipes B. Endemic *Oscheius* nematodes of Hawai'i. *J Nematol*. 2016;48(4):305.
50. Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *Plos Genet*. 2010;6(10):e1001159. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001159>.
51. Blackburn MB, Farrar RR, Gundersen-Rindal DE, Lawrence SD, Martin PAW. Reproductive failure of *Heterorhabditis marelatus* in the Colorado potato beetle: Evidence of stress on the nematode symbiont *Photorhabdus temperata* and potential interference from the enteric bacteria of the beetle. *Biol Control*. 2007;42(2):207-15. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.04.008>.
52. Blaxter M, Koutsovoulos G. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. 2015;142:S26-39. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000791>.

53. Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldeman P, Vierstraete A, et al. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 1998;392(6671):71-5. <https://doi.org/10.1038/32160>.
54. Bode HB. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Curr Opin Chem Biol*. 2009;13(2):224-30. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.037>.
55. Boemare N. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p35-56. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
56. Boemare NE, Boyer-Giglio MH, Thaler JO, Akhurst RJ, Brehelin M. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(9):3032-7.
57. Bonnay F, Nguyen XH, Cohen-Berros E, Troxler L, Batsche E, Camonis J, et al. Akirin specifies NF- $\kappa$ B selectivity of *Drosophila* innate immune response via chromatin remodeling. *EMBO J*. 2014;33(20):2349-62. <https://doi.org/10.15252/embj.201488456>.
58. Boulanger N, Munks RJL, Hamilton JV, Vovelle F, Brun R, Lehane MJ, et al. Epithelial innate immunity - A novel antimicrobial peptide with antiparasitic activity in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49921-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206296200>.
59. Boutros M, Agaisse H, Perrimon N. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2002;3(5):711-22. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00325-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00325-8).
60. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-54. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
61. Brey PT, Lee WJ, Yamakawa M, Koizumi Y, Perrot S, Francois M, et al. Role of the integument in insect immunity - Epicuticular abrasion and induction of Cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(13):6275-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.6275>.
62. Brillard J, Ribeiro C, Boemare N, Brehelin M, Givaudan A. Two distinct hemolytic activities in *Xenorhabdus nematophila* are active against immunocompetent insect cells. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(6):2515-25. <https://doi.org/10.1128/Aem.67.6.2515-2525.2001>.
63. Brivio MF, Mastore M. Nematobacterial complexes and insect hosts: Different weapons for the same war. *Insects*. 2018;9(3). <https://doi.org/10.3390/Insects9030117>.
64. Brivio MF, Mastore M, Moro M. The role of *Steinernema feltiae* body-surface lipids in host-parasite immunological interactions. *Mol Biochem Parasit*. 2004;135(1):111-21. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.01.012>.
65. Brivio MF, Mastore M, Nappi AJ. A pathogenic parasite interferes with phagocytosis of insect immunocompetent cells. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(9):991-8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.05.002>.
66. Brivio MF, Moro M, Mastore M. Down-regulation of antibacterial peptide synthesis in an insect model induced by the body-surface of an entomoparasite (*Steinernema feltiae*). *Dev Comp Immunol*. 2006;30(7):627-38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.09.008>.
67. Brivio MF, Pagani M, Restelli S. Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): Involvement of the parasite cuticle. *Exp Parasitol*. 2002;101(2-3):149-56. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(02\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00111-X).
68. Brivio MF, Toscano A, De Pasquale SM, Barbaro AD, Giovannardi S, Finzi G, et al. Surface protein components from entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria: Effects on immune responses of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pest Manag Sci*. 2018;74(9):2089-99. <https://doi.org/10.1002/ps.4905>.

69. Brock AR, Wang Y, Berger S, Renkawitz-Pohl R, Han VC, Wu YJ, et al. Transcriptional regulation of Profilin during wound closure in *Drosophila* larvae. *J Cell Sci.* 2012;125(23):5667-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.107490>.
70. Brugirard-Ricaud K, Duchaud E, Givaudan A, Girard PA, Kunst F, Boemare N, et al. Site-specific antiphagocytic function of the *Photorehabdus luminescens* type III secretion system during insect colonization. *Cell Microbiol.* 2005;7(3):363-71. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00466.x>.
71. Bryant WB, Michel K. Blood feeding induces hemocyte proliferation and activation in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* Giles. *J Exp Biol.* 2014;217(8):1238-45. <https://doi.org/10.1242/jeb.094573>.
72. Buchon N, Osman D, David FPA, Fang HY, Boquete JP, Deplancke B, et al. Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep.* 2013;3(5):1725-38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.04.001>.
73. Busse MS, Arnold CP, Towb P, Katrivesis J, Wasserman SA. A  $\kappa$ B sequence code for pathway-specific innate immune responses. *EMBO J.* 2007;26(16):3826-35. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601798>.
74. Byers JA, Poinar GO. Location of insect hosts by the nematode, *Neoplectana carpocapsae*, in response to temperature. *Behaviour.* 1982;79:1-10. <https://doi.org/10.1163/156853982x00535>.
75. Caldas C, Cherqui A, Pereira A, Simoes N. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1297-304. <https://doi.org/10.1128/Aem.68.3.1297-1304.2002>.
76. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci.* 2010;35(1):127-60. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>.
77. Campbell JF, Kaya HK. Mechanism, kinematic performance, and fitness consequences of jumping behavior in entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). *Can J Zool.* 1999;77(12):1947-55. <https://doi.org/10.1139/cjz-77-12-1947>.
78. Campos-Herrera R, Puza V, Jaffuel G, Blanco-Perez R, Cepulyte-Rakauskiene R, Turlings TCJ. Unraveling the intraguild competition between *Oscheius* spp. nematodes and entomopathogenic nematodes: Implications for their natural distribution in Swiss agricultural soils. *J Invertebr Pathol.* 2015;132:216-27. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.10.007>.
79. Carlsson A, Engstrom P, Palva ET, Bennich H. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer-membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *Omp* gene transcription. *Infect Immun.* 1991;59(9):3040-5.
80. Castillo J, Brown MR, Strand MR. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Plos Pathog.* 2011;7(10):e1002274. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002274>.
81. Castillo JC, Creasy T, Kumari P, Shetty A, Shokal U, Tallon LJ, et al. *Drosophila* anti-nematode and antibacterial immune regulators revealed by RNA-Seq. *BMC Genomics.* 2015;16. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1690-2>.
82. Castle M, Nazarian A, Yi SS, Tempst P. Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J Biol Chem.* 1999;274(46):32555-32564. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32555>.
83. Chakrabarti S, Dudzic JP, Li X, Collas EJ, Boquete JP, Lemaitre B. Remote control of intestinal stem cell activity by haemocytes in *Drosophila*. *Plos Genet.* 2016;12(5):e1006089. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006089>.
84. Chandra H, Khandelwal P, Khattri A, Banerjee N. Type 1 fimbriae of insecticidal bacterium *Xenorhabdus nematophila* is necessary for growth and colonization of its symbiotic host nematode *Steinernema carpocapsae*. *Environ Microbiol.* 2008;10(5):1285-95. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01542.x>.

85. Chang CI, Chelliah Y, Borek D, Mengin-Lecreux D, Deisenhofer J. Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science*. 2006;311(5768):1761-4. <https://doi.org/10.1126/science.1123056>.
86. Chang DZ, Serra L, Lu D, Mortazavi A, Dillman AR. A core set of venom proteins is released by entomopathogenic nematodes in the genus *Steinernema*. *Plos Pathog*. 2019;15(5):e1007626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007626>.
87. Chaston JM, Suen G, Tucker SL, Andersen AW, Bhasin A, Bode E, et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes. *Plos One*. 2011;6(11):e27909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027909>.
88. Chavez CV, Jubelin G, Courties G, Gomard A, Ginibre N, Pages S, et al. The cyclomodulin Cif of *Photorhabdus luminescens* inhibits insect cell proliferation and triggers host cell death by apoptosis. *Microbes Infect*. 2010;12(14-15):1208-18. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.006>.
89. Chen CC. Further evidence of both humoral and cellular encapsulations of sheathed microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*. *Int J Parasitol*. 1988;18(6):819-26. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(88\)90124-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(88)90124-5).
90. Chen EH, Christiansen AE, Baker BS. Allocation and specification of the genital disc precursor cells in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2005;281(2):270-85. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.032>.
91. Chen JM, Xie CC, Tian LL, Hong LX, Wu XR, Han JH. Participation of the p38 pathway in *Drosophila* host defense against pathogenic bacteria and fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(48):20774-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009223107>.
92. Chen TT, Tan LR, Hu N, Dong ZQ, Hu ZG, Jiang YM, et al. C-lysozyme contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection. *J Insect Physiol*. 2018;108:54-60. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.05.005>.
93. Cheng LW, Viala JPM, Stuurman N, Wiedemann U, Vale RD, Portnoy DA. Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(38):13646-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506461102>.
94. Cho WL, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, et al. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13311-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13311>.
95. Choi YJ, Fuchs JF, Mayhew GF, Yu HE, Christensen BM. Tissue-enriched expression profiles in *Aedes aegypti* identify hemocyte-specific transcriptome responses to infection. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012;42(10):729-38. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.06.005>.
96. Christen JM, Campbell JF, Lewis EE, Shapiro-Ilan DI, Ramaswamy SB. Responses of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Parasitology*. 2007;134:889-98. <https://doi.org/10.1017/S0031182006002101>.
97. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298(5591):159-65. <https://doi.org/10.1126/science.1077136>.
98. Chung YSA, Kocks C. Recognition of pathogenic microbes by the *Drosophila* phagocytic pattern recognition receptor Eater. *J Biol Chem*. 2011;286(30):26524-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.214007>.
99. Ciche TA, Darby C, Ehlers RU, Forst S, Goodrich-Blair H. Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria. *Biol Control*. 2006;38(1):22-46. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.016>.
100. Ciche TA, Ensign JC. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(4):1890-7. <https://doi.org/10.1128/Aem.69.4.1890-1897.2003>.



101. Clark KD, Pech LL, Strand MR. Isolation and identification of a plasmacyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. J Biol Chem. 1997;272(37):23440-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287360>.
102. Clark KD, Witherell A, Strand MR. Plasmacyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. Biochem Biophys Res Commun. 1998;250(2):479-85. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9145>.
103. Clemmons AW, Lindsay SA, Wasserman SA. An effector peptide family required for *Drosophila* Toll-mediated immunity. Plos Pathog. 2015;11(4):e1004876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004876>.
104. Comber K, Huelsmann S, Evans I, Sanchez-Sanchez BJ, Chalmers A, Reuter R, et al. A dual role for the beta PS integrin myospheroid in mediating *Drosophila* embryonic macrophage migration. J Cell Sci. 2013;126(15):3475-84. <https://doi.org/10.1242/jcs.129700>.
105. Copley RR, Totrov M, Linnell J, Field S, Ragoussis J, Udalova IA. Functional conservation of Rel binding sites in drosophilid genomes. Genome Res. 2007;17(9):1327-35. <https://doi.org/10.1101/gr.6490707>.
106. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res. 1988;16(22):10881-90. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>.
107. Costa SCP, Girard PA, Brehelin M, Zumbihl R. The emerging human pathogen *Photobacterium* *asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. Infect Immun. 2009;77(3):1022-30. <https://doi.org/10.1128/iai.01064-08>.
108. Costa-Silva J, Domingues D, Lopes FM. RNA-seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. Plos One. 2017;12(12):e0190152. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190152>.
109. Costechareyre D, Capo F, Fabre A, Chaduli D, Kellenberger C, Roussel A, et al. Tissue-specific regulation of *Drosophila* NF- $\kappa$ B pathway activation by peptidoglycan recognition protein SC. J Innate Immun. 2016;8(1):67-80. <https://doi.org/10.1159/000437368>.
110. Cowles KN, Goodrich-Blair H. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. Cell Microbiol. 2005;7(2):209-19. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00448.x>.
111. Crawford JM, Portmann C, Zhang X, Roeffaers MJB, Clardy J. Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(27):10821-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201160109>.
112. Cui LW, Gaugler R, Wang Y. Penetration of Steinernematid nematodes (Nematoda, Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera, Scarabaeidae). J Invertebr Pathol. 1993;62(1):73-8. <https://doi.org/10.1006/jjipa.1993.1077>.
113. Cuttell L, Vaughan A, Silva E, Escaron CJ, Lavine M, Van Goethem E, et al. Undertaker, a *Drosophila* Junctionophilin, links Draper-mediated phagocytosis and calcium homeostasis. Cell. 2008;135(3):524-34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.033>.
114. da Silva Moraes C, Diaz-Albiter HM, Faria MD, Sant'Anna MRV, Dillon RJ, Genta FA. Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion. Front Physiol. 2014;5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00276>.
115. Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CPY, Sharma S, Ffrench-Constant RH. A single *Photobacterium* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(16):10742-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.102068099>.
116. Daffre S, Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. The Lysozyme locus in *Drosophila melanogaster* - An expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. Molecular and General Genetics. 1994;242(2):152-62. <https://doi.org/10.1007/Bf00391008>.
117. Darsouei R, Karimi J, Ghadamyari M, Hosseini M. Differential change patterns of main antimicrobial peptide genes during infection of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria. J Parasitol. 2017;103(4):349-58. <https://doi.org/10.1645/16-162>.

