



HAL
open science

Franchissement de la barrière intestinale du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* par le Densovirus JcDV

Laetitia Pigeyre

► **To cite this version:**

Laetitia Pigeyre. Franchissement de la barrière intestinale du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* par le Densovirus JcDV. Virologie. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLEP005 . tel-04375907

HAL Id: tel-04375907

<https://theses.hal.science/tel-04375907>

Submitted on 6 Jan 2024

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres

PSL Research University

Préparée à l'École Pratique des Hautes Études

Franchissement de la barrière intestinale du lépidoptère

Spodoptera frugiperda par le Densovirus JcDV

École doctorale de l'EPHE – ED 472

Spécialité : SIEB

Soutenue par :

Laetitia PIGEYRE

Le 13 février 2019

Dirigée par :

Pr. Thierry Dupressoir

Dr. Anne-Sophie Gosselin-Grenet

COMPOSITION DU JURY :

Dr. Véronique BRAULT
INRA/UMR SVQV
Rapportrice

Dr. Yannick SIMONIN
INSERM/UMR1058
Rapporteur

Pr. Sophie THENET
INSERM/UMR S 1138/EPHE-PSL
Examinatrice

Dr. Yann GUERARDEL
UGSF/UMR 8567
Examineur

Pr. Thierry DUPRESSOIR
UMR1333/EPHE-PSL
Directeur de thèse

Dr. Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET
UMR1333/UM
Co-directrice de thèse



École Pratique
des Hautes Études



« Quoi que tu rêves d'entreprendre, commence-le.

L'audace a du génie, du pouvoir, de la magie. »

Johann Wolfgang von Goethe, Poète, 1749-1832

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Véronique BRAULT et Yannick SIMONIN d'avoir accepté d'être membres rapporteurs de mon jury de thèse, ainsi que Sophie THENET et Yann GUERARDEL d'être membres examinateurs de mon jury de thèse. Merci à vous d'avoir été patients et de bien vouloir lire mon manuscrit.

Je voudrais remercier aussi les membres de mon comité de suivi de thèse, Sophie THENET, Anne IMBERTY et Baptiste MONSION pour l'aide apportée à chaque comité et durant mes trois années de thèse. Merci à Anne IMBERTY de m'avoir accueillie et permis d'apprendre une nouvelle technique au sein de son laboratoire.

Je remercie également mon école doctorale EPHE-PSL de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions, mais également aux structures qui m'ont hébergées durant ces trois années de thèse, à savoir l'INRA, le département SPE et l'Université de Montpellier.

Je remercie mon équipe d'accueil de manière générale. Merci à toi Mylène OGLIASTRO de m'avoir accueillie dans ton équipe, conseillée et soutenue durant ces trois années. Je souhaite exprimer un énorme remerciement à mes directeurs de thèse Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET et Thierry DUPRESSOIR !! Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci à toi Anne-So pour ta gentillesse, ta patience, ton dévouement à la science, ta générosité et j'en passe, tu as toutes les qualités d'une excellente directrice de thèse, n'en doute pas. Je te souhaite d'avoir plein de thésard à l'avenir, car je sais que tu vas être au top, vu que tu l'es déjà ! Merci à toi Thierry d'avoir, presque, fini ta carrière avec moi (j'en suis flattée) de m'avoir transmis ton savoir, merci de ta présence malgré tes allers-retours à Paris, tu as toujours été là toi aussi.

Un grand merci à Marc RAVALLEC avec lequel j'ai énormément appris. Tes petites astuces, tes protocoles, ton savoir-faire et bien sûr ton humour aussi ! Continue d'être comme ça, si tu es sage je te ferai faire un tour en moto. Merci à Cécile CLOUET de m'avoir aidée durant ma thèse. Je ne sais pas combien de frug nous avons utilisé, mais un grand nombre ! Merci à Marie FRAYSSINET pour la phototèque du labo et plus particulièrement les photos que tu as faites pour moi (mais qui servent aussi au labo). Merci à Gaëtan CLABOT et Clothilde GIBARD pour votre aide, merci pour le partage de vos connaissances sur les insectes présents à l'insectarium, en particulier les frug. Grâce à vous je sais les reconnaître à tous les stades ! Merci aux équipes de l'unité DGIMI (BIBINE, B2iHP et EHA) pour leur aide lorsque j'en avais besoin, c'est toujours enrichissant d'avoir divers points de vue. Merci à notre directrice d'Unité Nathalie VOLKOFF pour sa gestion et son implication dans l'unité ainsi que sa gentillesse.

Je tiens à remercier Audrey CARO et Marie-Hélène BOYER qui sont d'excellentes formatrices pour les TPs donnés aux étudiants durant l'année de monitorat que j'ai effectuée en dernière année de thèse.

Un grand merci à mes amies du labo Aurélie PERRIN, Véronique JOUAN et Wendy LEVRAT ! Heureusement que tu étais là Aurélie quand Zotero a fait des siennes... mais aussi pour nos discussions sur tout et rien. Véro, merci pour les pauses « clopes » et pour tout ton soutien durant cette thèse, et d'un point de vue personnel aussi ! Merci à la grosse d'avoir été là que ce soit au labo ou en dehors, le labo était plus vivant grâce à toi, ce n'est pas l'équipe BIBINE qui dira le contraire ! En tout cas, dans ce labo j'ai fait de belles rencontres aussi bien scientifiquement qu'humainement. Je ne l'oublierai pas.

Ah et je ne vous oublie pas le TERRIER ! Merci à ces membres : Amaury PAYELLEVILLE, nous sommes les pionniers de ce bureau (moi je n'ai pas fait de faute à ton nom, ok j'ai vérifié hihi), à Ange LORENZI le « corse » ou tchoupi ah ah ah, à Sarah FRANCOIS, je me suis régaler que tu te joignes à nous dans ce bureau, ça aurait été dommage de ne pas t'avoir, que ce soit au niveau scientifique ou rigolade et la petite nouvelle Louise HUOT qui a bien fait de venir avec nous aussi, je pense, surtout lorsqu'elle épelle *Spodoptera frugiperda* ah ah. Je n'oublie pas mes camarades de passage comme mon « frère » Djibril ABOUBAKAR-SOUNA et Rania JABEUR. D'avoir un bureau de doctorants c'est top car on pouvait interagir sur nos différentes thématiques, se donner des conseils, décompresser entre nous. J'ai passé trois années avec certains et moins avec d'autres, vraiment agréables. Merci à Adeline KERVIEL, dommage que tu ne sois pas venue parmi nous, malgré tout tu es une superbe scientifique et une bonne personne ! Je te souhaite de trouver la sérénité au boulot...

Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans mon fidèle ami Pierre-André (Pere Andreo) LAFON-MOUTON (c'est la première fois que je marque tout en entier je crois lol). Ah « radio PA » me suit depuis, quoi, la L3 ! Quelle aventure ! Nous nous sommes bien suivis durant tout ce temps. Tu imagines, ça fait quoi 8 ans qu'on se connaît et que tu me supportes ! Enfin j'ai supporté ton stress intense aussi ;) Merci pour toute ton aide, ta présence, les rigolades en amphithéâtre, nous avons surmonté les galères ensemble du coup on s'est senti moins seuls tout de même et un grand merci durant la thèse ! C'était cool de t'avoir à mes côtés, vraiment.

Je remercie mes amis les plus fidèles qui m'ont soutenue également durant cette thèse, Laëtitia LACOURT, il y a fort longtemps qu'on se connaît aussi, tu as été d'une très grande aide durant la thèse (c'est peu de le dire !), Élisabeth VAS qui m'a aussi suivi comme « radio PA », nous faisons de belles rencontres sur les bancs de la fac, mes amis rencontrés au Mcdo, qui l'eut cru, Audrey et Marvin, oui je vous cite car vous m'avez beaucoup soutenue aussi ; merci à mes amis d'enfance, Mélody, Mélanie, Émilie et Manon, ça y est je touche le bon bout j'espère.

Et bien sûr un grand merci à ma famille, ma Maman, Katia, Seb et Marine, qui est présente depuis toujours (ou depuis votre naissance ;)) ! Vous avez toujours cru en moi, j'espère que vous serez fières...

J'espère n'avoir oublié personne, si c'est le cas je m'en excuse, c'est toujours compliqué les remerciements... Du coup un gros merci à tout le monde d'avoir été là !

Je vous souhaite une bonne lecture.