118. De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. EMBO J. 2002;21(11):2568-79. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2568>.
119. Diaz-Albiter H, Sant'Anna MRV, Genta FA, Dillon RJ. Reactive oxygen species-mediated immunity against *Leishmania mexicana* and *Serratia marcescens* in the phlebotomine sand fly *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem. 2012;287(28):23995-4003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376095>.
120. Dillman AR, Chaston JM, Adams BJ, Ciche TA, Goodrich-Blair H, Stock SP, et al. An entomopathogenic nematode by any other name. Plos Pathog. 2012;8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002527>.
121. Dillman AR, Macchietto M, Porter CF, Rogers A, Williams B, Antoshechkin I, et al. Comparative genomics of *Steinernema* reveals deeply conserved gene regulatory networks. Genome Biol. 2015;16. <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0746-6>.
122. Dimitrova YN, Li J, Lee YT, Rios-Esteves J, Friedman DB, Choi HJ, et al. Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1. Journal Biological Chemistry. 2010;285(18):13507-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.049411>.
123. Dong YM, Taylor HE, Dimopoulos G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. Plos Biol. 2006;4(7):1137-46. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040229>.
124. Donnenberg MS, Hazen TH, Farag TH, Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, et al. Bacterial factors associated with lethal outcome of enteropathogenic *Escherichia coli* infection: Genomic case-control studies. Plos Neglect Trop D. 2015;9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003791>.
125. Dowds BCA, Peters A. Virulence mechanisms. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p79-98. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
126. Dowling AJ, Waterfield NR, Hares MC, Le Goff G, Streuli CH, Ffrench-Constant RH. The Mcf1 toxin induces apoptosis via the mitochondrial pathway and apoptosis is attenuated by mutation of the BH3-like domain. Cell Microbiol. 2007;9(10):2470-84. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00974.x>.
127. Du EJ, Ahn TJ, Kwon I, Lee JH, Park JH, Park SH, et al. TrpA1 regulates defecation of food-borne pathogens under the control of the Duox pathway. Plos Genet. 2016;12(1):e1005773. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005773>.
128. Dubovskiy IM, Kryukova NA, Glupov VV, Ratcliffe NA. Encapsulation and nodulation in insects. Invert Surviv J. 2016;13(1):229-46. <http://www.isj.unimo.it/index.php/ISJ/article/view/397>.
129. Duckert P, Brunak S, Blom N. Prediction of proprotein convertase cleavage sites. Protein Eng Des Sel. 2004;17(1):107-12. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh013>.
130. Dunphy GB, Webster JM. Partially characterized components of the epicuticle of Dauer juvenile *Steinernema feltiae* and their influence on hemocyte activity in *Galleria mellonella*. J Parasitol. 1987;73(3):584-8. <https://doi.org/10.2307/3282140>.
131. Dunphy GB, Webster JM. Virulence mechanisms of *Heterorhabditis heliothidis* and its bacterial associate, *Xenorhabdus luminescens*, in non-immune larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Int J Parasitol. 1988;18(6):729-37. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(88\)90112-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(88)90112-9).
132. Duressa TF, Vanlaer R, Huybrechts R. Locust cellular defense against infections: Sites of pathogen clearance and hemocyte proliferation. Dev Comp Immunol. 2015;48(1):244-53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.005>.
133. Duvic B, Jouan V, Essa N, Girard PA, Pages S, Khattar ZA, et al. Cecropins as a marker of *Spodoptera frugiperda* immunosuppression during entomopathogenic bacterial challenge. J Insect Physiol. 2012;58(6):881-8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.04.001>.
134. Ebrahimi L, Niknam G, Dunphy GB. Hemocyte responses of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and the greater wax moth, *Galleria mellonella*, to the

- entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. J Insect Sci. 2011;11. <https://doi.org/10.1673/031.011.7501>.
135. Edman P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. Acta Chem Scand. 1950;4:283-93. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.04-0283>.
  136. Eidt DC, Thurston GS. Physical deterrents to infection by entomopathogenic nematodes in wireworms (Coleoptera, Elateridae) and other soil insects. Can Entomol. 1995;127(3):423-9. <https://doi.org/10.4039/Ent127423-3>.
  137. El Chamy L, Leclerc V, Caldelari I, Reichhart JM. Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. Nat Immunol. 2008;9(10):1165-70. <https://doi.org/10.1038/ni.1643>.
  138. Eleftherianos I, Baldwin H, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. Developmental modulation of immunity: Changes within the feeding period of the fifth larval stage in the defence reactions of *Manduca sexta* to infection by *Photorhabdus*. J Insect Physiol. 2008;54(1):309-18. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.10.003>.
  139. Eleftherianos I, Castillo JC, Patrnoic J. TGF-beta signaling regulates resistance to parasitic nematode infection in *Drosophila melanogaster*. Immunobiology. 2016;221(12):1362-8. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.07.011>.
  140. Eleftherianos I, Felfoldi G, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. Induced nitric oxide synthesis in the gut of *Manduca sexta* protects against oral infection by the bacterial pathogen *Photorhabdus luminescens*. Insect Mol Biol. 2009;18(4):507-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00899.x>.
  141. Eleftherianos I, Gokcen F, Felfoldi G, Millichap PJ, Trenczek TE, ffrench-Constant RH, et al. The immunoglobulin family protein Hemolin mediates cellular immune responses to bacteria in the insect *Manduca sexta*. Cell Microbiol. 2007;9(5):1137-47. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00855.x>.
  142. Eleftherianos I, Marokhazi J, Millichap PJ, Hodgkinson AJ, Sriboonlert A, ffrench-Constant RH, et al. Prior infection of *Manduca sexta* with non-pathogenic *Escherichia coli* elicits immunity to pathogenic *Photorhabdus luminescens*: Roles of immune-related proteins shown by RNA interference. Insect Biochem Mol Biol. 2006;36(6):517-25. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.001>.
  143. Eleftherianos I, Millichap PJ, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. RNAi suppression of recognition protein mediated immune responses in the tobacco hornworm *Manduca sexta* causes increased susceptibility to the insect pathogen *Photorhabdus*. Dev Comp Immunol. 2006;30(12):1099-107. <https://doi.org/10.1015/j.dci.2006.02.008>.
  144. Eleftherianos I, Shokal U, Yadav S, Kenney E, Maldonado T. Insect immunity to entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria. Curr Top Microbiol Immunol. 2017;402:123-56. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_52](https://doi.org/10.1007/82_2016_52).
  145. Eleftherianos I, Xu M, Yadi H, Ffrench-Constant RH, Reynolds SE. Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. J Exp Biol. 2009;212(12):1840-8. <https://doi.org/10.1242/jeb.026278>.
  146. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. FEMS Microbiol Rev. 2013;37(5):699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>.
  147. Engstrom P, Carlsson A, Engstrom A, Tao ZJ, Bennich H. The antibacterial effect of Attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer-membrane of *Escherichia coli*. EMBO J. 1984;3(13):3347-51. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02302.x>.
  148. Eom S, Park Y, Kim Y. Sequential immunosuppressive activities of bacterial secondary metabolites from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. J Microbiol. 2014;52(2):161-8. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3251-9>.
  149. Erler S, Popp M, Lattorff HMG. Dynamics of immune system gene expression upon bacterial challenge and wounding in a social insect (*Bombus terrestris*). Plos One. 2011;6(3):e18126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018126>.

150. Espinoza-Fuentes FP, Terra WR. Physiological adaptations for digesting bacteria - Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* 1987;17(6):809-17. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90015-1](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90015-1).
151. Evans IR, Wood W. *Drosophila* blood cell chemotaxis. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;30:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.04.002>.
152. Everaert C, Luypaert M, Maag JLV, Cheng QX, Dinger ME, Hellemans J, et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole transcriptome RT-qPCR expression data. *Sci Rep.* 2017;7:1559. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-01617-3>.
153. Fang Q, Wang F, Gatehouse JA, Gatehouse AMR, Chen XX, Hu C, et al. Venom of parasitoid, *Pteromalus puparum*, suppresses host, *Pieris rapae*, immune promotion by decreasing host C-type lectin gene expression. *Plos One.* 2011;6(10):e26888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026888>.
154. Felfoldi G, Eleftherianos I, Ffrench-Constant RH, Venekei I. A serine proteinase homologue, SPH-3, plays a central role in insect immunity. *J Immunol.* 2011;186(8):4828-34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003246>.
155. Felfoldi G, Marokhazi J, Kepiro M, Venekei I. Identification of natural target proteins indicates functions of a Serralysin-type metalloprotease, PrtA, in anti-immune mechanisms. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(10):3120-6. <https://doi.org/10.1128/Aem.02271-08>.
156. Ferguson CS, Schroeder PC, Shields EJ. Vertical-distribution, persistence, and activity of entomopathogenic nematodes (Nematoda, Heterorhabditidae and Steinernematidae) in alfalfa snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) infested fields. *Environ Entomol.* 1995;24(1):149-58. <https://doi.org/10.1093/Ee/24.1.149>.
157. Ferrandon D. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr Opin Immunol.* 2013;25(1):59-70. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.11.008>.
158. Ferrandon D, Imler JL, Hetru C, Hoffmann JA. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(11):862-74. <https://doi.org/10.1038/nri2194>.
159. Ffrench-Constant R, Waterfield N, Daborn P, Joyce S, Bennett H, Au C, et al. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;26(5):433-56. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2003.Tb00625.X>.
160. Foelkel E, Voss M, Monteiro LB, Nishimura G. Isolation of entomopathogenic nematodes in an apple orchard in southern Brazil and its virulence to *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larvae, under laboratory conditions. *Braz J Biol.* 2017;77(1):22-8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08315>.
161. Foley E, O'Farrell PH. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to Gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Gene Dev.* 2003;17(1):115-25. <https://doi.org/10.1101/gad.1018503>.
162. Foley E, O'Farrell PH. Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen. *Plos Biol.* 2004;2(8):e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020203>.
163. Forschler BT, Gardner WA. Parasitism of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera, Scarabaeidae) by *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema carpocapsae*. *J Invertebr Pathol.* 1991;58(3):396-407. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(91\)90186-T](https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90186-T).
164. Forst S, Clarke D. Bacteria–nematode symbiosis. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p57-77. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
165. Franc NC, Dimarcq JL, Lagueux M, Hoffmann J, Ezekowitz RAB. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity.* 1996;4(5):431-43. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80410-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80410-0).
166. Franc NC, Heitzler P, Ezekowitz RAB, White K. Requirement for Croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Science.* 1999;284(5422):1991-4. <https://doi.org/10.1126/science.284.5422.1991>.

167. Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Levashina EA. Boosting NF- $\kappa$ B-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. *Immunity*. 2006;25(4):677-85. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.019>.
168. Fu JR, Liu QZ. Evaluation and entomopathogenicity of gut bacteria associated with Dauer juveniles of *Oscheius chongmingensis* (Nematoda: Rhabditidae). *MicrobiologyOpen*. 2019;8(9):e00823. <https://doi.org/10.1002/mbo3.823>.
169. Fullaondo A, Garcia-Sanchez S, Sanz-Parra A, Recio E, Lee SY, Gubb D. Spn1 regulates the GGBP3-dependent Toll signaling pathway in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 2011;31(14):2960-72. <https://doi.org/10.1128/Mcb.01397-10>.
170. Furuya K, Hackett M, Cirelli MA, Schegg KM, Wang HL, Shabanowitz J, et al. A cardioactive peptide from the southern armyworm, *Spodoptera eridania*. *Peptides*. 1999;20(1):53-61. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00148-X](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00148-X).
171. Futahashi R, Fujiwara H. Melanin-synthesis enzymes coregulate stage-specific larval cuticular markings in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Dev Genes Evol*. 2005;215(10):519-29. <https://doi.org/10.1007/s00427-005-0014-y>.
172. Galko MJ, Krasnow MA. Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *Plos Biol*. 2004;2(8):e239. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020239>.
173. Gandhe AS, Janardhan G, Nagaraju J. Immune upregulation of novel antibacterial proteins from silkmoths (Lepidoptera) that resemble lysozymes but lack muramidase activity. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37(7):655-66. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.03.013>.
174. Gardiner EMM, Strand MR. Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2000;43(4):147-64. [https://doi.org/10.1002/\(Sici\)1520-6327\(200004\)43:4](https://doi.org/10.1002/(Sici)1520-6327(200004)43:4)
175. Garver LS, Dong YM, Dimopoulos G. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. *Plos Pathog*. 2009;5(3):e1000335. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000335>.
176. Garver LS, Wu JL, Wu LP. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):660-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0506182103>.
177. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: *The proteomics protocols handbook*, Walker JM editor, Humana press. 2005. p571-607. <https://www.springer.com/gp/book/9781588293435>.
178. Gaugler R, Molloy D. Instar susceptibility of *Simulium vittatum* (Diptera, Simuliidae) to the entomogenous nematode *Neoaplectana carpopapsae*. *J Nematol*. 1981;13(1):1-5.
179. Gerardo NM, Altincicek B, Anselme C, Atamian H, Barribeau SM, De Vos M, et al. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol*. 2010;11(2). <https://doi.org/10.1186/Gb-2010-11-2-R21>.
180. Ghosh S, Singh A, Mandal S, Mandal L. Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev Cell*. 2015;33(4):478-88. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.014>.
181. Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, et al. Dual activation of the *Drosophila* Toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*. 2003;302(5653):2126-30. <https://doi.org/10.1126/science.1085432>.
182. Gorman MJ, An CJ, Kanost MR. Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37(12):1327-37. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.08.006>.
183. Goto A, Okado K, Martins N, Cai H, Barbier V, Lamiable O, et al. The kinase IKK $\beta$  regulates a STING- and NF- $\kappa$ B-dependent antiviral response pathway in *Drosophila*. *Immunity*. 2018;49(2):225-34. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.013>.

184. Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart JM, Wang CS, Butt TM, et al. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. 2006;127(7):1425-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.046>.
185. Götz P, Boman A, Boman HG. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc R Soc B*. 1981;212(1188):333-50. <https://doi.org/10.1098/rspb.1981.0043>.
186. Gouin A, Bretaudeau A, Nam K, Gimenez S, Aury JM, Duvic B, et al. Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Sci Rep*. 2017;7:11816. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-10461-4>.
187. Grewal PS, Bai XD, Jagdale GB. Longevity and stress tolerance of entomopathogenic nematodes. *Molecular and Physiological Basis of Nematode Survival*. 2011:157-81. <https://doi.org/10.1079/9781845936877.0000>.
188. Grewal PS, Lewis EE, Gaugler R. Response of infective stage parasites (Nematoda: Steinernematidae) to volatile cues from infected hosts. *J Chem Ecol*. 1997;23(2):503-15. <https://doi.org/10.1023/B:Joec.0000006374.95624.7e>.
189. Grigorian M, Mandal L, Hartenstein V. Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev Genes Evol*. 2011;221(3):121-31. <https://doi.org/10.1007/s00427-011-0364-6>.
190. Grosshans J, Schnorrer F, Nusslein-Volhard C. Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of Dorsal. *Mech Develop*. 1999;81(1-2):127-38. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00236-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00236-6).
191. Gunaratna RT, Jiang HB. A comprehensive analysis of the *Manduca sexta* immunotranscriptome. *Dev Comp Immunol*. 2013;39(4):388-98. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.004>.
192. Guntermann S, Primrose DA, Foley E. Dnr1-dependent regulation of the *Drosophila* immune deficiency signaling pathway. *Dev Comp Immunol*. 2009;33(1):127-34. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.07.021>.
193. Gupta S, Wang Y, Jiang HB. *Manduca sexta* prophenoloxidase (proPO) activation requires proPO-activating proteinase (PAP) and serine proteinase homologs (SPHs) simultaneously. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(3):241-8. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.12.003>.
194. Gutiérrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Terán-Santofimio H, Rodríguez-Maciél JC, et al. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *J Econ Entomol*. 2018;112(2):792-802. <https://doi.org/10.1093/jee/toy372>.
195. Ha EM, Lee KA, Park SH, Kim SH, Nam HJ, Lee HY, et al. Regulation of DUOX by the Galphap-phospholipase C $\beta$ -Ca $^{2+}$  pathway in *Drosophila* gut immunity. *Dev Cell*. 2009;16(3):386-97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.015>.
196. Ha EM, Lee KA, Seo YY, Kim SH, Lim JH, Oh BH, et al. Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in *Drosophila* gut. *Nat Immunol*. 2009;10(9):949-U19. <https://doi.org/10.1038/ni.1765>.
197. Hallem EA, Dillman AR, Hong AV, Zhang YJ, Yano JM, DeMarco SF, et al. A sensory code for host seeking in parasitic nematodes. *Curr Biol*. 2011;21(5):377-83. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.048>.
198. Hallem EA, Rengarajan M, Ciche TA, Sternberg PW. Nematodes, bacteria, and flies: a tripartite model for nematode parasitism. *Curr Biol*. 2007;17(10):898-904. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.027>.
199. Hanson MA, Dostalova A, Ceroni C, Poidevin M, Kondo S, Lemaitre B. Synergy and remarkable specificity of antimicrobial peptides in vivo using a systematic knockout approach. *ELife*. 2019;8. <https://doi.org/10.7554/eLife.44341>.