Table des matières

Table des matières

Remerciements.....	4
Table des matières.....	8
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	12
Préambule	16
Introduction	32
I. Les virus entomopathogènes.....	32
1. Généralités.....	32
II. Modèle d'étude des interactions virus-hôte chez l'insecte	42
1. Les densovirus.....	42
2. La légionnaire d'automne : <i>Spodoptera frugiperda</i>	54
Objectif de mes travaux de thèse	82
Matériels & Méthodes.....	84
I. Organismes et virus utilisés	84
1. Élevage des insectes.....	84
2. Production de densovirus JcDV.....	84
II. Tests de compétition et imagerie.....	86
1. Tests de compétition.....	86
2. Microscopie électronique à balayage	92
III. Identification des protéines de la matrice péritrophique et de l'intestin moyen de <i>S. frugiperda</i> et interaction avec JcDV.....	92
1. Extraction des protéines de la matrice péritrophiques.....	92
2. Préparation de vésicules membranaires de bordures en brosse (VMBB).....	92
3. Isolement des radeaux lipidiques à partir des VMBB par gradient de flottaison	94
4. SDS-PAGE, coloration PAS, Western blot et Far western.....	94
5. Identification des protéines de la matrice péritrophique, des VMBBs et des radeaux lipidiques par LC-MS/MS.....	96
IV. Analyse de la réponse transcriptomique de l'intestin moyen de <i>S. frugiperda</i> à l'infection orale par JcDV.....	98
1. Extraction des ARN totaux de l'intestin moyen.....	98
2. Construction et séquençage des banques DGE.....	98
3. Annotation fonctionnelle des tags	100
V. Analyse biochimique et <i>in silico</i> de la glycosylation des protéines structurales de JcDV.....	10

1. SDS-PAGE, coloration PAGE-blue, PAS	100
2. N-Glycosylation	102
3. O-Glycosylation.....	102
Résultats et discussion.....	104
I. La première barrière que JcDV doit franchir : la matrice péritrophique.....	104
1. La matrice péritrophique est une barrière contre l'infection par JcDV	104
2. L'interaction de JcDV avec les glycannes de la matrice péritrophique est impliquée dans la pathogenèse virale	106
3. JcDV interagit avec plusieurs péritrophines de la matrice péritrophique de <i>S. frugiperda</i>	112
4. L'interaction de JcDV avec la matrice péritrophique modifie son ultrastructure.....	116
5. L'infection par JcDV induit l'arrêt de la synthèse et/ou du trafic du GlcNAc.....	128
6. L'infection par JcDV induit des modifications de l'expression des gènes dans l'intestin	128
II. JcDV interagit avec la seconde barrière de l'intestin moyen : l'épithélium intestinal..	134
1. JcDV interagit avec les bordures en brosse de l'épithélium intestinal	134
Discussion générale et Perspectives.....	144
Références bibliographiques	160
Annexe 1	188

Liste des figures

Figure 1 : Population mondiale depuis 1950 et prévisions jusqu'en 2030. D'après le site Statista.....	17
Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes d'entrée des virus entomopathogènes dans l'intestin moyen de l'insecte.....	35
Figure 3 : Arbre phylogénétique des <i>Parvoviridae</i> , en particulier des <i>Ambidensovirus</i> (2018).....	49
Figure 4 Structure et Organisation génomique des <i>Densovirinae</i> (Gosselin <i>et al.</i> , 2015 ; Cotmore, 2014 ; ICTV).....	51
Figure 5 : Cycle de vie et phénotype de <i>S. frugiperda</i>	53
Figure 6 : Prédiction et actuelle répartition du ravageur de culture <i>S. frugiperda</i>	Erreur ! Signet non défini.54
Figure 7 : La barrière intestinale de l'insecte lépidoptère.....	57
Figure 8 : Modèle d'architecture moléculaire de la MP de type I chez l'insecte.....	59
Figure 9 : Rôles de la glycosylation dans les processus cellulaires et physiologiques.....	65
Figure 10 : Diversité des N-glycannes (A) et des O-glycannes (B, C) chez les insectes.....	65
Figure 11 : Les glycannes en tant que récepteurs de virus.....	73
Figure 12 : Le calcoflur augmente la sensibilité de <i>S. frugiperda</i> à l'infection orale par JcDV.....	103
Figure 13 : Hémagglutination des érythrocytes par JcDV.....	105
Figure 14 : JcDV interagit avec des glycannes de la MP <i>ex vivo</i>	107
Figure 15 : Les glycannes sont impliqués uniquement dans l'infection orale par JcDV.....	109
Figure 16 : Analyse protéomique des protéines de la MP interagissant avec JcDV.....	113
Figure 17 : L'utilisation de mucines hétérologues en compétition n'inhibe pas la virulence de JcDV.....	113
Figure 18 : Analyse d'interaction du virus mutant 8m avec les péritrophines de la MP.....	115
Figure 19 : JcDV induit une destructuration de la MP 30 min p.i (pH7), <i>ex vivo</i>	117
Figure 20 : JcDV induit une destructuration de la MP 2h pH7 p.i, <i>ex vivo</i>	119
Figure 21 : Les protéines de capsid de JcDV semblent glycosylées en coloration PAS.....	119
Figure 22 : Des sites potentiels de N-glycosylation pourraient être présents sur les protéines structurales des Lepidopteran Ambidensovirus 1.....	121
Figure 23 : Des sites potentiels de O-glycosylation pourraient être présents sur les protéines structurales (VP1) des Lepidopteran Ambidensovirus 1.....	123
Figure 24 : JcDV induit une destructuration de la MP à 30 min et 2h pH9 post-infection, <i>ex vivo</i>	125
Figure 25 : Le pH n'influence pas la destructuration du virus avec la matrice péritrophique <i>ex vivo</i>	125
Figure 26 : L'hôte influe sur la spécificité de l'interaction du virus avec la MP.....	127
Figure 27 : Désorganisation de la MP et inhibition de la synthèse de GlcNAc après infection par JcDv <i>per os</i>	127
Figure 28 : Expression des gènes à 24 h et 72 h p.i.....	133
Figure 29 : Association de JcDV, mais pas du mutant 8M, avec les radeaux lipidiques de l'intestin moyen de <i>S. frugiperda</i>	135
Figure 30 : Identifications des protéines de l'épithélium intestinal interagissant avec le virus JcDV WT et le mutant 8m.....	139
Figure 31 : Identification des protéines communes entre la MP et les RL.....	Erreur ! Signet non défini.140
Figure 32 : Schéma récapitulatif des mécanismes permettant au densovirus JcDV de franchir la barrière intestinale de <i>S. frugiperda</i>	153

Liste des tableaux

Tableau I : Bactéries (en violet) et champignons (en vert) entomopathogènes utilisés ou développés pour le contrôle des ravageurs de culture (adapté de Lacey <i>et al.</i> , 2015).....	29
Tableau II : Taxonomie des virus entomopathogènes à ADN (ICTV, 2018).....	33
Tableau III : Taxonomie des virus entomopathogènes à ARN (ICTV, 2018).....	37
Tableau IV : Taxonomie de la famille des <i>Parvovirinae</i> (Cotmore <i>et al.</i> , 2014 ; ICTV 2018).....	39
Tableau V : Taxonomie de la famille des <i>Densovirinae</i> entomopathogènes (Cotmore <i>et al.</i> , 2014 ; Tjissen <i>et al.</i> , 2016 ; François <i>et al.</i> , in prep ; ICTV 2018).....	45

Abréviations :

ACM : agent de contrôle microbien	MβCD : méthyl- β -cyclodextrine
ADN : acide désoxyribonucléique	MEB : microscopie électronique à balayage
ALP : alkalines phosphatases	MET : microscopie électronique à transmission
Ancre-GPI : ancre glycosylphosphatidylinositol	MIDV : <i>Mythimna loreyi</i> densovirus
APN : aminopeptidases de type N	MNPV : <i>multiple nucleopolyhedrovirus</i>
ARN : acide ribonucléique	Mock : non-infecté, ni-traité
ARNi : ARN interférence	MP : matrice péritrophique
Asn : asparagine	MTase : méthyltransférase
AAV : virus associés aux adénovirus	MRD : membranes résistantes aux détergents
Bt : <i>Bacillus thuringiensis</i>	NPV : <i>Nucleopolyhedrovirus</i>
B. mori : <i>Bombyx mori</i>	NS : non-structural
BmDV : <i>Bombyx mori</i> densovirus	NLS : <i>nuclear localization sequence</i> ou signaux de localisation nucléaire
CBD : <i>chitin binding domain</i> ou domaine liaison à la chitine	OB : <i>Occlusion bodies</i>
CMI : concentration minimale d'inhibition	ODV : <i>Occlusion-derived viruses</i>
CS : chitine synthase	OG : ontologie génique
Db : double brin	OGT : O-GlcNAc transférase
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane	ORF : <i>open reading frame</i> ou cadres de lectures ouverts
DGE : <i>digital gene expression</i> ou expression génique digitale	<i>O. leucostigma</i> : <i>Orgyia leucostigma</i>
DpCV : <i>Dendrolimus punctatus</i> cypovirus	<i>O. pseudotsugata</i> : <i>Orgyia pseudotsugata</i>
Ecto-PM : ecto-péritrophique	PAMP : <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
Endo-PM : endo-péritrophique	PAS : <i>periodic acid Schiff</i> ou acide périodique de Schiff
EEV : virus à enveloppe externe	PGM : plante génétiquement modifiée
EFSA : autorité européenne de sécurité des aliments	PM : poids moléculaire
FAO : <i>food and agriculture organization of the United Nations</i>	PRR : <i>pattern-recognition receptors</i>
Fuc : Fucose	PLA₂ : phospholipase de type A ₂
GAG : glycosaminoglycanes	RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
Gal : Galactose	REG : réticulum endoplasmique granuleux
GalNac : β -1,4-N-acétyl-D-galactosamine	Sb : simple brin
Glc : Glucose	Ser : Sérine
GlcNac : β -1,4-N-acétyl-D-glucosamine	<i>S. frugiperda</i> : <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf)
GmDV : <i>Galleria mellonella</i> densovirus	<i>S. littoralis</i> : <i>Spodoptera littoralis</i> (Sl)
GV : <i>granulovirus</i>	SNPV : <i>single nucleopolyhedrovirus</i>
HRP : <i>Horseradish peroxidase</i>	Thr : Thréonine
ICTV : comité international sur la taxonomie des virus	VLP : <i>virus-Like Particules</i>
IMV : virus intracellulaire mature	VMBB : vésicules membranaires de bordures en brosse
ITR : <i>inverted terminal repeats</i> ou répétitions terminales inversées	VOPBA : Far Western blot ou Virus Overlay Protein Binding Assay
JeDV : <i>Junonia coenia</i> densovirus	VP : <i>viral protein</i> ou protéine de capsid
	WGA : wheat germ agglutinin
	WT : virus sauvage