200. Hanson MA, Lemaitre B. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Curr Opin Immunol*. 2020;62:22-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.008>.
201. Hao YJ, Montiel R, Abubucker S, Mitreva M, Simoes N. Transcripts analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* induced *in vitro* with insect haemolymph. *Mol Biochem Parasit*. 2010;169(2):79-86.  
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.10.002>.
202. Hara S, Yamakawa M. Cooperative antibacterial relationship between Lebocin and Cecropin D, antibacterial peptides isolated from the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl Entomol Zool*. 1995;30(4):606-608. <https://doi.org/10.1303/aez.30.606>.
203. Hashimoto Y, Tabuchi Y, Sakurai K, Kutsuna M, Kurokawa K, Awasaki T, et al. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for Draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. *J Immunol*. 2009;183(11):7451-60.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901032>.
204. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 2016;58:102-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>.
205. Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. Hemocyte-mediated phagocytosis and melanization in the mosquito *Armigeres subalbatus* following immune challenge by bacteria. *Cell Tissue Res*. 2003;313(1):117-27. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0744-y>.
206. Hinchliffe S, Hares M, Dowling AJ, Ffrench-Constant R. Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria. *Open Toxinol J*. 2010;3:83-100.
207. Holterman M, van der Wurff A, van den Elsen S, van Megen H, Bongers T, Holovachov O, et al. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Mol Biol Evol*. 2006;23(9):1792-800.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msl044>.
208. Holz A, Bossinger B, Strasser T, Janning W, Klapper R. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development*. 2003;130(20):4955-62. <https://doi.org/10.1242/dev.00702>.
209. Hominick WM. Biogeography. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p115-43. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
210. Homma KJ, Yamaguchi S, Aoki N. Insect homologs of Papain. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Rawlings ND, Salvesen G editors, Academic Press. 2013. p1963-8.  
<https://www.sciencedirect.com/book/9780123822192/handbook-of-proteolytic-enzymes>.
211. Horn L, Leips J, Starz-Gaiano M. Phagocytic ability declines with age in adult *Drosophila* hemocytes. *Aging Cell*. 2014;13(4):719-28. <https://doi.org/10.1111/accel.12227>.
212. Hu K, Webster JM. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;189(2):219-23. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09234.x>.
213. Hu KJ, Li JX, Li B, Webster JM, Chen GH. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Bioorg Med Chem*. 2006;14(13):4677-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.025>.
214. Hu KJ, Li JX, Webster JM. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 1999;1:457-69. <https://doi.org/10.1163/156854199508469>.
215. Hu XL, Yang R, Zhang X, Chen L, Xiang XW, Gong CL, et al. Molecular Cloning and Functional Characterization of the Dual Oxidase (BmDuox) Gene from the Silkworm *Bombyx mori*. *Plos One*. 2013;8(8):e70118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070118>.
216. Huang HR, Chen ZJJ, Kunes S, Chang GD, Maniatis T. Endocytic pathway is required for *Drosophila* Toll innate immune signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(18):8322-7.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1004031107>.

217. Husnik F, Chrudimsky T, Hypsa V. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (gamma-Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biol.* 2011;9. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-87>.
218. Hwang J, Park Y, Kim Y, Hwang J, Lee D. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, suppresses expression of antimicrobial peptides controlled by Toll and Imd pathways by blocking eicosanoid biosynthesis. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2013;83(3):151-69. <https://doi.org/10.1002/arch.21103>.
219. Hyrsi P, Dobes P, Wang Z, Hauling T, Wilhelmsson C, Theopold U. Clotting factors and eicosanoids protect against nematode infections. *J Innate Immun.* 2011;3(1):65-70. <https://doi.org/10.1159/000320634>.
220. Iatsenko I, Boquete JP, Lemaitre B. Microbiota-derived lactate activates production of reactive oxygen species by the intestinal NADPH Oxidase NOX and shortens *Drosophila* lifespan. *Immunity.* 2018;49(5):929-42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.017>.
221. Ilan T, Kim-Shapiro DB, Bock CH, Shapiro-Ilan DI. Magnetic and electric fields induce directional responses in *Steinernema carpocapsae*. *Int J Parasitol.* 2013;43(10):781-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.05.007>.
222. Infanger LC, Rocheleau TA, Bartholomay LC, Johnson JK, Fuchs J, Higgs S, et al. The role of phenylalanine hydroxylase in melanotic encapsulation of filarial worms in two species of mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(12):1329-38. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.004>.
223. 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. *Cell Microbiol.* 2005;7(3):335-50. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00462.x>.
224. Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Oonishi T, Kamimura M, Imamura K, et al. Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol.* 2013;39(3):147-53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.014>.
225. Issa N, Guillaumot N, Lauret E, Matt N, Schaeffer-Reiss C, Van Dorselaer A, et al. The circulating protease Persephone is an immune sensor for microbial proteolytic activities upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Mol Cell.* 2018;69(4):539-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.029>.
226. Jarosz J. Active resistance of entomophagous rhabditid *Heterorhabditis bacteriophora* to insect immunity. *Parasitology.* 1998;117:201-8. <https://doi.org/10.1017/S0031182098003011>.
227. Ji D, Yi Y, Kang GH, Choi YH, Kim P, Baek NI, et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;239(2):241-8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.041>.
228. Ji DJ, Kim Y. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits the expression of an antibacterial peptide, Cecropin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol.* 2004;50(6):489-96. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.03.005>.
229. Ji S, Sun M, Zheng X, Li L, Sun L, Chen D, et al. Cell-surface localization of Pellino antagonizes Toll-mediated innate immune signalling by controlling MyD88 turnover in *Drosophila*. *Nat Commun.* 2014;5:3458. <https://doi.org/10.1038/ncomms4458>.
230. Jiang HB, Ma CC, Lu ZQ, Kanost MR.  $\beta$ -1,3-Glucan recognition protein-2 (beta GRP-2) from *Manduca sexta*: an acute-phase protein that binds  $\beta$ -1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(1):89-100. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.09.006>.
231. Jiang HB, Wang Y, Kanost MR. Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(21):12220-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12220>.
232. Jiang HB, Wang Y, Yu XQ, Kanost MR. Prophenoloxidase-activating proteinase-2 from hemolymph of *Manduca sexta*. *J Biol Chem.* 2003;278(6):3552-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205743200>.



233. Jiang HB, Wang Y, Yu XQ, Zhu YF, Kanost M. Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochem Mol Biol.* 2003;33(10):1049-60. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00123-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00123-1).
234. Jing YJ, Toubarro D, Hao YJ, Simoes N. Cloning, characterisation and heterologous expression of an Astacin metalloprotease, Sc-AST, from the entomoparasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Mol Biochem Parasit.* 2010;174(2):101-8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.07.004>.
235. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Soderhall K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology.* 2006;211(4):213-36. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>.
236. Johnson JK, Li J, Christensen BM. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(11):1125-35. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00072-8).
237. Jones P, Binns D, Chang HY, Fraser M, Li WZ, McAnulla C, et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1236-40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.
238. Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development.* 2005;132(11):2521-33. <https://doi.org/10.1242/dev.01837>.
239. Kamimura M, Nakahara Y, Kanamori Y, Tsuzuki S, Hayakawa Y, Kiuchi M. Molecular cloning of silkworm paralytic peptide and its developmental regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286(1):67-73. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5365>.
240. Kamvysselis M, Patterson N, Birren B, Lander E. *Saccharomyces* comparative genomics: Genes, regulatory motifs, and genome evolution. *Yeast.* 2003;20:S282-S.
241. Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, et al. Monomeric and polymeric Gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity.* 2004;20(5):637-49. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00104-9).
242. Kaneko T, Yano T, Aggarwal K, Lim JH, Ueda K, Oshima Y, et al. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the *Drosophila* immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol.* 2006;7(7):715-23. <https://doi.org/10.1038/ni1356>.
243. Karimi J, Rezaei N, Shokoohi E. Addition of a new insect parasitic nematode, *Oscheius tipulae*, to Iranian fauna. *Nematropica.* 2018;48(1):82-91.
244. Karlikow M, Goic B, Saleh MC. RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: Setting up a systemic immune response. *Dev Comp Immunol.* 2014;42(1):85-92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.004>.
245. Khadilkar RJ, Vogl W, Goodwin K, Tanentzapf G. Modulation of occluding junctions alters the hematopoietic niche to trigger immune activation. *Elife.* 2017;6:e28081. <https://doi.org/10.7554/eLife.28081>.
246. Khandelwal P, Bhatnagar R, Choudhury D, Banerjee N. Characterization of a cytotoxic pilin subunit of *Xenorhabdus nematophila*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(4):943-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.187>.
247. Kim GS, Kim Y. Up-regulation of circulating hemocyte population in response to bacterial challenge is mediated by octopamine and 5-hydroxytryptamine via Rac1 signal in *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol.* 2010;56(6):559-66. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.022>.
248. Kim GS, Nalini M, Kim Y, Lee DW. Octopamine and 5-hydroxytryptamine mediate hemocytic phagocytosis and nodule formation via eicosanoids in the beet armyworm, *Spodoptera Exigua*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2009;70(3):162-76. <https://doi.org/10.1002/arch.20286>.
249. Kim M, Lee JH, Lee SY, Kim E, Chung J. Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(44):16358-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603238103>.

250. Kim Y, Ji D, Cho S, Park Y. Two groups of entomopathogenic bacteria, *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*, share an inhibitory action against phospholipase A<sub>2</sub> to induce host immunodepression. *J Invertebr Pathol.* 2005;89(3):258-64. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.05.001>.
251. King JG, Hillyer JF. Spatial and temporal *in vivo* analysis of circulating and sessile immune cells in mosquitoes: hemocyte mitosis following infection. *BMC Biol.* 2013;11(1):55. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-55>.
252. Kleino A, Myllymaki H, Kallio J, Vanha-aho LM, Oksanen K, Ulvila J, et al. Pirk is a negative regulator of the *Drosophila* Imd pathway. *J Immunol.* 2008;180(8):5413-22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5413>.
253. Kobayashi M, Johansson MW, Soderhall K. The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish hemocytes promotes encapsulation *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 1990;260(1):13-8. <https://doi.org/10.1007/Bf00297485>.
254. Kocks C, Cho JH, Nehme N, Ulvila J, Pearson AM, Meister M, et al. Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell.* 2005;123(2):335-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.034>.
255. Kocks C, Maehr R, Overkleeft HS, Wang EW, Iyer LK, Lennon-Dumenil AM, et al. Functional proteomics of the active cysteine protease content in *Drosophila* S2 cells. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(11):1188-97. <https://doi.org/10.1074/mcp.M300067-MCP200>.
256. Koo YD, Ahn JE, Salzman RA, Moon J, Chi YH, Yun DJ, et al. Functional expression of an insect Cathepsin B-like counter-defence protein. *Insect Mol Biol.* 2008;17(3):235-45. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00799.x>.
257. Krautz R, Arefin B, Theopold U. Damage signals in the insect immune response. *Front Plant Sci.* 2014;5:342. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>.
258. Kristensen N, Chauvin G. Vol IV : Lepidoptera, moths and butterflies. Vol. 2 : Morphology, physiology, and development. Integument. In: *Handbook of Zoology*, de Gruyter W editor, De Gruyter.2012. p1-8. <https://books.google.fr/books?id=8fMgAAAAQBAJ>.
259. Krizsan A, Volke D, Weinert S, Strater N, Knappe D, Hoffmann R. Insect-derived proline-rich antimicrobial peptides kill bacteria by inhibiting bacterial protein translation at the 70S ribosome. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(45):12236-12239. <https://doi.org/10.1002/anie.201407145>.
260. Kucerova L, Broz V, Arefin B, Maaroufi HO, Hurychova J, Strnad H, et al. The *Drosophila* Chitinase-like protein IDGF3 is involved in protection against nematodes and in wound Healing. *J Innate Immun.* 2016;8(2):199-210. <https://doi.org/10.1159/000442351>.
261. Kumar TA. CFSSP: Chou and Fasman secondary structure prediction server. *Wide Spectrum.* 2013;1(9):15-9. <https://zenodo.org/record/50733#.Xai8-IQza70>.
262. Kuraishi T, Hori A, Kurata S. Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol.* 2013;4:375. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00375>.
263. Kurant E, Axelrod S, Leaman D, Gaul U. Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. *Cell.* 2008;133(3):498-509. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.052>.
264. Kurata S. Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev Comp Immunol.* 2014;42(1):36-41. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.006>.
265. Kurucz E, Markus R, Zsamboki J, Folkl-Medzihradzsky K, Darula Z, Vilmos P, et al. Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol.* 2007;17(7):649-54. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.041>.
266. Kurucz E, Zettervall CJ, Sinka R, Vilmos P, Pivarcsi A, Ekengren S, et al. Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(5):2622-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436940100>.

267. Kuttenkeuler D, Pelte N, Ragab A, Gesellchen V, Schneider L, Blass C, et al. A large-scale RNAi screen identifies DEAF1 as a regulator of innate immune responses in *Drosophila*. *J Innate Immun*. 2010;2(2):181-94. <https://doi.org/10.1159/000248649>.
268. Labaude S, Griffin CT. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects*. 2018;9(2). <https://doi.org/10.3390/insects9020072>.
269. Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *J Invertebr Pathol*. 2015;132:1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.
270. Lackie AM. Immune-mechanisms in insects. *Parasitol Today*. 1988;4(4):98-105. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90035-X).
271. Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(21):11427-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11427>.
272. Lamiable O, Kellenberger C, Kemp C, Troxler L, Pelte N, Boutros M, et al. Cytokine Dieldel and a viral homologue suppress the IMD pathway in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(3):698-703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516122113>.
273. Lang AE, Schmidt G, Schlosser A, Hey TD, Larrinua IM, Sheets JJ, et al. *Photobacterium luminescens* toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science*. 2010;327(5969):1139-42. <https://doi.org/10.1126/science.1184557>.
274. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol*. 2001;230(2):243-57. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0123>.
275. Lau NC, Robine N, Martin R, Chung WJ, Niki Y, Berezikov E, et al. Abundant primary piRNAs, endo-siRNAs, and microRNAs in a *Drosophila* ovary cell line. *Genome Res*. 2009;19(10):1776-85. <https://doi.org/10.1101/gr.094896.109>.
276. Lavine MD, Chen G, Strand MR. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2005;35(12):1335-46. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.08.005>.
277. Laznik Z, Trdan S. Attraction behaviors of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) to synthetic volatiles emitted by insect-damaged carrot roots. *J Pest Sci*. 2016;89(4):977-84. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0720-9>.
278. Lebestky T, Chang T, Hartenstein V, Banerjee U. Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science*. 2000;288(5463):146-9. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.146>.
279. Lee JH, Lee CW, Park SH, Choe KM. Spatiotemporal regulation of cell fusion by JNK and JAK/STAT signaling during *Drosophila* wound healing. *J Cell Sci*. 2017;130(11):1917-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.187658>.
280. Lee KA, Kim SH, Kim EK, Ha EM, You H, Kim B, et al. Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell*. 2013;153(4):797-811. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.009>.
281. Lee KA, Lee WJ. Immune-metabolic interactions during systemic and enteric infection in *Drosophila*. *Curr Opin Insect Sci*. 2018;29:21-6. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.05.014>.
282. Lee KZ, Ferrandon D. Negative regulation of immune responses on the fly. *EMBO J*. 2011;30(6):988-90. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.47>.
283. Lee KZ, Lestradet M, Socha C, Schirmeier S, Schmitz A, Spenle C, et al. Enterocyte purge and rapid recovery is a resilience reaction of the gut epithelium to pore-forming toxin attack. *Cell Host Microbe*. 2016;20(6):716-30. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.010>.
284. Lee MM, Stock SP. A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between *Steinernema* spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae). *Syst Parasitol*. 2010;77(1):1-12. <https://doi.org/10.1007/s11230-010-9256-9>.

285. Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. Annual review of entomology. 1997;42:525-50. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>.
286. Leitao AB, Sucena E. *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. Elife. 2015;4. <https://doi.org/10.7554/eLife.06166>.
287. Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annual review of immunology. 2007;25:697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
288. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(26):14614-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14614>.
289. Lemos FJA, Terra WR. Digestion of bacteria and the role of midgut Lysozyme in some insect larvae. Comp Biochem Physiol B. 1991;100(2):265-8. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90372-K](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90372-K).
290. Lephoto TE, Gray VM. *Oscheius basothovii* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae), a new entomopathogenic nematode isolated from an uncultivated grassland in South Africa. Archiv Phytopathol Plant Prot. 2019;52(1-2):125-40. <https://doi.org/10.1080/03235408.2019.1588193>.
291. Letunic I, Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. Nucleic Acids Res. 2018;46(D1):D493-D6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx922>.
292. Levashina EA, Langley E, Green C, Gubb D, Ashburner M, Hoffmann JA, et al. Constitutive activation of Toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. Science. 1999;285(5435):1917-9. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1917>.
293. Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. Cell. 2001;104(5):709-18. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00267-7).
294. Levin DM, Breuer LN, Zhuang SF, Anderson SA, Nardi JB, Kanost MR. A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35(5):369-80. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.003>.
295. Lewis EE. Behavioural ecology. In: *Entomopathogenic nematology*, Gaugler R editor, CABI Publishing. 2002. p205-23. <https://books.google.fr/books?id=h0F-h4vP9coC>.
296. Lewis EE, Gaugler R. Entomopathogenic nematode (Rhabdita, Steinernematidae) sex-ratio relates to foraging strategy. J Invertebr Pathol. 1994;64(3):238-42. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90325-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90325-5).
297. Li JX, Chen GH, Webster JM. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). Can J Microbiol. 1997;43(8):770-3. <https://doi.org/10.1139/M97-110>.
298. Li XY, Cowles EA, Cowles RS, Gaugler R, Cox-Foster DL. Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. Mol Biochem Parasit. 2009;165(2):162-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.02.001>.
299. Li XY, Cowles RS, Cowles EA, Gaugler R, Cox-Foster DL. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. Int J Parasitol. 2007;37(3-4):365-74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.009>.
300. Lindsay SA, Lin SJH, Wasserman SA. Short-form Bomanins mediate humoral immunity in *Drosophila*. J Innate Immun. 2018;10(4):306-14. <https://doi.org/10.1159/000489831>.
301. Ling EJ, Yu XQ. Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Dev Comp Immunol. 2006;30(3):289-99. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.05.005>.
302. Liu B, Zheng YG, Yin F, Yu JZ, Silverman N, Pan DJ. Toll receptor-mediated Hippo signaling controls innate immunity in *Drosophila*. Cell. 2016;164(3):406-19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.029>.

303. Liu F, Xu Q, Zhang Q, Lu A, Beerntsen BT, Ling E. Hemocytes and hematopoiesis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Invert Surviv J*. 2013;10(1):102-9. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(79\)80064-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(79)80064-4).
304. Liu J, Shi GP, Zhang WQ, Zhang GR, Xu WH. Cathepsin L function in insect moulting: molecular cloning and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Mol Biol*. 2006;15(6):823-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00686.x>.
305. Liu J, Yang J, Wang XN, Zhang Y, Shen ZY, Wu JM. The Bmspatzle5 gene encodes a component of Toll-signaling pathway against fungus and Gram-positive bacteria invasion in the integument of silkworm, *Bombyx mori*. *Biotechnology and Medical Science* 2016. p. 129-38. [https://doi.org/10.1142/9789813145870\\_0019](https://doi.org/10.1142/9789813145870_0019).
306. Liu Q, Jin LH. Tissue-resident stem cell activity: a view from the adult *Drosophila* gastrointestinal tract. *Cell Commun Signal*. 2017;15(1):33. <https://doi.org/10.1186/s12964-017-0184-z>.
307. Louradour I, Sharma A, Morin-Poulard I, Letourneau M, Vincent A, Crozatier M, et al. Reactive oxygen species-dependent Toll/NF- $\kappa$ B activation in the *Drosophila* hematopoietic niche confers resistance to wasp parasitism. *Elife*. 2017;6. <https://doi.org/10.7554/eLife.25496>.
308. Lu DH, Macchietto M, Chang D, Barros MM, Baldwin J, Mortazavi A, et al. Activated entomopathogenic nematode infective juveniles release lethal venom proteins. *Plos Pathog*. 2017;13(4):e1006302. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006302>.
309. Ma CC, Kanost MR. A  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *J Biol Chem*. 2000;275(11):7505-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7505>.
310. Mabery EM, Schneider DS. The *Drosophila* TNF ortholog Eiger is required in the fat body for a robust immune response. *J Innate Immun*. 2010;2(4):371-8. <https://doi.org/10.1159/000315050>.
311. Machado RAR, Wuthrich D, Kuhnert P, Arce CCM, Thonen L, Ruiz C, et al. Whole-genome-based revisit of *Photorhabdus* phylogeny: Proposal for the elevation of most *Photorhabdus* subspecies to the species level and description of one novel species *Photorhabdus bodei* sp nov., and one novel subspecies *Photorhabdus laumondii* subsp *clarkei* subsp nov. *Int J Syst Evol Micr*. 2018;68(8):2664-81. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002820>.
312. Maher AMD, Asaiyah MAM, Brophy C, Griffin CT. An entomopathogenic nematode extends its niche by associating with different symbionts. *Microb Ecol*. 2017;73(1):211-23. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0829-2>.
313. Makhijani K, Alexander B, Rao D, Petraki S, Herboso L, Kukar K, et al. Regulation of *Drosophila* hematopoietic sites by Activin- $\beta$  from active sensory neurons. *Nat Commun*. 2017;8:15990. <https://doi.org/10.1038/Ncomms15990>.
314. Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, et al. Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48466-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408597200>.
315. Maneesakorn P, An RS, Daneshvar H, Taylor K, Bai XD, Adams BJ, et al. Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). *Mol Phylogenet Evol*. 2011;59(2):271-80. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.012>.
316. Mangalika PR, Kawamoto T, Takahashi-Nakaguchi A, Iwabuchi K. Characterization of cell clusters in larval hemolymph of the cabbage armyworm *Mamestra brassicae* and their role in maintenance of hemocyte populations. *J Insect Physiol*. 2010;56(3):314-23. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.003>.
317. Marianes A, Spradling AC. Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife*. 2013;2. <https://doi.org/10.7554/eLife.00886>.

318. Marin D, Dunphy GB, Mandato CA. Cyclic AMP affects the haemocyte responses of larval *Galleria mellonella* to selected antigens. *J Insect Physiol.* 2005;51(5):575-86. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.02.010>.
319. Martens EC, Goodrich-Blair H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation. *Cell Microbiol.* 2005;7(12):1723-35. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00585.x>.
320. Martin M, Hiroyasu A, Guzman RM, Roberts SA, Goodman AG. Analysis of *Drosophila* STING reveals an evolutionarily conserved antimicrobial function. *Cell Rep.* 2018;23(12):3537-+. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.029>.
321. Massaoud MK, Marokhazi J, Venekei I. Enzymatic characterization of a Serralysin-like metalloprotease from the entomopathogen bacterium, *Xenorhabdus*. *BBA-Proteins Proteom.* 2011;1814(10):1333-9. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.05.008>.
322. Mastore M, Arizza V, Manachini B, Brivio MF. Modulation of immune responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Insecta: Coleoptera) induced by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Rhabditida). *Insect Sci.* 2015;22(6):748-60. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12141>.
323. Mastore M, Brivio MF. Cuticular surface lipids are responsible for disguise properties of an entomoparasite against host cellular responses. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(9):1050-62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.02.003>.
324. Matskevich AA, Quintin J, Ferrandon D. The *Drosophila* PRR GGBP3 assembles effector complexes involved in antifungal defenses independently of its Toll-pathway activation function. *Eur J Immunol.* 2010;40(5):1244-54. <https://doi.org/10.1002/eji.200940164>.
325. Mavrouli MD, Tsakas S, Theodorou GL, Lampropoulou M, Marmaras VJ. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes. *BBA-Mol Cell Res.* 2005;1744(2):145-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.04.011>.
326. McMullen JG, Peterson BF, Forst S, Blair HG, Stock SP. Fitness costs of symbiont switching using entomopathogenic nematodes as a model. *BMC Evol Biol.* 2017;17. <https://doi.org/10.1186/S12862-017-0939-6>.
327. Medina M, Leon P, Vallejo CG. *Drosophila* Cathepsin-B-like proteinase -A suggested role in yolk degradation. *Arch Biochem Biophys.* 1988;263(2):355-63. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90646-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90646-7).
328. Melcarne C, Lemaitre B, Kurant E. Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochem Mol Biol.* 2019;109:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>.
329. Melcarne C, Ramond E, Dudzic J, Bretscher AJ, Kurucz E, Ando I, et al. Two Nimrod receptors, NimC1 and Eater, synergistically contribute to bacterial phagocytosis in *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* 2019;286(14):2670-91. <https://doi.org/10.1111/febs.14857>.
330. Menti H, Wright DJ, Perry RN. Desiccation survival of populations of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. *J Helminthol.* 1997;71(1):41-6. <https://doi.org/10.1017/S0022149x00000778>.
331. Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature.* 2001;414(6865):756-9. <https://doi.org/10.1038/414756a>.
332. Miguel-Aliaga I, Jasper H, Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 2018;210(2):357-96. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300224>.
333. Miller JS. Eicosanoids influence *in vitro* elongation of plasmatocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2005;59(1):42-51. <https://doi.org/10.1002/arch.20052>.

334. Minakhina S, Yang J, Steward R. Tamo selectively modulates nuclear import in *Drosophila*. *Genes Cells*. 2003;8(4):299-310. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2002.00634.x>.
335. Moita LF, Wang-Sattler R, Michel K, Zimmermann T, Blandin S, Levashina EA, et al. *In vivo* identification of novel regulators and conserved pathways of phagocytosis in *A. gambiae*. *Immunity*. 2005;23(1):65-73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.05.006>.
336. Monpeysson M, Beaulaton J. Hemocytopoiesis in oak silkworm *Antheraea pernyi* and some other Lepidoptera .1. Ultrastructural study of normal processes. *J Ultrastruct Res*. 1978;64(1):35-45. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(78\)90005-9](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(78)90005-9).
337. Moran NA, Russell JA, Koga R, Fukatsu T. Evolutionary relationships of three new species of Enterobacteriaceae living as symbionts of aphids and other insects. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(6):3302-10. <https://doi.org/10.1128/Aem.71.6.3302-3310.2005>.
338. Morazzani EM, Wiley MR, Murreddu MG, Adelman ZN, Myles KM. Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito Soma. *Plos Pathog*. 2012;8(1):e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>.
339. Moreira CGA, Jacinto A, Prag S. *Drosophila* integrin adhesion complexes are essential for hemocyte migration *in vivo*. *Biol Open*. 2013;2(8):795-801. <https://doi.org/10.1242/bio.20134564>.
340. Moreira S, Stramer B, Evans I, Wood W, Martin P. Prioritization of competing damage and developmental signals by migrating macrophages in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*. 2010;20(5):464-70. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.047>.
341. Mortimer NT, Kacsoh BZ, Keebaugh ES, Schlenke TA. Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *Plos Pathog*. 2012;8(7):e1002819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002819>.
342. Mouammine A, Pages S, Lanois A, Gaudriault S, Jubelin G, Bonabaud M, et al. An antimicrobial peptide-resistant minor subpopulation of *Photobacterium luminescens* is responsible for virulence. *Sci Rep*. 2017;7:43670. <https://doi.org/10.1038/Srep43670>.
343. Moussian B. The Arthropod cuticle. In: *Arthropod biology and evolution: Molecules, development, morphology*, Minelli A, Boxshall G, Fusco G editors, Springer Science & Business Media. 2013. p171-90. [https://books.google.fr/books?id=cfU\\_AAAAQBAJ&pg](https://books.google.fr/books?id=cfU_AAAAQBAJ&pg).
344. Muangpat P, Yooyangket T, Fukruksa C, Suwannaroj M, Yimthin T, Sitthisak S, et al. Screening of the antimicrobial activity against drug resistant bacteria of *Photobacterium* and *Xenorhabdus* associated with entomopathogenic nematodes from Mae Wong national park, Thailand. *Front Microbiol*. 2017;8. <https://doi.org/10.3389/Fmicb.2017.01142>.
345. Murakami R, Shigenaga A, Kawano E, Matsumoto A, Yamaoka I, Tanimura T. Novel tissue units of regional differentiation in the gut epithelium of *Drosophila*, as revealed by P-element-mediated detection of enhancer. *Roux Arch Dev Biol*. 1994;203(5):243-9. <https://doi.org/10.1007/Bf00360519>.
346. Murfin KE, Lee MM, Klassen JL, McDonald BR, Larget B, Forst S, et al. *Xenorhabdus bovienii* strain diversity impacts coevolution and symbiotic maintenance with *Steinernema* spp. nematode hosts. *mBio*. 2015;6(3):e00076. <https://doi.org/10.1128/mBio.00076-15>.
347. Myers AL, Harris CM, Choe KM, Brennan CA. Inflammatory production of reactive oxygen species by *Drosophila* hemocytes activates cellular immune defenses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;505(3):726-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.126>.
348. Myllymaki H, Valanne S, Ramet M. The *Drosophila* Imd signaling pathway. *J Immunol*. 2014;192(8):3455-62. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>.
349. Nagaosa K, Okada R, Nonaka S, Takeuchi K, Fujita Y, Miyasaka T, et al. Integrin  $\beta$ v-mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25770-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204503>.

350. Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M. Effects of silkworm paralytic peptide on *in vitro* hematopoiesis and plasmatocyte spreading. Arch Insect Biochem Physiol. 2003;52(4):163-74. <https://doi.org/10.1002/arch.10080>.
351. Nakahara Y, Matsumoto H, Kanamori Y, Kataoka H, Mizoguchi A, Kiuchi M, et al. Insulin signaling is involved in hematopoietic regulation in an insect hematopoietic organ. J Insect Physiol. 2006;52(1):105-11. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.09.009>.
352. Nakatogawa S, Oda Y, Kamiya M, Kamijima T, Aizawa T, Clark KD, et al. A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. Curr Biol. 2009;19(9):779-85. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.050>.
353. Nakhleh J, El Moussawi L, Osta MA. Chapter 3 - The melanization response in insect immunity. In: *Advances in Insect Physiology*, Ligoxygakis P editor, Academic Press. 2017. p83-109. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.11.002>.
354. Nam HJ, Jang IH, You H, Lee KA, Lee WJ. Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Haya protease-Phenoloxidase system in *Drosophila*. EMBO J. 2012;31(5):1253-65. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.476>.
355. Nappi AJ, Carton Y, Frey F. Parasite-induced enhancement of hemolymph Tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. Arch Insect Biochem Physiol. 1991;18(3):159-68. <https://doi.org/10.1002/arch.940180304>.
356. Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. Insect Biochem Mol Biol. 2005;35(5):443-59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>.
357. Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. Nitric Oxide-Biol Ch. 2000;4(4):423-30. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0294>.
358. Nardi JB. Embryonic origins of the two main classes of hemocytes - granular cells and plasmatocytes - in *Manduca sexta*. Dev Genes Evol. 2004;214(1):19-28. <https://doi.org/10.1007/s00427-003-0371-3>.
359. Nardi JB, Pilas B, Bee CM, Zhuang SF, Garsha K, Kanost MR. Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. Dev Comp Immunol. 2006;30(5):447-62. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.026>.
360. Nayduch D, Joyner C. Expression of Lysozyme in the life history of the house fly (*Musca domestica* L.). J Med Entomol. 2013;50(4):847-52. <https://doi.org/10.1603/ME12167>.
361. Nazario-Toole AE, Wu LP. Chapter 2 - Phagocytosis in insect immunity. In: *Advances in Insect Physiology*, Ligoxygakis P editor, Academic Press. 2017. p35-82. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.12.001>.
362. Nehme NT, Quintin J, Cho JH, Lee J, Lafarge MC, Kocks C, et al. Relative roles of the cellular and humoral responses in the *Drosophila* host defense against three Gram-positive bacterial infections. Plos One. 2011;6(3):e14743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014743>.
363. Neyen C, Poidevin M, Roussel A, Lemaitre B. Tissue- and Ligand-Specific Sensing of Gram-Negative Infection in *Drosophila* by PGRP-LC Isoforms and PGRP-LE. J Immunol. 2012;189(4):1886-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201022>.
364. Ngai M, Shoue DA, Loh Z, McDowell MA. The pharmacological and functional characterization of the serotonergic system in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*: Influences on flight and blood-feeding behavior. Sci Rep. 2019;9:4421. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-38806-1>.
365. Nitao JK, Meyer SLF, Chitwood DJ. *In vitro* assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. J Nematol. 1999;31(2):172-83.
366. Nonaka S, Nagaosa K, Mori T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Integrin  $\alpha$ PS3/ $\beta$ v-mediated phagocytosis of apoptotic cells and bacteria in *Drosophila*. J Biol Chem. 2013;288(15):10374-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.451427>.



367. Oda Y, Matsumoto H, Kurakake M, Ochiai M, Ohnishi A, Hayakawa Y. Adaptor protein is essential for insect cytokine signaling in hemocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(36):15862-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003785107>.
368. Ogier JC, Pages S, Bisch G, Chiapello H, Medigue C, Rouy Z, et al. Attenuated virulence and genomic reductive evolution in the entomopathogenic bacterial symbiont Species, *Xenorhabdus poinarii*. *Genome Biol Evol*. 2014;6(6):1495-513. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu119>.
369. Ohnishi A, Hayakawa Y, Matsuda Y, Kwon KW, Takahashi TA, Sekiguchi S. Growth-blocking peptide titer during larval development of parasitized and cold-stressed armyworm. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995;25(10):1121-7. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00054-2](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00054-2).
370. Oliver AD, Chapin JB. Biology and illustrated key for the identification of 20 species of economically important noctuid pests. *LA AES Bull*. 1981(733):1-25.
371. Olivieri D, Sykora MM, Sachidanandam R, Mechtler K, Brennecke J. An *in vivo* RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. *EMBO J*. 2010;29(19):3301-17. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.212>.
372. Osborne RH. Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol Therapeut*. 1996;69(2):117-42. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(95\)02054-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(95)02054-3).
373. Otvos L, O I, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, et al. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*. 2000;39(46):14150-14159. <https://doi.org/10.1021/bi0012843>.
374. Overend G, Luo Y, Henderson L, Douglas AE, Davies SA, Dow JAT. Molecular mechanism and functional significance of acid generation in the *Drosophila* midgut. *Sci Rep*. 2016;6:27242. <https://doi.org/10.1038/Srep27242>.
375. Ozakman Y, Eleftherianos I. TGF- $\beta$  signaling interferes with the *Drosophila* innate immune and metabolic response to parasitic nematode infection. *Front Physiol*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/Fphys.2019.00716>.
376. Pace KE, Baum LG. Insect galectins: Roles in immunity and development. *Glycoconj J*. 2002;19(7-9):607-14. <https://doi.org/10.1023/B:Glyc.0000014092.86763.2f>.
377. Paladi M, Tepass U. Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in *Drosophila*. *J Cell Sci*. 2004;117(26):6313-26. <https://doi.org/10.1242/jcs.01552>.
378. Park J, Stanley D, Kim Y. Rac1 mediates cytokine-stimulated hemocyte spreading via prostaglandin biosynthesis in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol*. 2013;59(7):682-9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.04.012>.
379. Park JW, Je BR, Piao S, Inamura S, Fujimoto Y, Fukase K, et al. A synthetic peptidoglycan fragment as a competitive inhibitor of the melanization cascade. *J Biol Chem*. 2006;281(12):7747-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510058200>.
380. Park Y, Herbert EE, Cowles CE, Cowles KN, Menard ML, Orchard SS, et al. Clonal variation in *Xenorhabdus nematophila* virulence and suppression of *Manduca sexta* immunity. *Cell Microbiol*. 2007;9(3):645-56. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00815.x>.
381. Park Y, Kim Y. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Insect Physiol*. 2000;46(11):1469-76. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00071-8).
382. Park Y, Kim Y. *Xenorhabdus nematophilus* inhibits p-bromophenacyl bromide (BPB)-sensitive PLA<sub>2</sub> of *Spodoptera exigua*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2003;54(3):134-42. <https://doi.org/10.1002/arch.10108>.
383. Park Y, Stanley D. The entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, impairs hemocytic immunity by inhibition of eicosanoid biosynthesis in adult crickets, *Gryllus firmus*. *Biol Control*. 2006;38(2):247-53. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.002>.
384. Park Y, Stanley DW, Kim Y. Eicosanoids up-regulate production of reactive oxygen species by NADPH-dependent oxidase in *Spodoptera exigua* phagocytic hemocytes. *J Insect Physiol*. 2015;79:63-72. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.06.005>.

385. Patrnoic J, Heryanto C, Eleftherianos I. Wounding-induced upregulation of the Bone Morphogenic Protein signaling pathway in *Drosophila* promotes survival against parasitic nematode infection. *Gene*. 2018;673:112-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.052>.
386. Patrnoic J, Heryanto C, Eleftherianos I. Transcriptional up-regulation of the TGF- intracellular signaling transducer Mad of *Drosophila* larvae in response to parasitic nematode infection. *Innate Immun*. 2018;24(6):349-56. <https://doi.org/10.1177/1753425918790663>.
387. Paul VJ, Frautschy S, Fenical W, Nealon KH. Antibiotics in microbial ecology - Isolation and structure assignment of several new anti-bacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* Spp. *J Chem Ecol*. 1981;7(3):589-97. <https://doi.org/10.1007/Bf00987707>.
388. Pearson AM, Baksa K, Ramet M, Protas M, McKee M, Brown D, et al. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect*. 2003;5(10):815-24. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00157-6).
389. Pech LL, Strand MR. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci*. 1996;109:2053-60.
390. Pech LL, Strand MR. Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J Insect Physiol*. 2000;46(12):1565-73. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00083-4).
391. Pelte N, Robertson AS, Zou Z, Belorgey D, Dafforn TR, Jiang HB, et al. Immune challenge induces N-terminal cleavage of the *Drosophila* serpin Necrotic. *Insect Biochem Mol Biol*. 2006;36(1):37-46. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.10.004>.
392. Pena JM, Carrillo MA, Hallem EA. Variation in the susceptibility of *Drosophila* to different entomopathogenic nematodes. *Infect Immun*. 2015;83(3):1130-8. <https://doi.org/10.1128/iai.02740-14>.
393. Perry RN, Ehlers RU, Glazer I. A realistic appraisal of methods to enhance desiccation tolerance of entomopathogenic nematodes. *J Nematol*. 2012;44(2):185-90.
394. Peters A. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp and their impact on insect populations. *Biocontrol Sci Techn*. 1996;6(3):389-402. <https://doi.org/10.1080/09583159631361>.
395. Peters A, Ehlers RU. Susceptibility of leatherjackets (*Tipula paludosa* and *Tipula oleracea*, Tipulidae, Nematocera) to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *J Invertebr Pathol*. 1994;63(2):163-71. <https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1031>.
396. Peters A, Gouge DH, Ehlers RU, Hague NGM. Avoidance of encapsulation by *Heterorhabditis* spp. infecting larvae of *Tipula oleracea*. *J Invertebr Pathol*. 1997;70(2):161-4. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4681>.
397. Petersen LM, Tisa LS. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol*. 2013;59(9):627-40. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0343>.
398. Philips JA, Rubin EJ, Perrimon N. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*. 2005;309(5738):1251-3. <https://doi.org/10.1126/science.1116006>.
399. Poinar GO. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* Sp. (Steinernematidae: Nematoda). *Nematologica*. 1966;12(1):105-8. <https://doi.org/10.1163/187529266X00068>.
400. Poinar GO. Nematodes for biological control of insects. Gaugler R, editor: Boca Raton, Florida, CRC Press; 1979. 270 p. <https://books.google.fr/books?id=10paDwAAQBAJ&pg>.
401. Poinar GO. Origins and phylogenetic-relationships of the entomophilic Rhabditis, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. *Fundam Appl Nematol*. 1993;16(4):333-8.
402. Poinar GO, Grewal PS. History of entomopathogenic nematology. *J Nematol*. 2012;44(2):153-61.

403. Poinar GO, Hunt DJ, Perry RN. Nematodes from de Mesozoic. In: *The Evolutionary History of Nematodes: As revealed in stone, amber and mummies*, Hunt DJ, Perry RN editors, Leiden, Nederland: Brill. 2011. p27-52. [https://doi.org/10.1163/9789047428664\\_007](https://doi.org/10.1163/9789047428664_007).
404. Povelones M, Bhagavatula L, Yassine H, Tan LA, Upton LM, Osta MA, et al. The CLIP-domain serine protease homolog SPCLIP1 regulates complement recruitment to microbial surfaces in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Plos Pathog*. 2013;9(9):e1003623. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003623>.
405. Qiao C, Li J, Wei XH, Wang JL, Wang YF, Liu XS. SRP gene is required for *Helicoverpa armigera* prophenoloxidase activation and nodulation response. *Dev Comp Immunol*. 2014;44(1):94-9. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.11.016>.
406. Rabel D, Charlet M, Ehret-Sabatier L, Cavicchioli L, Cudic M, Otvos L, et al. Primary structure and *in vitro* antibacterial properties of the *Drosophila melanogaster* Attacin C pro-domain. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14853-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313608200>.
407. Raha D, Wang Z, Moqtaderi Z, Wu LF, Zhong GN, Gerstein M, et al. Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(8):3639-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911315106>.
408. Rahatkhah Z, Karimi J, Ghadamyari M, Brivio MF. Immune defenses of *Agriotes lineatus* larvae against entomopathogenic nematodes. *Biocontrol*. 2015;60(5):641-53. <https://doi.org/10.1007/s10526-015-9678-z>.
409. Rahnamaeian M, Cytrynska M, Zdybicka-Barabas A, Dobszlaff K, Wiesner J, Twyman RM, et al. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1806):20150293. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0293>.
410. Rahnamaeian M, Cytrynska M, Zdybicka-Barabas A, Vilcinskas A. The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation. *Peptides*. 2016;78:17-23. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.016>.
411. Ramet M, Manfruelli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RAB. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*. 2002;416(6881):644-8. <https://doi.org/10.1038/Nature735>.
412. Ramet M, Pearson A, Manfruelli P, Li XH, Koziel H, Gobel V, et al. *Drosophila* scavenger receptor Cl is a pattern recognition receptor for bacteria. *Immunity*. 2001;15(6):1027-38. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00249-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00249-7).
413. Ramos-Rodriguez O, Campbell JF, Christen JM, Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Ramaswamy SB. Attraction behaviour of three entomopathogenic nematode species towards infected and uninfected hosts. *Parasitology*. 2007;134:729-38. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001880>.
414. Rasmann S, Kollner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature*. 2005;434(7034):732-7. <https://doi.org/10.1038/nature03451>.
415. Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Curr Biol*. 2013;23(5):424-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.058>.
416. Reed DE, Huang XM, Wohlschlegel JA, Levine MS, Senger K. DEAF-1 regulates immunity gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(24):8351-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802921105>.
417. Reed EM, Wallace HR. Leaping locomotion by an insect-parasitic nematode. *Nature*. 1965;206(4980):210-1. <https://doi.org/10.1038/206210a0>.
418. Regulski M, Tully T. Molecular and biochemical characterization of DNOS - a *Drosophila* Ca<sub>2+</sub> Calmodulin-dependent nitric-oxide Synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9072-6. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9072>.
419. Ribeiro C, Vignes M, Brehelin M. *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriaceae) secretes a cation-selective calcium-independent porin which causes vacuolation of the rough