Préambule

De tout temps, l'Homme a dû recourir à des moyens de lutte contre des ravageurs afin de préserver ses productions agricoles. Il y a près de 1000 ans avant J.C, Homère utilisait le soufre comme fongicide, sans se douter qu'il utilisait un pesticide toujours utilisé et vendu en grande surface comme « anti-maladie des taches noires » (Walker, 2013)¹. Dès le XIXème siècle, le développement de l'industrie chimique avec des compagnies comme « Le géant allemand BASF », Bayer et plus tard, Monsanto², s'accompagne d'une augmentation de l'effort de recherche sur la chimie organique et de synthèse.

Le terme pesticide prend désormais tout son sens. Étymologiquement, le préfixe pest- désigne en anglais le ravageur et le suffixe -cide provient du latin *caedere* qui signifie « tuer ». En 1874, Zeidler synthétise le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), dont Paul Hermann Müller, chimiste suisse, établit en 1939 les propriétés insecticides et acaricides (ce qui lui vaudra le prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1948). Le DDT fut commercialisé dès 1943, mais fut interdit dans les années 1970 dans l'Union Européenne (UE) car il présenterait, entre autres, des effets délétères sur la santé humaine (Harada *et al.*, 2016 ; Ecophyto 2018 in France, European directives 2009/128/CE). Un pesticide qui fait actuellement débat est le glyphosate. Initialement breveté comme chélateur par Fon et Uhing, pour Stauffer Chemical (Office des brevets des États-Unis, 8 décembre 1964, n° 3160632A), un grand nombre de publications lui attribuent aujourd'hui un certain nombre d'impacts négatifs sur la santé humaine (Shrestha *et al.*, 2018) et de manière générale sur l'environnement (impact sur les animaux, vertébrés et invertébrés) (Mesnage and Séralini, 2018). L'institution spécialisée dans l'alimentation et l'agriculture faisant partie de l'ONU, la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), a donné en 1990 la définition suivante de pesticide : « *toute substance ou association de substances qui est destinée à repousser, détruire ou combattre les ravageurs, y compris les vecteurs de maladies humaines ou animales, et les espèces indésirables de plantes ou d'animaux causant des dommages ou se montrant autrement nuisibles durant la production, la transformation, le stockage, le transport ou la commercialisation des denrées alimentaires, des produits agricoles, du bois et des produits ligneux, ou des aliments pour animaux, ou qui peut être administrée aux animaux pour combattre les insectes, les arachnides et les autres endo- ou ecto-parasites* ». Il existe 3 types de

¹ Walker AS. Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise. 2013

² NB : Notez bien que depuis juin 2018, Bayer a racheté Monsanto puis depuis août 2018 BASF a finalisé l'achat de l'agro-chimie chez son concurrent. Bayer . <https://www.actu-environnement.com/ae/news/basf-acquisition-bayer-rachat-monsanto-31833.php4>

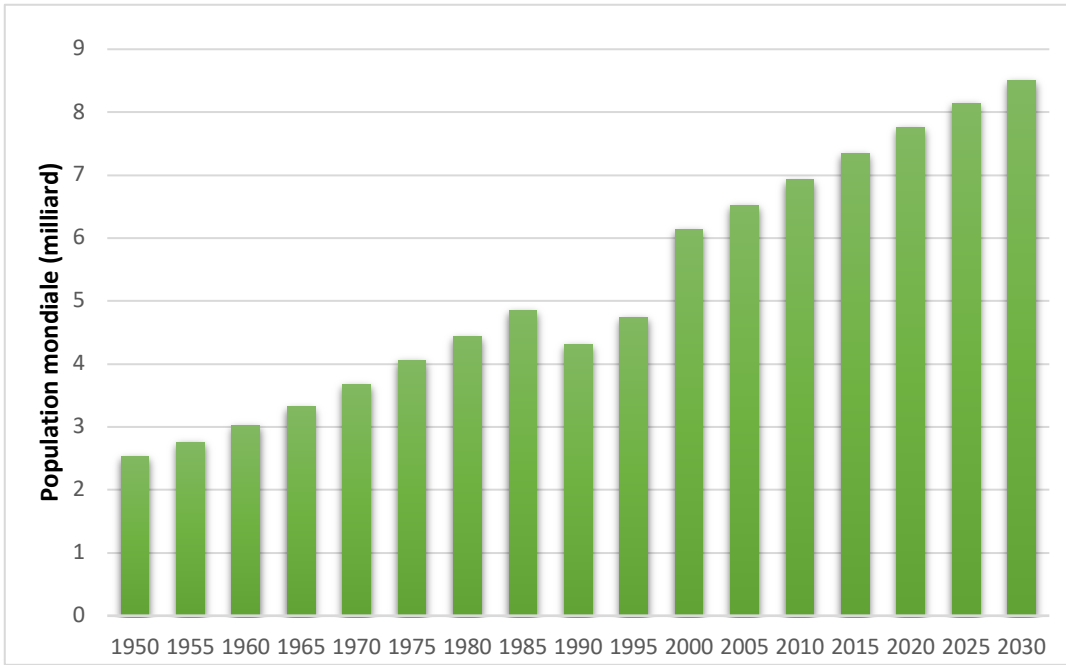


Figure 1 : Population mondiale depuis 1950 et prévisions jusqu'en 2030. D'après le site Statista.

pesticides : les herbicides, les fongicides et les insecticides qui sont encadrés par la directive européenne 91/414/CEE.

Sur Terre, nous comptons plus d'1 million d'espèces d'insectes connues et caractérisées, les insectes représentent plus de 50% des organismes connus et ce n'est que la partie émergée de l'iceberg ((Footitt and Adler, 2009; Stork *et al.*, 2015). Les insectes assurent un rôle écologique important (par exemple la pollinisation, la dépollution des sols, la régulation des populations d'autres espèces, etc.). Cependant certaines espèces sont considérées comme des nuisibles que ce soit au niveau écologique, économique ou en santé animale et humaine. Parmi ces nuisibles, les insectes phytophages détruiraient 1/5^{ème} de la production annuelle mondiale selon la FAO, ce qui est très important d'un point de vue économique (Aukema *et al.*, 2011). D'après l'ONU, la population mondiale actuelle est de 7,2 milliards d'individus, atteindrait 8,1 milliards en 2025 et devrait encore augmenter de manière exponentielle (**Figure 1**) (<https://news.un.org/fr>).

L'utilisation d'insecticide chimique était donc nécessaire pour réguler ces populations au moment de la « révolution verte » productiviste d'après-guerre. Mais, aucune étude à long terme n'avait été menée sur ces pesticides et de ce fait, aucun impact sur l'écologie ni la santé animale ou humaine n'avait été répertorié. Désormais, le nombre d'études sur l'effet des pesticides, sur la santé humaine par exemple, s'accroît de jour en jour. Par ailleurs, l'usage répétitif des agents phytosanitaires de synthèse a créé une résistance de certains ravageurs à ces insecticides. D'autres stratégies sont possibles afin de limiter la prolifération et les dégâts occasionnés par ces ravageurs. Le père fondateur de l'une de ces stratégies alternatives est Charles Valentine Riley qui a utilisé la coccinelle *Novius cardinalis* comme prédateur contre le ravageur *Icerya purchasi* (cochenille australienne) introduit fortuitement en 1868 en Californie. Ce sont les prémices de l'entomologie appliquée et en l'espèce, de la lutte biologique ! Après cette réussite, d'autres utilisations d'insectes pour réguler le contrôle d'autres espèces d'insectes ont été mises en place. Une organisation fondée en 1955, l'organisation internationale de lutte biologique (OILB) (Franz, 1988), travaille en étroite collaboration avec diverses organisations internationales telles que la commission européenne, sur l'utilisation des pesticides et le statut de la lutte intégrée en Europe³, sur le règlement CE des agents de lutte biologique à l'égard des agents invertébrés de lutte biologique (REBECA)⁴, au sein du groupe consultatif pour la recherche agricole internationale sur la protection intégrée des cultures (CGIAR)⁵, au sein de l'organisation européenne de protection des végétaux (OEPP) sur les agents de lutte biologique⁶ et enfin, à la FAO par rapport à la convention sur la diversité

³ Agra CEAS Consulting, « Integrated crop management systems in the EU », Commission européenne direction Générale de l'environnement, mai 2002

⁴ "Regulation of invertebrate biological control agents in Europe: review and recommendations in its pursuit of a harmonized regulatory system", Regulation of biological control agents (REBECA)

⁵ "CGIAR Systemwide Program on Integrated Pest Management (SP-IPM)", Groupe consultative pour la recherche Agricole international (CGIAR)

⁶ "2nd joint EPP/IOBC Panel Meeting on Biological Control Agents", Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes, 25-27 mars 2009

biologique (CDB)⁷⁻⁸. Mais qu'est-ce qu'est finalement la lutte biologique ou biocontrôle (Mitchell *et al.*, 1991) ? Sa définition est assez controversée, certains parlent de l'utilisation d'organismes vivants (micro- ou macro-organismes) pour lutter contre les ravageurs, mais d'autres instances parmi lesquelles l'OILB parlent de l'utilisation, en plus d'êtres vivants, de produits naturels tels que les hormones d'insectes (Deravel *et al.*, 2014). En somme il y aurait 3 types de lutte biologique.