- endoplasmic reticulum and cell lysis. *J Biol Chem.* 2003;278(5):3030-9.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210353200>.
420. Riddiford LM. Molting. In: *Encyclopedia of Insects*, Resh VH, Cardé RT editors, Academic Press. 2009. p649-54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X>.
421. Rivera MJ, Martini X, Khrimian A, Stelinski L. A weevil sex pheromone serves as an attractant for its entomopathogenic nematode predators. *Chemoecology.* 2017;27(5):199-206.  
<https://doi.org/10.1007/s00049-017-0246-0>.
422. Rizki RM, Rizki TM. Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Roux Arch Dev Biol.* 1980;189(3):207-13. <https://doi.org/10.1007/Bf00868679>.
423. Rizki RM, Rizki TM, Bebbington CR, Roberts DB. *Drosophila* larval fat body surfaces - Changes in transplant compatibility during development. *Roux Arch Dev Biol.* 1983;192(1):1-7.  
<https://doi.org/10.1007/Bf00848762>.
424. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A fundamental process in immunity. *Biomed Res Int.* 2017;2017:18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>.
425. Rougon-Cardoso A, Flores-Ponce M, Ramos-Aboites HE, Martínez-Guerrero CE, Hao Y-J, Cunha L, et al. The genome, transcriptome, and proteome of the nematode *Steinernema carpocapsae*: evolutionary signatures of a pathogenic lifestyle. *Sci Rep.* 2016;6(1):37536.  
<https://doi.org/10.1038/srep37536>.
426. Ruiu L. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. *Insects.* 2015;6(2):352-67.  
<https://doi.org/10.3390/insects6020352>.
427. 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.* 1996;112:135-42.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182000065173>.
428. Sadekuzzaman M, Kim Y. Nitric oxide mediates antimicrobial peptide gene expression by activating eicosanoid signaling. *Plos One.* 2018;13(2):e0193282.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193282>.
429. Sadekuzzaman M, Stanley D, Kim Y. Nitric oxide mediates insect cellular immunity via Phospholipase A<sub>2</sub> activation. *J Innate Immun.* 2018;10(1):70-81.  
<https://doi.org/10.1159/000481524>.
430. Saikhedkar N, Summanwar A, Joshi R, Giri A. Cathepsins of lepidopteran insects: Aspects and prospects. *Insect Biochem Mol Biol.* 2015;64:51-9. 10.1016/j.ibmb.2015.07.005.
431. Sajnaga E, Kazimierczak W, Skowronek M, Lis M, Skrzypek T, Wasko A. *Steinernema poinari* (Nematoda: Steinernematidae): A new symbiotic host of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii*. *Arch Microbiol.* 2018;200(9):1307-16.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1544-9>.
432. Sampson CJ, Williams MJ. Real-time analysis of *Drosophila* post-embryonic haemocyte behaviour. *Plos One.* 2012;7(1):e28783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028783>.
433. Sander M, Squarr AJ, Risse B, Jiang XY, Bogdan S. *Drosophila* pupal macrophages - A versatile tool for combined *ex vivo* and *in vivo* imaging of actin dynamics at high resolution. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(10-11):349-54. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.09.003>.
434. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. Regulation of the immune response by TGF- $\beta$  from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(6).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>.
435. Satyavathi VV, Mohamed AA, Kumari S, Mamatha DM, Duvic B. The IMD pathway regulates lysozyme-like proteins (LLPs) in the silkworm *Antheraea mylitta*. *J Invertebr Pathol.* 2018;154:102-8. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.04.006>.
436. Schafer W. Nematode nervous systems. *Curr Biol.* 2016;26(20):R955-9.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.044>.

437. Schierack P, Walk N, Reiter K, Weyrauch KD, Wieler LH. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology*. 2007;153(Pt 11):3830-7. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010173-0>.
438. Schmid MR, Anderl I, Vesala L, Vanha-aho LM, Deng XJ, Ramet M, et al. Control of *Drosophila* blood cell activation via Toll signaling in the fat body. *Plos One*. 2014;9(8):e102568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102568>.
439. Schmid MR, Anderl I, Vo HTM, Valanne S, Yang HR, Kronhamn J, et al. Genetic screen in *Drosophila* larvae links ird1 function to Toll signaling in the fat body and hemocyte motility. *Plos One*. 2016;11(7):e0159473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159473>.
440. Schmid MR, Dziedziech A, Arefin B, Kienzle T, Wang Z, Akhter M, et al. Insect hemolymph coagulation: Kinetics of classically and non-classically secreted clotting factors. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019;109:63-71. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.007>.
441. Schmitt P, Wilmes M, Pugnieri M, Aumelas A, Bachere E, Sahl HG, et al. Insight into invertebrate defensin mechanism of action: oyster defensins inhibit peptidoglycan biosynthesis by binding to lipid II. *J Biol Chem*. 2010;285(38):29208-29216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143388>.
442. Schneider T, Kruse T, Wimmer R, Wiedemann I, Sass V, Pag U, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor Lipid II. *Science*. 2010;328(5982):1168-1172. <https://doi.org/10.1126/science.1185723>.
443. Schuster S, Miesen P, van Rij RP. Antiviral RNAi in insects and mammals: Parallels and differences. *Viruses*. 2019;11(5). <https://doi.org/10.3390/V11050448>.
444. Seo S, Lee S, Hong Y, Kim Y. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp *temperata*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(11):3816-23. <https://doi.org/10.1128/Aem.00301-12>.
445. Seong CS, Varela-Ramirez A, Aguilera RJ. DNase II deficiency impairs innate immune function in *Drosophila*. *Cell Immunol*. 2006;240(1):5-13. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.05.007>.
446. Serepa-Dlamini MH, Gray VM. A new species of entomopathogenic nematode *Osccheius safricana* n. sp. (Nematoda: Rhabditidae) from South Africa. *Archiv Phytopathol Plant Prot*. 2018;51(5-6):309-21. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1475281>.
447. Shapiro-Ilan DI, Campbell JF, Lewis EE, Elkon JM, Kim-Shapiro DB. Directional movement of steinernematid nematodes in response to electrical current. *J Invertebr Pathol*. 2009;100(2):134-7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.11.001>.
448. Shapiro-Ilan DI, Lewis EE, Campbell JF, Kim-Shapiro DB. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. *J Invertebr Pathol*. 2012;109(1):34-40. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.09.004>.
449. Shapiro-Ilan DI, Stuart RJ, McCoy CW. A comparison of entomopathogenic nematode longevity in soil under laboratory conditions. *J Nematol*. 2006;38(1):119-29.
450. Shears SB, Hayakawa Y. Functional multiplicity of an insect cytokine family assists defense against environmental stress. *Front Physiol*. 2019;10. <https://doi.org/10.3389/Fphys.2019.00222>.
451. Shokal U, Eleftherianos I. The *Drosophila* Thioester containing protein-4 participates in the induction of the cellular immune response to the pathogen *Photorhabdus*. *Dev Comp Immunol*. 2017;76:200-8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.06.008>.
452. Shokal U, Kopydlowski H, Eleftherianos I. The distinct function of Tep2 and Tep6 in the immune defense of *Drosophila melanogaster* against the pathogen *Photorhabdus*. *Virulence*. 2017;8(8):1668-82. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1330240>.
453. Shrestha S, Kim Y. Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Biosci Biotech Bioch*. 2009;73(9):2077-84. <https://doi.org/10.1271/bbb.90272>.

454. Shrestha S, Kim Y. Activation of immune-associated phospholipase A<sub>2</sub> is functionally linked to Toll/Imd signal pathways in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(5):530-7. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.013>.
455. Shrestha S, Kim YG. An entomopathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophila*, inhibits hemocyte phagocytosis of *Spodoptera exigua* by inhibiting phospholipase A<sub>2</sub>. *J Invertebr Pathol*. 2007;96(1):64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.009>.
456. Shrestha S, Park J, Ahn SJ, Kim Y. PGE<sub>2</sub> mediates oenocytoid cell lysis via a sodium-potassium-chloride cotransporter. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2015;89(4):218-29. <https://doi.org/10.1002/arch.21238>.
457. Shrestha S, Stanley D, Kim Y. PGE<sub>2</sub> induces oenocytoid cell lysis via a G protein-coupled receptor in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *J Insect Physiol*. 2011;57(11):1568-76. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.08.010>.
458. Sicard M, Brugirard-Ricaud K, Pages S, Lanois A, Boemare NE, Brehelin M, et al. Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(11):6473-80. <https://doi.org/10.1128/Aem.70.11.6473-6480.2004>.
459. Sicard M, Ferdy JB, Pages S, Le Brun N, Godelle B, Boemare N, et al. When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J Evol Biol*. 2004;17(5):985-93. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00748.x>.
460. Sicard M, Ramone H, Le Brun N, Pages S, Moulia C. Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbiont. *Naturwissenschaften*. 2005;92(10):472-6. <https://doi.org/10.1007/s00114-005-0021-x>.
461. Sideri M, Tsakas S, Markoutsas E, Lampropoulou M, Marmaras VJ. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes. *Immunology*. 2008;123(4):528-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02722.x>.
462. Silva CP, Waterfield NR, Daborn PJ, Dean P, Chilver T, Au CPY, et al. Bacterial infection of a model insect: *Photorehabdus luminescens* and *Manduca sexta*. *Cell Microbiol*. 2002;4(6):329-39. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00194.x>.
463. Simoes N, Caldas C, Rosa JS, Bonifassi E, Laumond C. Pathogenicity caused by high virulent and low virulent strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*. 2000;75(1):47-54. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4899>.
464. Sinenko SA, Shim J, Banerjee U. Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep*. 2012;13(1):83-9. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.223>.
465. Singh S, Reese JM, Casanova-Torres AM, Goodrich-Blair H, Forst S. Microbial population dynamics in the hemolymph of *Manduca sexta* infected with *Xenorhabdus nematophila* and the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(14):4277-85. <https://doi.org/10.1128/Aem.00768-14>.
466. Skinner WS, Dennis PA, Li JP, Summerfelt RM, Carney RL, Quistad GB. Isolation and identification of paralytic peptides from hemolymph of the Lepidopteran insects *Manduca sexta*, *Spodoptera exigua*, and *Heliothis virescens*. *J Biol Chem*. 1991;266(20):12873-7.
467. 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(2):471-U64. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159210>.
468. Snyder H, Stock SP, Kim SK, Flores-Lara Y, Forst S. New insights into the colonization and release processes of *Xenorhabdus nematophila* and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of its nematode host, *Steinernema carpocapsae*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(16):5338-46. <https://doi.org/10.1128/Aem.02947-06>.

469. Sorrentino RP, Carton Y, Govind S. Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol.* 2002;243(1):65-80. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0542>.
470. Sowa-Jasilek A, Zdybicka-Barabas A, Staczek S, Wydrych J, Mak P, Jakubowicz T, et al. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides.* 2014;53:194-201. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.01.012>.
471. Sparks AN. A review of the biology of the fall armyworm. *The Florida entomologist.* 1979;62(2):82-7. <https://doi.org/10.2307/3494083>.
472. Spiridonov SE, Subbotin SA. Phylogeny and phylogeography of *Heterorhabditis* and *Steinernema*. In: *Advances in Entomopathogenic Nematode Taxonomy and Phylogeny. Nematology monographs and perspectives*, Hunt DJ, Nguyen KB editors, Brill. 2016. p413-27. <https://books.google.fr/books?id=AlpFDQAAQBAJ&pg>.
473. Sproer C, Mendrock U, Swiderski J, Lang E, Stackebrandt E. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:1433-8. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1433>.
474. Srikanth K, Park J, Stanley DW, Kim Y. Plasmacyte-spreading peptide influences hemocyte behavior via eicosanoids. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2011;78(3):145-60. <https://doi.org/10.1002/arch.20450>.
475. Stanley D, Kim Y. Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Front Endocrinol.* 2011;2:105. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00105>.
476. Stanley D, Kim Y. Prostaglandins and other Eicosanoids in insects: Biosynthesis and biological actions. *Front Physiol.* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01927>.
477. Stevens LJ, Page-McCaw A. A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing. *Mol Biol Cell.* 2012;23(6):1068-79. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0745>.
478. Stilwell MD, Cao MY, Goodrich-Blair H, Weibel DB. Studying the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in individual, living *Steinernema carpocapsae* nematodes using microfluidic systems. *mSphere.* 2018;3(1):e00530-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00530-17>.
479. Stock SP. (2015). "Diversity, Biology and Evolutionary Relationships" in *Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests: Ecology and Applied Technologies for Sustainable Plant and Crop Protection*, ed. Campos-Herrera R. Cham: (Springer International Publishing) pp 3-27. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_1).
480. Stofanko M, Kwon SY, Badenhorst P. A misexpression screen to identify regulators of *drosophila* larval hemocyte development. *Genetics.* 2008;180(1):253-67. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.089094>.
481. Stramer B, Wood W, Galko MJ, Redd MJ, Jacinto A, Parkhurst SM, et al. Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during *in vivo* cell migration. *J Cell Biol.* 2005;168(4):567-73. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405120>.
482. Strand M, Micchelli CA. Regional control of *Drosophila* gut stem cell proliferation: EGF establishes GSSC proliferative set point & controls emergence from quiescence. *Plos One.* 2013;8(11):e80608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080608>.
483. Strand MR. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 2008;15(1):1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>.
484. Strand MR, Clark KD. Plasmacyte spreading peptide induces spreading of plasmacytes but represses spreading of granulocytes. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1999;42(3):213-23. [https://doi.org/10.1002/\(Sici\)1520-6327\(199911\)42:3](https://doi.org/10.1002/(Sici)1520-6327(199911)42:3)
485. Strand MR, Hayakawa Y, Clark KD. Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *J Insect Physiol.* 2000;46(5):817-24. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00171-7).

486. Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD. Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. Plos Biol. 2006;4(1):87-99. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040004>.
487. Stuart LM, Deng JS, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessey EJ, et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. J Cell Biol. 2005;170(3):477-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501113>.
488. Stuart RJ, Shapiro-Ilan DI, James RR, Nguyen KB, McCoy CW. Virulence of new and mixed strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to larvae of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus*. Biol Control. 2004;30(2):439-45. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2003.11.004>.
489. Sumathipala N, Jiang HB. Involvement of *Manduca sexta* peptidoglycan recognition protein-1 in the recognition of bacteria and activation of prophenoloxidase system. Insect Biochem Mol Biol. 2010;40(6):487-95. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.04.008>.
490. Sung EJ, Ryuda M, Matsumoto H, Uryu O, Ochiai M, Cook ME, et al. Cytokine signaling through *Drosophila* Mthl10 ties lifespan to environmental stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(52):13786-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712453115>.
491. Takahashi D, Dai HE, Hiromasa Y, Krishnamoorthi R, Kanost MR. Self-association of an insect  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein upon binding laminarin stimulates prophenoloxidase activation as an innate immune response. J Biol Chem. 2014;289(41):28399-410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583971>.
492. Takehana A, Katsuyama T, Yano T, Oshima Y, Takada H, Aigaki T, et al. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates Imd/Relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(21):13705-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.212301199>.
493. Takehana A, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. EMBO J. 2004;23(23):4690-700. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600466>.
494. Tan J, Xu M, Zhang K, Wang X, Chen SY, Li T, et al. Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol. 2013;59(6):595-603. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.008>.
495. Tang HP. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. Fly. 2009;3(1):105-11. <https://doi.org/10.4161/Fly.3.1.7747>.
496. Tanji T, Yun EY, Ip YT. Heterodimers of NF- $\kappa$ B transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(33):14715-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009473107>.
497. Tassetto M, Kunitomi M, Andino R. Circulating immune cells mediate a systemic RNAi-based adaptive antiviral response in *Drosophila*. Cell. 2017;169(2):314-25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.033>.
498. Teleman AA. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. Biochem J. 2010;425:13-26. <https://doi.org/10.1042/Bj20091181>.
499. Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V. Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell-death in *Drosophila*. Development. 1994;120(7):1829-37.
500. Terenius O, Papanicolaou A, Garbutt JS, Eleftherianos I, Huvenne H, Kanginakudru S, et al. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. J Insect Physiol. 2011;57(2):231-45. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.11.006>.
501. Thevissen K, Warnecke DC, Francois IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, et al. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. J Biol Chem. 2004;279(6):3900-3905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>.