Premièrement, il y a la lutte physique qui consiste en la simple utilisation de matériel tel que des filets protecteurs, le désherbage naturel, les moustiquaires.

Deuxièmement, il y a la lutte biologique sans auxiliaire qui est « *l'usage de molécules ou substances biologiques toxiques pour les bioagresseurs [...] similaire à la lutte chimique* », dans laquelle on trouve les insecticides phytochimiques (ryanodine, nicotine, pyréthrinés), mais aussi les toxines bactériennes, telles que les toxines Cry de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bravo and Soberón, 2008; Lucena *et al.*, 2014). Il y a également la lutte biologique par confusion sexuelle qui « *consiste à diffuser dans l'air des phéromones sexuelles à des concentrations élevées afin de désorienter les adultes des espèces ciblées et d'empêcher leur accouplement* », mais aussi la lutte autocide qui « *consiste à lâcher des mâles stériles d'un ravageur ou vecteur donné afin de limiter sa reproduction et sa descendance* », comme cela est actuellement mis en œuvre contre le vecteur *Aedes albopictus*, alias le moustique tigre. Aux États-Unis essentiellement, l'usage de molécules pesticides produites par les plantes transgéniques (PGM) est largement appliqué, contrairement à l'Europe où l'usage des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) pour la production agricole est très controversé et encadré par la « Directive 2001/18/CE du Parlement européen et du Conseil du 12 mars 2001 relative à la dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil ». Néanmoins, un maïs modifié, MON 810 transgénique pour la toxine Cry1Ab, est autorisé à la culture. Il est produit essentiellement dans la péninsule ibérique et plusieurs autres produits transgéniques pour des toxines Cry et des gènes de résistance au glyphosate sont autorisés à l'importation⁹. En France, un moratoire a été appliqué sur la culture d'OGM sur le territoire, suivi d'une interdiction.

Le détournement de la machinerie cellulaire, en particulier les mécanismes de l'immunité de l'insecte, est également utilisé pour lutter contre ces nuisibles. Par exemple, de grands espoirs ont été fondés sur l'activation provoquée de l'ARN interférence (ARNi) à l'aide d'ARNs double brin (ARNdb). Cette machinerie cellulaire permet aux différents organismes de réguler post-transcriptionnellement l'expression des gènes et fait partie, entre autres, de la réponse anti-virale.

⁷ F. Haas, J.C. van Lenteren, M.J.W. Cock, et al., « Is the Convention on Biological Diversity promoting environmentally friendly solutions to pest control? », CGIAR Systemwide Program on Integrated Pest Management (SP-IPM)

⁸ M.J.W. Cock, J.C. van Lenteren, J. Brodeur et al., « The use and exchange of biological control agents for food and agriculture », Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), octobre

⁹ <https://www.ecologique-solidaire.gouv.fr/organismes-genetiquement-modifies-ogm>

Les premiers ARNi ont été découverts et décrits pour leur fonction régulatrice chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1991). Il existe trois principaux types d'ARNi dans le monde animal et végétal (Vijayendran *et al.*, 2013; Joga *et al.*, 2016) :

- Les petits ARN interférents (pARNi) endogènes (dirigés contre les transcrits cellulaires) ou exogènes (dirigés contre les transcrits introduits ou viraux). Ces pARNi constitueraient l'essentiel de la réponse antivirale chez les arthropodes (Vijayendran *et al.*, 2013)
- Les micro ARN (miARN) qui régulent l'expression des gènes en modulant la disponibilité des ARN messagers (ARNm) (Vijayendran *et al.*, 2013)
- Les ARN Piwi-associés (piARN) impliqués dans la suppression des transposons, ne dépendent pas de l'enzyme Dicer et sont associés dans la ribonucléoprotéine à Piwi plutôt qu'à l'une des protéines Argonaute, contrairement aux pARNi et miARN (Vagin *et al.*, 2006).

La technique d'ARN interférence a démontré son potentiel afin de lutter contre ces insectes nuisible (Palli, 2014; Zotti and Smaghe, 2015), cependant son efficacité varie de manière considérable selon l'ordre d'insecte. En effet, cette technique est très efficace chez les Coléoptères pour lesquels il a été prouvé que l'ARNi est capable d'inactiver l'expression d'un gène cible avec une efficacité supérieure ou égale à 90%, que cette inactivation perdure dans le temps et en utilisant une faible dose d'ARN double brin pour initier l'interférence (Baum *et al.*, 2007; Bolognesi *et al.*, 2012). À l'inverse, chez les Lépidoptères, l'efficacité dépend des espèces comme nous le montre Terenius *et al.*, 2011 dans cette revue. La première publication sur l'ARNi chez les Lépidoptères a été publiée en 2002 montrant l'extinction d'un gène responsable de la pigmentation chez *Bombyx mori* après injection d'ARNdb chez l'embryon (Quan *et al.*, 2002). Par la suite, d'autres scientifiques ont pu utiliser cet outil afin de mieux comprendre la physiologie chez les Lépidoptères, dont des *Noctuidae* du genre *Spodoptera* (Tian *et al.*, 2009; Rodríguez-Cabrera *et al.*, 2010). Cet outil a été testé également, au vu de sa potentielle efficacité, comme insecticide. Chez la quasi-totalité des ravageurs de culture la meilleure méthode d'infection par un microorganisme est l'administration par voie orale, étant donné que les insectes causent des ravages le plus souvent en se nourrissant sur les plantes cultivées. Une méthode d'ingestion des ARNi a été de créer des plantes transgéniques produisant des ARNdb contre les ravageurs (appelé « plant-mediated ou « host-induced » RNAi » HI-RNAi) (Mamta and Rajam, 2017). Cette technique s'est avérée efficace, notamment pour contrecarrer les résistances actuelles à la toxine Bt d'un coléoptère, la chrysomèle des racines du maïs, *Diabrotica virgifera virgifera* (Le Conte) (Baum *et al.*, 2007). Cette technique a aussi été utilisée sur le lépidoptère *Helicoverpa armigera* (Mao *et al.*, 2007) ainsi que sur le puceron vert du pêcher *Myzus persica* (Mao and Zeng, 2014). Cependant, il a été montré que l'administration par voie orale, même d'une grande quantité d'ARNdb, n'est clairement pas la meilleure méthode pour éteindre ou diminuer l'expression des gènes cibles (Terenius *et al.*, 2011). Cette « non-activité » des ARNdb chez les Lépidoptères pourrait être due notamment à un faible passage de la barrière intestinale et de la

matrice péritrophique mais aussi à l'absorption limitée des ARNdb par les entérocytes (Joga *et al.*, 2016). Il a été montré également que la présence de virus (Garbutt, 2011) dans l'intestin moyen chez l'insecte active les défenses immunitaires antivirales qui donc détruiraient les ARNi avant même qu'ils puissent traverser la barrière intestinale ; le pH basique de l'intestin n'étant pas non plus des plus favorables à la stabilité des ARN en général (Swevers *et al.*, 2013; Joga *et al.*, 2016). La présence d'ARNase db dans la salive chez l'insecte, par exemple la punaise *Lygus lineolaris*, dégraderait de manière considérable les ARNi (Allen and Walker, 2012), il en va de même dans l'hémolymphe chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Christiaens *et al.*, 2014). Récemment, il a été montré que le Lépidoptère *Ostrinia furnacalis* possède une nucléase appelée *REase* (« RNAi efficiency-related nuclease ») dégradant les petits ARN interférants, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi les Lépidoptères sont pour la plupart réfractaires à la technique ARNi (Guan *et al.*, 2018). Il a été montré par ailleurs que l'injection des ARNdb était plus efficace, mais évidemment non réalisable pour une utilisation à grande échelle sur les ravageurs (Terenius *et al.*, 2011). Afin de contourner l'activité des nucléases par exemple, l'utilisation de nanoparticules à partir de chitosan a été envisagée pour passer la barrière intestinale sans activer la voie cellulaire inactivant les ARNdb et être ainsi délivrés dans la cellule (Joga *et al.*, 2016) notamment chez les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes gambiae* (Zhang *et al.*, 2015). Cette technique a été utilisée chez le lépidoptère *Ostrinia furnacalis* mais a été plus efficace lorsque le chitosan contenant l'ARNdb était mélangée à une nanoparticule fluorescente à noyau cationique, ce qui permettait une absorption plus rapide par les cellule avec une faible cytotoxicité et une meilleure extinction des gènes cibles par rapport à l'ARNdb couplé à du chitosan seul (He *et al.*, 2013). Chez la drosophile *Drosophila suzukii*, l'apport des ARNdb par l'intermédiaire de liposomes a été réalisé avec succès (Taning *et al.*, 2016) ce qui permet d'envisager le développement de cette approche technique à d'autres insectes.

Troisièmement, il y a la lutte biologique utilisant des organismes dits « auxiliaires de culture » car leur présence, naturelle ou contrôlée, dans les cultures s'établit, se maintient ou se développe aux dépens des ravageurs.

Les fonctions d'auxiliaire peuvent être dévolues ou associées à des végétaux « bénéfiques » par leur effet répulsif ou toxique contre les ravageurs ou au contraire attractif pour les auxiliaires (Lopes *et al.*, 2016), néanmoins le terme consacré, en particulier par les pratiques permaculturelles, est dans ce cas « plantes compagnes » ou association culturale. Les auxiliaires utilisés en lutte biologique sont plutôt des vertébrés (oiseaux, reptiles, poissons) (García *et al.*, 2018) ou des arthropodes prédateurs naturels : les chrysopes, les moucheron prédateurs de pucerons, les araignées, les hyménoptères parasitoïdes etc. (Treier *et al.*, 2017), largement utilisés contre les ravageurs.

Des microorganismes, tels que les bactéries (et/ou leur toxine, comme cité ci-dessus), les champignons et les virus entomopathogènes, ainsi que des nématodes (Lacey *et al.*, 2015) sont également utilisés.

Ces auxiliaires sont impliqués dans quatre stratégies de lutte contre les ravageurs : la conservation, l'introduction, l'inoculation et l'inondation.

- La lutte biologique par conservation de la faune auxiliaire consiste à maintenir et favoriser le bon développement de la faune existante par exemple en aménageant l'habitat naturel (Landis *et al.*, 2000) et en créant des structures agricoles qui influencent positivement la faune auxiliaire (Menalled *et al.*, 1999). Cette démarche va jusqu'à définir les caractéristiques des plantes susceptibles d'attirer les prédateurs de ravageurs, comme les coccinelles et syrphes, pour lutter contre les pucerons (Hatt *et al.*, 2018).
- La lutte biologique par introduction, dite « classique », consiste en l'introduction de vertébrés ou invertébrés comme prédateurs des insectes ravageurs ou vecteurs, introduits accidentellement. Le but est alors d'éradiquer le ravageur invasif. Par exemple, l'utilisation d'un champignon entomopathogène, *Entomophaga maimaiga*, au Japon a permis de contrôler la population d'un lépidoptère ravageur des forêts, *Lymantria dispar*, après son introduction accidentelle (Zúbrik *et al.*, 2016). Bien évidemment, ce type de lutte biologique est très contrôlé et suivi au cours du processus.
- La lutte biologique par inoculation vise à contrôler au début de l'invasion des nuisibles pour la durée de la saison ou sur plusieurs années avec un faible nombre d'individus auxiliaires. Cette stratégie a été utilisée pour contrôler l'infestation de la chenille à houppes du pin, *Dasychira griseifacta*, en Colombie-Britannique par « *Orgyia pseudotsugata* multiple nucleopolyhedrovirus » (Baculovirus) (Thompson, 1978).
- Enfin, la lutte biologique par inondation, contrairement à la lutte biologique par inoculation, ne nécessite pas de période d'installation de l'auxiliaire et consiste à appliquer en masse l'auxiliaire pour une efficacité rapide. Par exemple tous les ans, une dissémination massive de Trichogrammes (guêpe parasitoïde oophage) dans les champs de maïs permet d'installer rapidement une population de prédateurs contre la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis*, en Europe. En avril 2018, l'épandage par drone de capsules biodégradables contenant les œufs de Trichogrammes a été réalisé dans les champs en France¹⁰.

L'utilisation d'agents entomopathogènes ne date pas d'hier et est attestée depuis le 7^{ème} siècle avec l'utilisation de la plante *Illicium lanceolatum* comme protection des cultures chinoises contre les insectes (Leng *et al.*, 2011; Deravel *et al.*, 2014). On peut parler de biopesticide, mais ici encore la définition n'est pas bien claire (Sporleder and Lacey, 2013). Ces agents, utilisés aussi bien par les particuliers que par les agriculteurs, sont également appelés Agent de Contrôle Microbien (ACM) (Lacey *et al.*, 2015; Benelli *et al.*, 2016). Parmi ces ACMs, celui qui est actuellement le plus utilisé et commercialisé est la bactérie *Bacillus thuringiensis* (Bt). Il est possible de n'utiliser que les toxines,

¹⁰ <https://agrodrome.fr/drone-agricole-agriculture-precision/epandage-de-trichogramme-par-drone/>

nommées Cry, produites par cette dernière. Les toxines Cry les plus utilisées dans le commerce sont les Cry de classes Cry 1, Cry 2 et Cry 3 et il existe 4 sérotypes de Bt possédant ces toxines : le 3a, 3b (*kurstaki*), le sérotype 7 (*aizawa*) et le sérotype 8a, 8b (*morrisoni*). Elles sont spécifiques des Lépidoptères et des Coléoptères ravageurs de culture. De plus, Bt est également utilisée contre les insectes vecteurs de maladies humaines avec le sérotype 14 (*israelensis*) (Lacey, 2007 ; Chaufaux., 1995¹¹). La bactérie Bt produit des inclusions cristallines (stables dans l'environnement) qui une fois ingérées par la larve se retrouvent dans l'intestin ou elles sont solubilisées grâce au pH pour donner une protoxine qui sera clivée par les protéases intestinales de l'hôte. Elle devient alors une toxine activée qui se fixe à son récepteur membranaire (Bravo *et al.*, 2007). Deux hypothèses étayées dans diverses publications nous expliquent le mode d'action de la toxine activée qui entraîne la mort de l'insecte. D'après les revues de (Bravo and Soberón, 2008), et plus récemment (de Almeida Melo *et al.*, 2014), la première hypothèse serait, de manière synthétique, que les pores formés à la suite de la fixation de la toxine à son récepteur créerait un choc osmotique et une désorganisation de l'épithélium intestinal qui à terme engendrerait la mort de l'insecte ; la seconde hypothèse serait que cette fixation ligand-récepteur engendrerait une cascade de signalisation qui amènerait à l'activation de la voie apoptotique des cellules et entraînerait, là encore, la mort de l'insecte. Si, comme cela est le cas dans les produits commercialisés, il n'y a que des cristaux dans la formulation, ils entraînent une détérioration de l'intestin de la larve et créent un choc osmotique suffisant pour provoquer la mort de l'insecte (Latham *et al.*, 2017). La mort de l'insecte résulterait soit d'une septicémie, liée au passage de bactéries pathogènes au travers de l'épithélium intestinal déstructuré (Raymond *et al.*, 2010; Caccia *et al.*, 2016), soit de l'action directe de la bactérie Bt elle-même sur l'insecte, lorsque Bt est présente bien évidemment (Heierson *et al.*, 1986; Schnepf *et al.*, 1998). Quoiqu'il en soit, l'effet recherché est bien la mort rapide de l'arthropode ou du moins un arrêt le plus immédiat possible de la prise de nourriture responsable des ravages causés par l'animal. Malgré leur succès et leur efficacité, les toxines Cry, comme les agents phytosanitaires de synthèse, deviennent de moins en moins efficaces contre certains ravageurs qui mettent en place des moyens de défense efficaces, notamment des mutations ou altérations de l'expression de gènes codant pour les récepteurs des toxines (tels que les cadhérines, aminopeptidases de type N (APN), Alkalines phosphatases (ALP)), mais aussi des mutations de gènes codant pour les transporteurs ABCC2, qui sont également des récepteurs de Bt (Tanaka *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2017). Fait intéressant, il a été montré récemment que les protoxines de Bt se fixaient aussi au récepteur et qu'elles étaient plus efficaces que les toxines activées contre les ravageurs résistants (Tabashnik *et al.*, 2015), ce qui pourrait constituer une solution, temporaire, à l'apparition des résistances.

Ainsi, pour contourner la résistance des ravageurs, il faut approfondir nos connaissances sur les moyens actuels de lutte biologique, mais aussi trouver d'autres biopesticides innovants. Dans ce contexte, par exemple, des Cry hybrides ont été mises au point, pouvant combiner différents domaines

¹¹ Le point sur *Bacillus thuringiensis*, par Josette Chaufaux, paru dans *Insectes* n°97 (1995), pp. 2 à 6.

Tableau I : Bactéries (en violet) et champignons (en vert) entomopathogènes utilisés ou développés pour le contrôle des ravageurs de culture (adapté de Lacey *et al.*, 2015).