502. Timper P, Kaya HK. Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematodes in preventing infection by nematophagous fungi. *J Invertebr Pathol.* 1989;54(3):314-21. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90115-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90115-8).
503. Tingvall TO, Roos E, Engstrom Y. The Imd gene is required for local Cecropin expression in *Drosophila* barrier epithelia. *EMBO Rep.* 2001;2(3):239-43. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve048>
504. Tokusumi T, Sorrentino RP, Russell M, Ferrarese R, Govind S, Schulz RA. Characterization of a lamellocyte transcriptional enhancer located within the misshapen gene of *Drosophila melanogaster*. *Plos One.* 2009;4(7):e6429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006429>.
505. Tokusumi T, Tokusumi Y, Brahier MS, Lam V, Stoller-Conrad JR, Kroeger PT, et al. Screening and analysis of Janelia FlyLight project enhancer-Gal4 strains identifies multiple gene enhancers active during hematopoiesis in normal and wasp-challenged *Drosophila* larvae. *G3 (Bethesda).* 2017;7(2):437-48. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034439>.
506. Tonelli M, Penafior MFGV, Leite LG, Silva WD, Martins F, Bento JMS. Attraction of entomopathogenic nematodes to sugarcane root volatiles under herbivory by a sap-sucking insect. *Chemoecology.* 2016;26(2):59-66. <https://doi.org/10.1007/s00049-016-0207-z>.
507. Tong YR, Jiang HB, Kanost MR. Identification of plasma proteases inhibited by *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 and their association with components of the prophenol oxidase activation pathway. *J Biol Chem.* 2005;280(15):14932-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500532200>.
508. Torr P, Heritage S, Wilson MJ. Vibrations as a novel signal for host location by parasitic nematodes. *Int J Parasitol.* 2004;34(9):997-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.05.003>.
509. Torres-Barragan A, Suazo A, Buhler WG, Cardoza YJ. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. *Biol Control.* 2011;59(2):123-9. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.020>.
510. Torrini G, Mazza G, Carletti B, Benvenuti C, Roversi PF, Fanelli E, et al. *Oscheius onirici* sp n. (Nematoda: Rhabditidae): a new entomopathogenic nematode from an Italian cave. *Zootaxa.* 2015;3937(3):533-48. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3937.3.6>.
511. Toubarro D, Avila MM, Hao YJ, Balasubramanian N, Jing YJ, Montiel R, et al. A Serpin released by an entomopathogen impairs clot formation in insect defense system. *Plos One.* 2013;8(7):e69161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069161>.
512. Toubarro D, Avila MM, Montiel R, Simoes N. A Pathogenic nematode targets recognition proteins to avoid insect defenses. *Plos One.* 2013;8(9):e75691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075691>.
513. Toubarro D, Lucena-Robles M, Nascimento G, Costa G, Montiel R, Coelho AV, et al. An apoptosis-inducing serine protease secreted by the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Int J Parasitol.* 2009;39(12):1319-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.013>.
514. Toubarro D, Lucena-Robles M, Nascimento G, Santos R, Montiel R, Verissimo P, et al. Serine protease-mediated host invasion by the parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J Biol Chem.* 2010;285(40):30666-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129346>.
515. Tsai CR, Anderson AE, Burra S, Jo J, Galko MJ. Yorkie regulates epidermal wound healing in *Drosophila* larvae independently of cell proliferation and apoptosis. *Dev Biol.* 2017;427(1):61-71. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.05.006>.
516. Tsai CR, Wang Y, Galko MJ. Crawling wounded: molecular genetic insights into wound healing from *Drosophila* larvae. *Int J Dev Biol.* 2018;62(6-8):479-89. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180085mg>.
517. Tsarouhas V, Yao LQ, Samakovlis C. Src kinases and ERK activate distinct responses to Stitcher receptor tyrosine kinase signaling during wound healing in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 2014;127(8):1829-39. <https://doi.org/10.1242/jcs.143016>.

518. Tsuzuki S, Matsumoto H, Furihata S, Ryuda M, Tanaka H, Sung EJ, et al. Switching between humoral and cellular immune responses in *Drosophila* is guided by the cytokine GBP. *Nat Commun.* 2014;5:4628. <https://doi.org/10.1038/ncomms5628>.
519. Tsuzuki S, Ochiai M, Matsumoto H, Kurata S, Ohnishi A, Hayakawa Y. *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Sci Rep.* 2012;2:210. <https://doi.org/10.1038/srep00210>.
520. Tucker PK, Evans IR, Wood W. Ena drives invasive macrophage migration in *Drosophila* embryos. *Dis Model Mech.* 2011;4(1):126-34. <https://doi.org/10.1242/dmm.005694>.
521. Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, et al. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity.* 2000;13(5):737-48. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00072-8).
522. Ulvila J, Parikka M, Kleino A, Sormunen R, Ezekowitz RA, Kocks C, et al. Double-stranded RNA is internalized by scavenger receptor-mediated endocytosis in *Drosophila* S2 cells. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14370-5. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513868200>.
523. Upadhyay A, Moss-Taylor L, Kim MJ, Ghosh AC, O'Connor MB. TGF- $\beta$  family signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022152>.
524. Uttenweiler-Joseph S, Moniatte M, Lagueux M, Van Dorsselaer A, Hoffmann JA, Bulet P. Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(19):11342-11347. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11342>.
525. Uvell H, Engstrom Y. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet.* 2007;23(7):342-9. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.05.003>.
526. Valanne S, Myllymaki H, Kallio J, Schmid MR, Kleino A, Murumagi A, et al. Genome-wide RNA interference in *Drosophila* cells identifies G protein-coupled receptor kinase 2 as a conserved regulator of NF- $\kappa$ B signaling. *J Immunol.* 2010;184(11):6188-98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000261>.
527. Valanne S, Wang JH, Ramet M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol.* 2011;186(2):649-56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>.
528. Valizadeh A. The occurrence of three species of the genus *Oscheius Andr ssy*, 1976 (Nematoda: Rhabditida) in Iran. *J Plant Prot Res.* 2017;57(3):248–55. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0035>.
529. van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, et al. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology.* 2009;11:927-S27. <https://doi.org/10.1163/156854109X456862>.
530. Varma D, Bulow MH, Pesch YY, Loch G, Hoch M. Forkhead, a new cross regulator of metabolism and innate immunity downstream of TOR in *Drosophila*. *J Insect Physiol.* 2014;69:80-8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.04.006>.
531. Vavricka CJ, Christensen BM, Li JY. Melanization in living organisms: a perspective of species evolution. *Protein Cell.* 2010;1(9):830-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0109-8>.
532. Vieira CS, Waniek PJ, Castro DP, Mattos DP, Moreira OC, Azambuja P. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasite Vector.* 2016;9(1):119. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1398-4>.
533. Vigneux F, Zumbihl R, Jubelin G, Ribeiro C, Poncet J, Baghdiguan S, et al. The xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens. *J Biol Chem.* 2007;282(13):9571-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604301200>.
534. Vilcinskas A, Wedde M. Insect inhibitors of metalloproteinases. *Iubmb Life.* 2002;54(6):339-43. <https://doi.org/10.1080/15216540290114694>.

535. Viljakainen L. Evolutionary genetics of insect innate immunity. *Brief Funct Genomics*. 2015;14(6):407-12. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elv002>.
536. Visschedyk DD, Perieteanu AA, Turgeon ZJ, Fieldhouse RJ, Dawson JF, Merrill AR. Photox, a novel actin-targeting mono-ADP-ribosyltransferase from *Photobacterium luminescens*. *J Biol Chem*. 2010;285(18):13525-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077339>.
537. Vlisidou I, Dowling AJ, Evans IR, Waterfield N, Ffrench-Constant RH, Wood W. *Drosophila* embryos as model systems for monitoring bacterial infection in Real Time. *Plos Pathog*. 2009;5(7):e1000518. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000518>.
538. Vlisidou I, Hapeshi A, Healey JRJ, Smart K, Yang GW, Waterfield NR. The *Photobacterium asymbiotica* virulence cassettes deliver protein effectors directly into target eukaryotic cells. *Elife*. 2019;8:e46259. <https://doi.org/10.7554/eLife.46259>.
539. Vlisidou I, Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J*. 2015;282(8):1368-82. <https://doi.org/10.1111/febs.13235>.
540. Vodovar N, Bronkhorst AW, van Cleef KWR, Miesen P, Blanc H, van Rij RP, et al. Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *Plos One*. 2012;7(1):e30861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030861>.
541. Walter TN, Dunphy GB, Mandato CA. *Steinernema carpocapsae* DD136: Metabolites limit the non-self adhesion responses of haemocytes of two lepidopteran larvae, *Galleria mellonella* (F. Pyralidae) and *Malacosoma disstria* (F. Lasiocampidae). *Exp Parasitol*. 2008;120(2):161-74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.07.001>.
542. Wang JX, Bedding RA. Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. *Fundam Appl Nematol*. 1996;19(4):363-7.
543. Wang S, Tsarouhas V, Xylourgidis N, Sabri N, Tiklova K, Nautiyal N, et al. The tyrosine kinase Stitcher activates Grainy head and epidermal wound healing in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 2009;11(7):890-5. <https://doi.org/10.1038/ncb1898>.
544. Wang Y, Campbell JF, Gaugler R. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera, Scarabaeidae) Larvae. *J Invertebr Pathol*. 1995;66(2):178-84. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1081>.
545. Wang Y, Gaugler R. *Steinernema glaseri* surface coat protein suppresses the immune response of *Popillia japonica* (Coleoptera : Scarabaeidae) larvae. *Biol Control*. 1999;14(1):45-50. <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0672>.
546. Wang Y, Gaugler R, Cui LW. Variations in immune-response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* Species. *J Nematol*. 1994;26(1):11-8.
547. Wang Y, Jiang H. Reconstitution of a branch of the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation cascade in vitro: Snake-like hemolymph proteinase 21 (HP21) cleaved by HP14 activates prophenol oxidase-activating proteinase-2 precursor. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007;37(10):1015-25. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.013>.
548. Wang Y, Jiang HB. Interaction of  $\beta$ -1,3-glucan with its recognition protein activates hemolymph proteinase 14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system in *Manduca sexta*. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9271-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513797200>.
549. Wang Y, Jiang HB. A positive feedback mechanism in the *Manduca sexta* prophenoloxidase activation system. *Insect Biochem Mol Biol*. 2008;38(8):763-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.04.008>.
550. Wang Y, Jiang HB, Kanost MR. Biological activity of *Manduca sexta* paralytic and plasmatocyte spreading peptide and primary structure of its hemolymph precursor. *Insect Biochem Mol Biol*. 1999;29(12):1075-86. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00086-7).
551. Wang Y, Lu ZQ, Jiang HB. *Manduca sexta* prophenoloxidase activating proteinase-3 (PAP3) stimulates melanization by activating proPAP3, proSPHs, and proPOs. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;50:82-91. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.005>.

552. Waniek PJ, Costa JEP, Jansen AM, Costa J, Araujo CAC. Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Sequence characterization, expression pattern and zymography. *J Insect Physiol.* 2012;58(1):178-87. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.11.008>.
553. Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, et al. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science.* 2005;309(5742):1874-8. <https://doi.org/10.1126/science.1116887>.
554. 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. *Curr Biol.* 2016;26(15):1975-89. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.06.012>.
555. 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 Biol.* 2005;6(11):R94. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-11-r94>.
556. Whitten MMA, Tew IF, Lee BL, Ratcliffe NA. A novel role for an insect apolipoprotein (Apolipoprotein III) in  $\beta$ -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J Immunol.* 2004;172(4):2177-85. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2177>.
557. Wiegand C, Levin D, Gillespie JP, Willott E, Kanost MR, Trenczek T. Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2000;45(3):95-108. [https://doi.org/10.1002/1520-6327\(200011\)45:3](https://doi.org/10.1002/1520-6327(200011)45:3).
558. Wiklund ML, Steinert S, Junell A, Hultmark D, Stoven S. The N-terminal half of the *Drosophila* Rel/NF- $\kappa$ B factor Relish, REL-68, constitutively activates transcription of specific Relish target genes. *Dev Comp Immunol.* 2009;33(5):690-6. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.12.002>.
559. Williams MJ. The *Drosophila* cell adhesion molecule Neuroglian regulates Lissencephaly-1 localisation in circulating immunosurveillance cells. *BMC Immunol.* 2009;10. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-17>.
560. Williams MJ, Ando I, Hultmark D. *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes Cells.* 2005;10(8):813-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00883.x>.
561. Williams MJ, Wiklund ML, Wikman S, Hultmark D. Rac1 signalling in the *Drosophila* larval cellular immune response. *J Cell Sci.* 2006;119(10):2015-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.02920>.
562. Wollenberg AC, Jagdish T, Slough G, Hoinville ME, Wollenberg MS. Death becomes them: Bacterial community dynamics and stilbene antibiotic production in cadavers of *Galleria mellonella* killed by *Heterorhabditis* and *Photorhabdus* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(19):5824-37. <https://doi.org/10.1128/Aem.01211-16>.
563. Wood W, Faria C, Jacinto A. Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol.* 2006;173(3):405-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508161>.
564. Wu GQ, Yi YH. Haemocoel injection of PirA<sub>1</sub>B<sub>1</sub> to *Galleria mellonella* larvae leads to disruption of the haemocyte immune functions. *Sci Rep.* 2016;6:34996. <https://doi.org/10.1038/Srep34996>.
565. Wu S, Zhang XF, He YQ, Shuai JB, Chen XM, Ling EJ. Expression of antimicrobial peptide genes in *Bombyx mori* gut modulated by oral bacterial infection and development. *Dev Comp Immunol.* 2010;34(11):1191-8. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.013>.
566. Wu SY, Tong XL, Peng CX, Xiong G, Lu KP, Hu H, et al. Comparative analysis of the integument transcriptomes of the black dilute mutant and the wild-type silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep.* 2016;6:26114. <https://doi.org/10.1038/Srep26114>.
567. Wu YJ, Brock AR, Wang Y, Fujitani K, Ueda R, Gallo MJ. A blood-borne PDGF/VEGF-like ligand initiates wound-induced epidermal cell migration in *Drosophila* larvae. *Curr Biol.* 2009;19(17):1473-7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.019>.

568. Xia X, You M, Rao XJ, Yu XQ. Insect C-type lectins in innate immunity. *Dev Comp Immunol*. 2018;83:70-9. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.020>.
569. Xiao XP, Yang LJ, Pang XJ, Zhang RD, Zhu YB, Wang PH, et al. A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. *Nat Microbiol*. 2017;2(5):17020. <https://doi.org/10.1038/Nmicrobiol.2017.20>.
570. Xiong GH, Xing LS, Lin Z, Saha TT, Wang CS, Jiang HB, et al. High throughput profiling of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* immunotranscriptome during the fungal and bacterial infections. *BMC Genomics*. 2015;16:321. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-1509-1>.
571. Yadav S, Daugherty S, Shetty AC, Eleftherianos I. RNAseq analysis of the *Drosophila* response to the entomopathogenic nematode *Steinernema*. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(6):1955-67. <https://doi.org/10.1534/g3.117.041004>.
572. Yadav S, Eleftherianos I. Participation of the serine protease Jonah66Ci in the *Drosophila* antinematode immune response. *Infect Immun*. 2019;87(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.00094-19>.
573. Yadav S, Gupta S, Eleftherianos I. Differential regulation of immune signaling and survival response in *Drosophila melanogaster* larvae upon *Steinernema carpocapsae* nematode infection. *Insects*. 2018;9(1). <https://doi.org/10.3390/Insects9010017>.
574. Yakovlev AY, Nesin AP, Simonenko NP, Gordya NA, Tulin DV, Kruglikova AA, et al. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cell Dev Biol-An*. 2017;53(1):33-42. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0078-1>.
575. Yamamoto S, Seto ES. Dopamine dynamics and signaling in *Drosophila*: An overview of genes, drugs and behavioral paradigms. *Exp Anim*. 2014;63(2):107-19. <https://doi.org/10.1538/expanim.63.107>.
576. Yamashiro H, Siomi MC. PIWI-Interacting RNA in *Drosophila*: Biogenesis, transposon regulation, and beyond. *Chem Rev*. 2018;118(8):4404-21. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00393>.
577. Yang F, Wang Y, Sumathipala N, Cao XL, Kanost MR, Jiang HB. *Manduca sexta* serpin-12 controls the prophenoloxidase activation system in larval hemolymph. *Insect Biochem Mol Biol*. 2018;99:27-36. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.05.004>.
578. Yassine H, Kamareddine L, Osta MA. The mosquito melanization response is implicated in defense against the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Plos Pathog*. 2012;8(11):e1003029. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003029>.
579. Ye WM, Foye S, MacGuidwin AE, Steffan S. Incidence of *Oscheius onirici* (Nematoda: Rhabditidae), a potentially entomopathogenic nematode from the marshlands of Wisconsin, USA. *J Nematol*. 2018;50(1):9-26. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-004>.
580. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biot*. 2014;98(13):5807-22. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>.
581. Yi YH, Wu GQ, Lv JL, Li M. Eicosanoids mediate *Galleria mellonella* immune response to hemocoel injection of entomopathogenic nematode cuticles. *Parasitol Res*. 2016;115(2):597-608. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4776-5>.
582. Yoon JS, Gurusamy D, Palli SR. Accumulation of dsRNA in endosomes contributes to inefficient RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017;90:53-60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.09.011>.
583. Yu XQ, Jiang HB, Wang Y, Kanost MR. Nonproteolytic serine proteinase homologs are involved in prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33(2):197-208. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00191-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00191-1).
584. Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a lipopolysaccharide specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37373-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003021200>.

585. Yu XQ, Kanost MR. *Manduca sexta* lipopolysaccharide-specific immunelectin-2 protects larvae from bacterial infection. *Dev Comp Immunol.* 2003;27(3):189-96. [https://doi.org/10.1016/S0145-305x\(02\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305x(02)00099-X).
586. Yu XQ, Kanost MR. Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol.* 2004;28(9):891-900. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.02.005>.
587. Yu XQ, Ma YK. Calcium is not required for Immulectin-2 binding, but protects the protein from proteinase digestion. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36(6):505-16. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.03.010>.
588. Zanet J, Stramer B, Millard T, Martin P, Payre F, Plaza S. Fascin is required for blood cell migration during *Drosophila* embryogenesis. *Development.* 2009;136(15):2557-65. <https://doi.org/10.1242/dev.036517>.
589. Zdybicka-Barabas A, Mak P, Klys A, Skrzypiec K, Mendyk E, Fiolka MJ, et al. Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(11):2623-2635. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.06.008>.
590. Zettervall CJ, Anderl I, Williams MJ, Palmer R, Kurucz E, Ando I, et al. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(39):14192-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403789101>.
591. Zhang CX, Liu JR, Xu MX, Sun H, Yang SY, An XH, et al. *Heterorhabditoides chongmingensis* gen. nov., sp nov (Rhabditida : Rhabditidae), a novel member of the entomopathogenic nematodes. *J Invertebr Pathol.* 2008;98(2):153-68. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.011>.
592. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Curr Biol.* 2016;26(1):R14-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.
593. Zhang W, Chen JH, Keyhani NO, Zhang ZY, Li S, Xia YX. Comparative transcriptomic analysis of immune responses of the migratory locust, *Locusta migratoria*, to challenge by the fungal insect pathogen, *Metarhizium acridum*. *BMC Genomics.* 2015;16:867. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-2089-9>.
594. Zhang X, Hu XF, Li YS, Ding XZ, Yang Q, Sun YJ, et al. XaxAB-like binary toxin from *Photorhabdus luminescens* exhibits both insecticidal activity and cytotoxicity. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;350(1):48-56. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12321>.
595. Zhao XL, Ferdig MT, Li JY, Christensen BM. Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the Mosquito, *Armigeres subalbatus*. *Dev Comp Immunol.* 1995;19(3):205-15. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(95\)00005-E](https://doi.org/10.1016/0145-305x(95)00005-E).
596. Zhou GX, Yang H, Wang F, Bao HR, Wang GX, Hou XL, et al. *Oscheius microvilli* n. sp (Nematoda: Rhabditidae): A facultatively pathogenic nematode from Chongming Island, China. *J Nematol.* 2017;49(1):33-41. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-044>.
597. Zhou X, Kaya HK, Heungens K, Goodrich-Blair H. Response of ants to a deterrent factor(s) produced by the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(12):6202-9. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.6202-6209.2002>.
598. Zhuang S, Kelo L, Nardi JB, Kanost MR. Multiple  $\alpha$  subunits of integrin are involved in cell-mediated responses of the *Manduca* immune system. *Dev Comp Immunol.* 2008;32(4):365-79. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.07.007>.
599. Zhuang SF, Kelo L, Nardi JB, Kanost MR. Neuroglial on hemocyte surfaces is involved in homophilic and heterophilic interactions of the innate immune system of *Manduca sexta*. *Dev Comp Immunol.* 2007;31(11):1159-67. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.03.002>.
600. Zhuang SF, Kelo LS, Nardi JB, Kanost MR. An integrin-tetraspanin interaction required for cellular innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22563-72. <https://doi.org/10.1074/Jbc.M700341200>.
601. Ziegenfuss JS, Biswas R, Avery MA, Hong K, Sheehan AE, Yeung YG, et al. Draper-dependent glial phagocytic activity is mediated by Src and Syk family kinase signalling. *Nature.* 2008;453(7197):935-U68. <https://doi.org/10.1038/nature06901>.

602. Zou Z, Shin SW, Alvarez KS, Kokoza V, Raikhell AS. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*. 2010;32(1):41-53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.011>.
603. Zsomboki J, Csordas G, Honti V, Pinter L, Bajusz I, Galgoczy L, et al. *Drosophila* Nimrod proteins bind bacteria. *Cent Eur J Biol*. 2013;8(7):633-45. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0183-4>.

## **ABREVIATIONS**

**Adgf-A** : Adenosine deaminase growth factor A

**ATF2** : Activating transcription factor 2

**BMPs** : Bone Morphogenetic Proteins

**Cif** : Cycle inhibiting factor

**Clasp** : CLIP-associating protein

**CLECT** : C-type lectine

**CNBs** : Complexes nématobactériens

**CRD** : Carbohydrate recognition domain

**CSab** : Cystein-Stabilized ab

**cSPs** : CLIP domain serine proteases

**cSPHs** : CLIP domain serine protease homolog

**DAP** : Diaminopimelic acid

**DCE** : Dopachrome conversion enzyme

**dSRC1** : *Drosophila* scavenger receptor C1

**DDC** : Dopa decarboxylase

**DIF** : Dorsal-related immunity factor

**Dpp** : Decapentaplegic

**Dscam** : Down syndrome cell adhesion molecule

**DUOX** : Dual oxidase

**EGF** : Epidermal growth factor

**EGFR** : Epidermal growth factor receptor

**ENF** : Glutamate-asparagine-phenylalanine

**ERK** : Extracellular-signal-regulated kinase

**FADD** : Fas-associated death domain

**FGF** : Fibroblast growth factor

**GBHs** : Genes with bacterial homology

**GBP** : Growth Blocking Peptide

**GCM** : Glial cells missing

**GNBP** : Gram negative binding protein

**GPCR** : G protein-coupled receptor



**βGRP** : β-1,3-Glucan recognition protein  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**HCP** : Hemocyte chemotactic peptide  
**HOCl** : Hypochlorous acid  
**HP** : Hemolymph protease  
**HSP** : Heat shock protein  
**Iap2** : Inhibitor of apoptosis 2  
**IM18** : Induced molecule 18  
**Imd** : Immune deficiency  
**IML** : Immulectin  
**IMPIs** : Insect metalloproteinase inhibitors  
**IDGF3** : Imaginal disc growth factor 3  
**Ird1** : Immune response deficient 1  
**Ird5** : Immune response deficient 5  
**ISCs** : Intestinal stem cells  
**Jak-Stat** : Janus kinase-Signal transducers and activators of transcription  
**JNKs** : c-Jun N-terminal kinases  
**LAMP1** : Lysosome-associated glycoprotein 1  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LYS** : Lysine  
**MAPKs** : Mitogen-activated protein kinases  
**MIR** : Mosquitoe insulin receptor  
**ModSP** : Modular serine protease  
**MYD88** : Myeloid differentiation primary response 88  
**NimB** : Nimrod type B  
**NimC** : Nimrod type C  
**NO** : Nitric oxide  
**NOS** : Nitric oxide synthase  
**NOX** : NADPH oxydase  
**PAH** : Phenylalanine hydroxylase  
**PAMs** : Peptides antimicrobiens

**PAP** : Prophenoloxidase-activating protease  
**PGRP** : Peptidoglycan recognition protein  
**PLA2** : Phospholipase A2  
**PO** : Phenoloxidase  
**PP** : Parasitic Peptide  
**Pr-CTL** : *Pieris rapae* c-type lectin  
**proPO-AE** : Prophenoloxidase activating enzyme  
**PSP-1** : Plasmacyte spreading peptide 1  
**Pvf** : PDGF/VEGF factor  
**Pvr** : PDGF/VEGF Receptor  
**ScP** : Surface coat protein  
**Sc-SP** : *Steinernema carpocapsae* serine protease  
**SPE** : Spätzle Processing Enzyme  
**TAB2** : TAK1-associated binding protein 2  
**TAK1** : TGF $\beta$ -activated kinase 1  
**TEP** : Thioester-containing protein  
**TGF- $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$   
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**TOR** : Target of rapamycin  
**Trol** : Terribly reduced optic lobe  
**TRPA1** : Transient Receptor Potential A1 channel  
**UNKs** : Unknowns  
**Upd3** : Unpaired 3  
**Wnt** : Wingless integration site  
**XhIA** : *Xenorhabdus* haemolysin A

## LISTE TABLEAUX ET FIGURES

**Figure 1 :** Principaux constituants du caillot chez *Drosophila melanogaster*.

**Figure 2 :** Voies d'induction de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'intestin moyen de *Drosophila melanogaster*.

**Figure 3 :** Voies signalétiques induisant la régénération de l'épithélium de l'intestin moyen en réponse à un danger chez *Drosophila melanogaster*.

**Figure 4:** Principaux stimuli, voies signalétiques et facteurs de transcription participant à l'activation de l'hématopoïèse chez l'embryon et la larve de *Drosophila melanogaster*.

**Figure 5 :** Principales réactions du processus de mélanisation chez les insectes.

**Figure 6 :** Système de la prophénoloxydase de *Manduca sexta*.

**Figure 7 :** Processus de phagocytose chez *Drosophila melanogaster*.

**Figure 8 :** Voie Imd canonique dans le corps gras de *Drosophila melanogaster*.

**Figure 9 :** Voie Toll canonique dans le corps gras de *Drosophila melanogaster*.

**Figure 10 :** Voie des siRNAs exogènes de *Drosophila melanogaster*.

**Figure 11 :** Positions des genres *Steinernema*, *Heterorhabditis* et *Oscheius* dans la phylogénie des nématodes.

**Figure 12 :** Cophylogénies des partenaires nématodes et bactériens des complexes nématobactériens entomopathogènes.

**Figure 13 :** Représentation schématique du cycle de vie des complexes nématobactériens entomopathogènes.

**Figure 14 :** Stratégies d'échappement immunitaires identifiées chez les complexes nématobactériens entomopathogènes.

**Figure 15 :** Contrôles de la taille et de l'intégrité de l'insert et du vecteur au cours du clonage et après transformation de la bactérie productrice.

**Figure 16 :** Validation de la séquence de l'insert après transformation de la bactérie productrice.

**Figure 17 :** Contrôle de la production de la protéine UNK4 et estimation de sa pureté après passage sur résine Ni-NTA.

**Figure 18 :** Structures et environnements génomiques des gènes *UNKs* et *GBHs* chez *Spodoptera frugiperda*.

**Figure 19 :** Alignements des séquences protéiques correspondant aux *UNKs* et aux *GBHs*.

**Tableau 1:** Recherche de domaines fonctionnels et de sites de maturation au sein des protéines *UNKs* et *GBHs* prédites.

**Tableau 2:** Recherche de caractéristiques biochimiques de peptides antimicrobiens au sein d'UNK1 et d'UNK 3.

**Figure 20 :** Prédiction de structures secondaires des peptides UNK1 et UNK3.

**Figure 21 :** Test de l'activité antibactérienne du peptide UNK1 vis-à-vis des bactéries à Gram négative.

**Tableau 3 :** Diamètres des halos d'inhibition de croissance observés après dépôt du peptide UNK1 sur tapis bactérien.

**Figure 22 :** Test de l'activité antibactérienne de la protéine UNK4 vis-à-vis des bactéries à Gram négative.

**Tableau 4 :** Diamètres des halos d'inhibition de croissance observés après dépôt de la protéine UNK4 sur tapis bactérien.