Bacterial species	Major targeted habitat	Examples of major pest order
<i>Bacillus thuringiensis sub-species kurstaki*</i>	Row crops, forest, orchards	Lepidoptera: numerous families and species
<i>Bacillus thuringiensis sub-species aizawai*</i>	Row crops, orchards	Lepidoptera
<i>Bacillus thuringiensis sub-species tenebrionis*</i>	Potato	Coleoptera: Chrysomelidae, predominantly Leptinotarsa decemlineata
<i>Bacillus thuringiensis sub-species israelensis*</i>	Diverse lentic and lotic aquatic habitats	Diptera: Culicidae and Simuliidae
<i>Bacillus thuringiensis sub-species japonensis</i>	Lawn and turf	Coleoptera: Scarabaeidae
<i>Lysinibacillus sphaericus*</i>	Lentic aquatic habitats	Diptera: Culicidae
<i>Paenibacillus popilliae</i>	Lawn and turf	Coleoptera: Scarabaeidae: Popillia japonica
<i>Serratia entomophila*</i>	Pasture	Coleoptera: Scarabaeidae: Costelytra zealandica

Fungi species	Targeted insect	Produced in
<i>Schersonia aleyrodis</i>	Hemiptera (Aleyrodidae)	Russia
<i>Beauveria bassiana sensu lato</i>	Acari, Coleoptera, Diplopoda, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Siphonoptera, Thysanoptera	Africa, Asia, Australia, Europe, South & North America
<i>Beauveria brongniartii</i>	Coleoptera (Scarabaeidae)	Europe, Colombia, Reunion Island
<i>Conidiobolus thromboides</i>	Acari Hemiptera, Thysanoptera	Colombia, India, South Africa
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Acari	India
<i>Isaria fumosorosea</i>	Acari, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Thysanoptera	Belgium, Colombia, Mexico, USA, Venezuela
<i>Lagenidium giganteum</i>	Diptera (Culicidae)	USA
<i>Lecanicillium longisporum</i>	Hemiptera	Brazil, Netherlands
<i>Lecanicillium muscarium</i>	Acari, Hemiptera, Thysanoptera	Netherlands, Russia
<i>Metarhizium anisopliae sensu lato</i>	Acari, Blattoidea, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera, Orthoptera	Africa, Asia, Australia, Europe, South, Central & North America
<i>Metarhizium acridum</i>	Orthoptera	Australia, South Africa, USA
<i>Nomurea rileyi</i>	Lepidoptera	Columbia, India

en une seule espèce moléculaire (Dow Agrosiences ., 2003 ; Leng *et al.*, 2011; Latham *et al.*, 2017) et de nouvelles espèces de bactéries ou de champignons entomopathogènes ont été testées contre les ravageurs (voir le **Tableau I**, réadapté de Lacey *et al.*, 2015), mais également des virus entomopathogènes, dont nous parlerons en détail dans ce mémoire (Lacey *et al.*, 2015).

Introduction

I. Les virus entomopathogènes

1. Généralités

La plupart des virus entomopathogènes sont transmis *per os via* la nourriture ou par cannibalisme des insectes. Il existe à ce jour 10 familles de virus entomopathogènes à ADN et 15 familles de virus à ARN selon le Comité International sur la Taxonomie des Virus (ICTV) 2018 (**Tableaux II et III**). Parmi ces virus, seul un petit nombre est étudié, soit pour certains, dans le cadre d'une utilisation en tant qu'agent de lutte biologique, soit pour les baculovirus au moins, dans le cadre de leur utilisation dans de processus biotechnologiques comme la production de protéines recombinantes. Ici, je développerai uniquement les virus à ADN et ARN dont le processus infectieux implique le franchissement la barrière intestinale de l'insecte pour leur permettre de se répliquer (Williams *et al.*, 2017). Les mieux connus et les plus étudiés de ces virus entomopathogènes sont les baculovirus.

1.1. Les virus à ADN

Tableau II : Taxonomie des virus entomopathogènes à ADN (ICTV, 2018)

	Family	Subfamily	Genus	Number of species	Type Species	Genome organisation	Size	Env	Midgut replication
dsDNA	Ascoviridae		<i>Ascovirus</i>	3	<i>Spodoptera frugiperda ascovirus 1a</i>	Circular	200-400 nm	Yes	/
			<i>Toursvirus</i>	1	<i>Diadromus pulchellus ascovirus 4a</i>				
	Baculoviridae		<i>Alphabaculovirus</i>	32	<i>Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus</i>	Circular	21*260 nm	Yes	Yes
			<i>Betabaculovirus</i>	17	<i>Cydia pomonella granulovirus</i>				
			<i>Deltabaculovirus</i>	1	<i>Culex nigripalpus nucleopolyhedrovirus</i>				
			<i>Gammabaculovirus</i>	2	<i>Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus</i>				
	Hytrosaviridae		<i>Glossinavirus</i>	1	<i>Glossina hytrovirus</i>	Circular	100*700-100 nm	Yes	/
			<i>Muscavirus</i>	1	<i>Musca hytrovirus</i>				
	Iridoviridae	Betairidovirinae	<i>Chloriridovirus</i>	1	<i>Invertebrate iridescent virus 3</i>	Linear	180-185 nm	No	/
			<i>Iridovirus</i>	2	<i>Invertebrate iridescent virus 6</i>				
Nudiviridae		<i>Alphanudivirus</i>	2	<i>Oryctes rhinoceros nudivirus</i>	Circular	400*100 nm	Yes	Yes	
		<i>Betanudivirus</i>	1	<i>Heliothis zea nudivirus</i>					
Polydnviridae		<i>Bracovirus</i>	32	<i>Cotesia melanoscela bracovirus</i>	Circular segmented	/	Yes		
		<i>Ichnovirus</i>	21	<i>Camponotus pennsylvanicus ichnovirus</i>					
Poxviridae	Entomopoxvirinae	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7	<i>Melolontha melolonthae entomopoxvirus</i>	Linear	450*250 nm	Yes	Yes	
		<i>Betaentomopoxvirus</i>	16	<i>Amsacda moorei entomopoxvirus</i>					
		<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>					
ssDNA	Bidnaviridae		<i>Bidensovirus</i>	1	<i>Bombyx mori bidensovirus</i>	Linear bipartite	25 nm	No	/
	Genomoviridae		<i>Gemyduguvirus</i>	1	<i>Dragonfly associated gemyduguvirus 1</i>	Linear monopartite	20 nm	No	/
	Parvoviridae	Densovirinae	<i>Ambidensovirus</i>	6	<i>Lepidopteran ambidensovirus 1</i>	Linear	18-26 nm	No	No
			<i>Brevidensovirus</i>	2	<i>Dipteran brevidensovirus 1</i>				Yes
			<i>Iteradensovirus</i>	5	<i>Lepidopteran iteradensovirus 1</i>				Yes
		<i>Unassigned</i>	1	/				Yes	

1.1.1. Les baculovirus

Avec pas moins de 13 734 publications sur PubMed, les virus de la famille des *Baculoviridae* sont les virus entomopathogènes les plus étudiés et les seuls commercialisés comme biopesticides (Chang *et al.*, 2003). Ce sont des virus enveloppés, en forme de bâtonnet, comprenant un ADN double brin (db) circulaire de 80 à 180 kb. Cette famille est divisée en quatre genres : *Alphabaculovirus* (*Nucleopolyhedrovirus* (NPV) spécifique des lépidoptères, ce groupe est divisé en deux groupes : I et II), *Betabaculovirus* (*Granulovirus* (GV) spécifique des lépidoptères), *Deltabaculovirus* (NPV spécifique des diptères) et *Gammabaculovirus* (NPV spécifique des hyménoptères) (Jehle *et al.*, 2006b, a; Harrison *et al.*, 2018) (**Tableau II**). Quatre-vingt-dix pourcent des baculovirus sont isolés des lépidoptères (Jehle *et al.*, 2006b, a). Dans l'environnement, les baculovirus sont inclus et protégés dans des structures protéiques cristallisées, appelées corps d'inclusions (« *Occlusion bodies* », OBs). Ceux qui contiennent les NPVs (un (SNPV) ou plusieurs virions (MNPV)) sont en forme de polyèdre, ceux qui contiennent les GVs (un seul virion) sont ovoïdes. Les OBs de manière générale sont très résistants dans l'environnement, d'où leur utilisation sous cette forme dans le commerce. Les OBs sont ingérés par les larves d'insectes, se retrouvent dans le bol alimentaire puis au niveau de l'intestin, où le pH, lorsqu'il est alcalin, permet leur dissolution et la libération des virions issus des OBs (« *Occlusion-derived viruses* », ODVs) (Haas-Stapleton *et al.*, 2004) (**Figure 2**). L'enveloppe des ODVs fusionne avec la membrane des microvillosités de l'épithélium intestinal pour libérer la nucléocapside dans l'entérocyte, qui transite jusqu'au noyau pour se répliquer. Après synthèse des protéines virales et assemblage, les nucléocapsides nouvellement formées ressortent par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique basale pour donner des virus dits BV pour Budded-viruses. Il s'agit ici de la primo-infection dans l'intestin moyen. Les BVs se retrouvent dans le système circulatoire de la chenille, l'hémolymphe et se multiplient dans les tissus cibles, tels que les muscles de l'intestin moyen, les hémocytes (cellules immunitaires de l'hémolymphe) et les trachées (système respiratoire). Il s'agit de l'infection dite secondaire. Dans les stades tardifs de l'infection, 2-3 semaines après l'infection suivant le stade, les virus sont inclus dans les corps cristallins de polyhédrine (NPV) ou de granuline (GV) pour former les OBs qui pourront résister aux conditions environnementales après leur libération à la mort du premier insecte infectés, permettant l'ingestion plus tardive par un autre insecte (Ohkawa *et al.*, 2005, 2010; Airene *et al.*, 2013; Rohrmann, 2013; Williams *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2018).

1.1.2. Les iridovirus

Les iridovirus sont des virus à ADN db linéaire, à capsidie icosaédrique, de 180-185 nm. Une particularité de ces virus est qu'ils possèdent une membrane lipidique interne (entre le génome et la capsidie) et peuvent posséder une enveloppe, si le virus sort de la cellule par bourgeonnement, ou non, si le virus sort par lyse cellulaire (Yan *et al.*, 2000; Loiseau *et al.*, 2017). Les iridovirus appartiennent à la famille des *Iridoviridae* et la sous-famille des *Betairidovirinae* qui se divise en deux genres : les

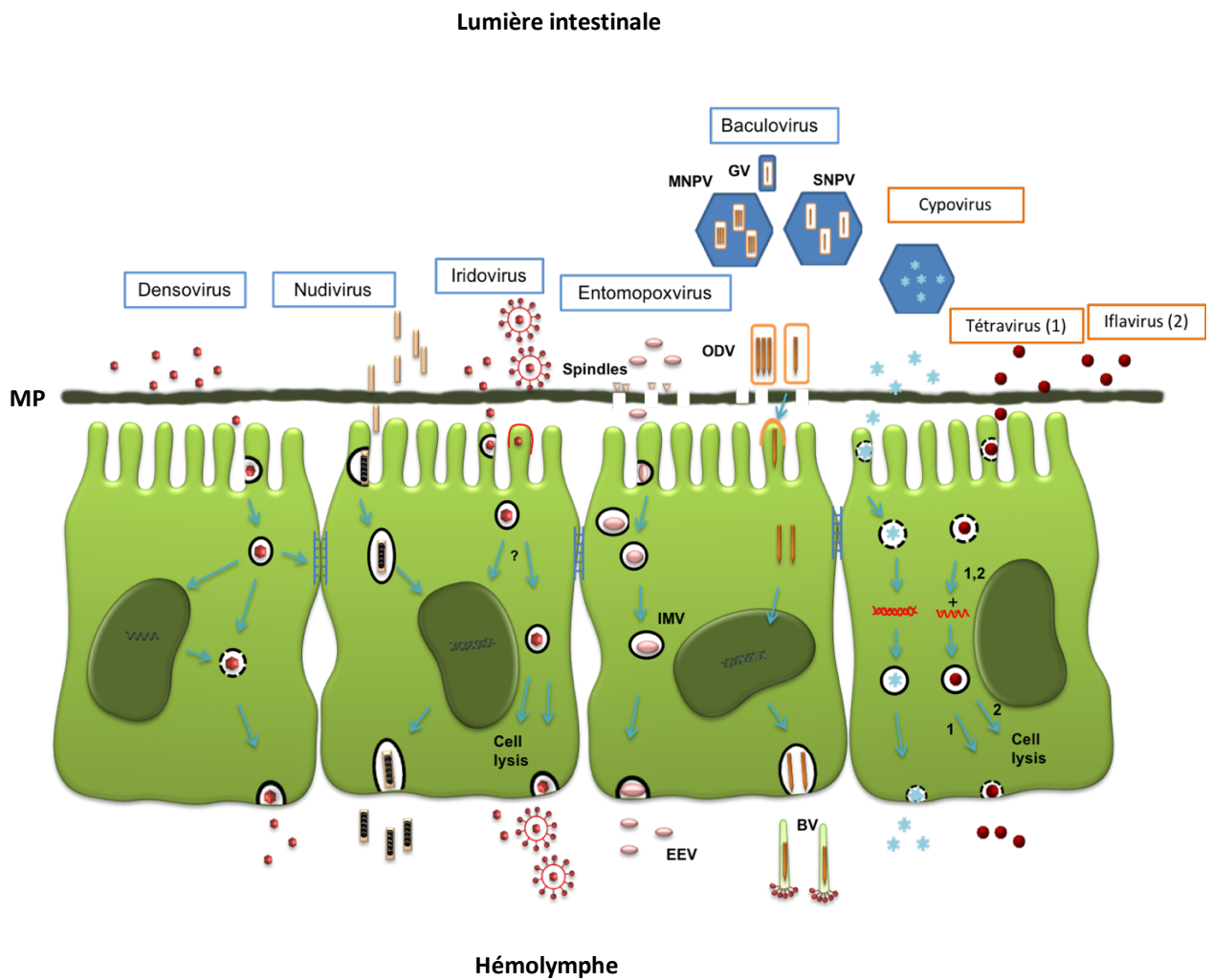


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes d'entrée des virus entomopathogènes dans l'intestin moyen de l'insecte.

Les virus à ADN sb et db sont encadrés de bleu ; Les virus à ARN db et sb de polarité positive sont encadrés en orange. 1, 2 montrent respectivement les tétravirus et les Iflavirus. La ligne continue au dessus de l'épithélium monocouche schématise la matrice péritrophique.

Chloriridovirus et les *Iridovirus* (**Tableau II**). Ces virus sont ingérés par l'insecte, puis se retrouvent dans l'intestin où ils entrent dans les entérocytes par endocytose (**Figure 2**) (Chitnis *et al.*, 2008) pour initier l'infection afin de se répliquer dans les tissus de l'insecte (Williams, 1998, 2008; Jakob *et al.*, 2002; Loiseau *et al.*, 2017). Nous ne savons pas si ces virus se répliquent ou non dans les entérocytes de l'insecte. Le type d'endocytose est plus clair pour les arbovirus de cette famille lorsqu'ils infectent les vertébrés. Pour l'espèce *Singapore grouper iridovirus*, il s'agit d'une endocytose clathrine-dépendante (Wang *et al.*, 2014) tandis que pour *Epizootic haematopoietic necrosis virus*, c'est une endocytose cavéoline-dépendante (Guo *et al.*, 2012). Les *Iridovirus* sont peu étudiés de par leur faible prévalence chez les insectes ravageurs de culture et de par leur grande diversité d'hôtes au laboratoire (Henderson *et al.*, 2001; Jakob *et al.*, 2002). Cependant, des études plus approfondies permettraient de comprendre le mécanisme infectieux de ces virus, c'est pourquoi Trevor Williams a publié en 2008 (Williams, 2008) une revue afin de montrer l'importante diversité d'hôtes de ces virus et stimuler la recherche sur ces virus.

1.1.3. Les nudivirus

Les nudivirus sont des virus à ADN db circulaire, enveloppés en forme de tige de 400 nm de long et 80 à 100 nm de large, appartenant à la famille des *Nudiviridae* avec deux genres : *Alphanudivirus* et *Betanudivirus* (**Tableau II**). Ces virus sont considérés comme des baculovirus sans occlusion (Huger and Krieg, 1991). La répllication est également initiée dans les cellules épithéliales de l'intestin et se poursuit dans les tissus cibles dont le corps gras de l'insecte (**Figure 2**) (Huger, 2005; Lee *et al.*, 2015). Ce virus est localement utilisé, mais non commercialisé, comme agent de biocontrôle en Asie du sud-est et dans le Pacifique contre le ravageur du cocotier *Oryctes rhinoceros* (Zelazny *et al.*, 1992; Huger, 2005; Jackson *et al.*, 2005; Jackson, 2009).

1.1.4. Les entomopoxvirus

Les entomopoxvirus sont des virus à ADN db linéaire, enveloppés de forme ovoïde d'environ 320 à 450 nm de long et 230 à 250 nm de large, appartenant à la famille des *Poxviridae* et la sous famille des *Entomopoxvirinae*, avec trois genres : *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* et *Gammaentomopoxvirus* (**Tableau II**). La particularité de ces virus est qu'ils peuvent avoir une double enveloppe. Les virus sont soit nommés virus intracellulaire mature (IMV) n'ayant qu'une simple enveloppe, et les virus possédant une double enveloppe obtenue après leur passage dans le trans-golgi, sont nommés virus à enveloppe externe (EEV) (Smith *et al.*, 2002; McFadden, 2005).

Les entomopoxvirus possèdent deux formes de corps protéique : un corps d'inclusion, comme les baculovirus, qui contient le virion et est appelé sphéroïde, dont la protéine principale est la sphéroïdine ; et un corps protéique, qui ne contient pas de virions, appelé « spindle » et dont la protéine majoritaire est la fusoline. Les sphéroïdes et les « spindles » sont ingérés par la larve d'insecte, le pH alcalin de l'intestin permet la dissolution de la sphéroïde, comme chez les baculovirus, et la digestion partielle des

Tableau III : Taxonomie des virus entomopathogènes à ARN (ICTV, 2018)

	Family	Subfamily	Genus	Number of species	Type Species	Genome organisation	Size	Env	Midgut replication
dsRNA	<i>Birnaviridae</i>		<i>Entombirnavirus</i>	1	<i>Drosophila X virus</i>	Linear segmented	70 nm	No	/
	<i>Reoviridae</i>	<i>Spinareovirinae</i>	<i>Cypovirus</i>	16	<i>Cypovirus 1</i>	Linear segmented	60-80 nm	No	Yes
			<i>Dinovernavirus</i>	1	<i>Aedes Pseudoscutellaris reovirus</i>				
			<i>Idnoreovirus</i>	5	<i>Idnoreovirus 1</i>				
ssRNA (+)	<i>Alphatetraviridae</i>		<i>Betatetravirus</i>	7	<i>Nudaurelia capensis beta virus</i>	Linear monopartite	40 nm	No	Yes
			<i>Omegatetravirus</i>	3	<i>Nudaurelia capensis omega virus</i>	Linear bipartite			
	<i>Carmotetraviridae</i>		<i>Alphacarmotetravirus</i>	1	<i>Providence virus</i>	Linear monopartite	40 nm	No	Yes
	<i>Dicistroviridae</i>		<i>Aparavirus</i>	6	<i>Acute bee paralysis virus</i>	Linear monopartite	30 nm	No	/
			<i>Cripavirus</i>	4	<i>Cricket paralysis virus</i>				
			<i>Triatovirus</i>	5	<i>Triatoma virus</i>				
	<i>Iflaviridae</i>		<i>Iflavirus</i>	14	<i>Infectious flacherie virus</i>	Linear monopartite	30 nm	No	/
	<i>Mesoniviridae</i>	<i>Hexponivirinae</i>	<i>Alphamesonivirus</i>	9	<i>Alphamesonivirus 1</i>	Linear monopartite	60-80 nm	Yes	/
	<i>Nodaviridae</i>		<i>Alphanodavirus</i>	5	<i>Nodamura virus</i>	Linear bipartite segmented	30 nm	No	/
	<i>Permutotetraviridae</i>		<i>Alphapermutotetravirus</i>	2	<i>Thosea asigna virus</i>	Linear monopartite	40 nm	No	Yes
	<i>Polycipiviridae</i>		<i>Chipolycivirus</i>	2	<i>Chironomus riparius virus 1</i>	Linear	33 nm	No	/
			<i>Hupolycivirus</i>	1	<i>Hubei hupolycivirus</i>				
		<i>Sopolycivirus</i>	11	<i>Solenopsis invicta virus 2</i>					
<i>Soliniviridae</i>		<i>Invictavirus</i>	1	<i>Solenopsis invicta virus 3</i>	Linear	27-33 nm	No	/	
		<i>Nyfulvavirus</i>	1	<i>Nylanderia fulva virus 1</i>					
ssRNA (-)	<i>Rhabdoviridae</i>		<i>Sigmavirus</i>	7	<i>Drosophila melanogaster sigma virus</i>	Linear	75-180	Yes	/
ssRNA (RT)	<i>Metaviridae</i>		<i>Errantivirus</i>	10	<i>Drosophila melanogaster gypsy virus</i>	Retrotransposons	/	/	/
			<i>Metavirus</i>	21	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus</i>				
	<i>Belpaoviridae</i>		<i>Semotivirus</i>	11	<i>Ascaris lumbricoides Tas virus</i>	Retrotransposons	/	/	/
	<i>Pseudoviridae</i>		<i>Hemivirus</i>	8	<i>Drosophila melanogaster copia virus</i>	Retrotransposons	30-50 nm	No	/

« spindles » qui active un domaine chitinase de la séquence de la fusoline afin de dégrader la matrice péritrophique et permettre le passage des virions vers l'intestin de l'insecte (**Figure 2**) (Mitsuhashi and Miyamoto, 2003; Mitsuhashi *et al.*, 2007; Chiu *et al.*, 2015). Le virion peut ainsi se fixer à son récepteur, encore inconnu, puis la fusoline induit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des microvillosités des cellules intestinales pour libérer la capsid virale (Granados, 1973; Takemoto *et al.*, 2008) et permettre la réplication de l'ADN viral dans le noyau. Après cette primo-infection, les IMVs sont libérés par lyse cellulaires tandis que les EEVs sont libérés de la cellule par bourgeonnement (Devauchelle *et al.*, 1971), leur conférant ainsi leur double membrane (Smith *et al.*, 2002; McFadden, 2005), pour se répliquer dans les tissus cibles, à savoir le corps gras et les hémocytes (Bergoin *et al.*, 1969) et provoquer la mort de l'insecte. Cependant, la mort intervient très tardivement avec ces virus, 1 à 10 semaines après ingestion chez les lépidoptères (Bird *et al.*, 1971) - voire quelques mois chez les coléoptères (Hurpin, 1968). C'est pourquoi leur utilisation en lutte biologique n'a jamais vraiment été développée.

L'utilisation des densovirus comme agent de biocontrôle sera développée un peu plus loin dans ce manuscrit (Chapitre II).

1.2. Les virus à ARN

1.2.1. Les réovirus

Les réovirus sont des virus à ARN db linéaires segmentés, enveloppés ou non, à capsid icosaédrique de 70 nm, appartenant à la famille des *Reoviridae*. La sous-famille des *Spinareovirinae* se divise en 3 genres de virus entomopathogènes : les *Cypovirus*, les *Dinovernavirus* et les *Idnoreovirus* (**Tableau III**). La famille des *Reoviridae* a une particularité : les virus des genres *Dinovernavirus* et *Cypovirus* possèdent une capsid, alors que les autres genres de *Spinareovirinae* comportent une double capsid (Auguste *et al.*, 2014), et les virus de la sous-famille des *Sedoreovirinae* comportent, quant à eux une triple capsid (ViralZone¹²). La grosse différence entre les *Dinovernavirus* et les *Cypovirus* est que ces derniers comportent un corps d'inclusion ou polyèdre, comme les baculovirus, pouvant contenir plusieurs virions (Di *et al.*, 1991; Attoui *et al.*, 2005). Grâce à cette occlusion, ces virus peuvent perdurer dans des conditions environnementales délétères et ils sont donc utilisés en lutte biologique (Coulibaly *et al.*, 2007). Ces virus ont été utilisés pour contrôler, entre autres, le lépidoptère ravageur du palmier à huile (*Norape argyrrhorea*) en Amérique du sud (Zeddami *et al.*, 2003a, b ; Mertens *et al.*, 2000). Les *Cypovirus* sont transmis par ingestion des polyèdres, contenant les virions (**Figure 2**). Comme chez les baculovirus, le pH basique de l'intestin permet la dissolution de ces polyèdres et la libération des virions qui vont alors pouvoir se fixer à leur récepteur, encore inconnu, à la surface des entérocytes. Récemment, il a été montré que le domaine méthyltransférase (MTase) de la protéine virale VP3 de

¹² <https://viralzone.expasy.org/104>

Tableau IV : Taxonomie de la famille des *Parvovirinae* (Cotmore *et al.*, 2014 ; ICTV 2018)

Genus	Species	Virus/virus variants	Abbreviation		
<i>Amdoparvovirus</i>	<i>Carnivore amdoparvovirus 1</i>	<i>Aleutian mink disease virus</i>	AMDV		
	<i>Carnivore amdoparvovirus 2</i>	<i>Gray fox amdovirus</i>	GFAV		
	<i>Carnivore amdoparvovirus 3</i>	<i>Raccoon dog and fox amdoparvovirus</i>	RFAV		
	<i>Carnivore amdoparvovirus 4</i>	<i>skunk amdoparvovirus</i>	SKAV		
<i>Aveparvovirus</i>	<i>Galliform aveparvovirus 1</i>	<i>Chicken parvovirus</i>	ChPV		
		<i>Turkey parvovirus</i>	TuPV		
<i>Bocaparvovirus</i>	<i>Carnivore bocaparvovirus 1</i>	<i>Canine minute virus</i>	CnMV		
	<i>Carnivore bocaparvovirus 2</i>	<i>Canine bocavirus 1</i>	CBoV		
	<i>Carnivore bocaparvovirus 3</i>	<i>Feline bocavirus</i>	FBoV		
	<i>Carnivore bocaparvovirus 4</i>	<i>Feline bocaparvovirus 2</i>	FBoV2		
	<i>Carnivore bocaparvovirus 5</i>	<i>Feline bocaparvovirus 3</i>	FBoV3		
	<i>Carnivore bocaparvovirus 6</i>	<i>mink bocavirus 1</i>	MiBoV1		
	<i>Chiropteran bocaparvovirus 1</i>	<i>Myotis myotis bocavirus 1</i>	BtBoV1		
	<i>Chiropteran bocaparvovirus 2</i>	<i>Bat bocavirus WM40</i>	BtBoV WM40		
	<i>Chiropteran bocaparvovirus 3</i>	<i>Bat bocavirus XM30</i>	BtBoV WM30		
	<i>Chiropteran bocaparvovirus 4</i>	<i>Bat bocavirus Miniopterus schreibersii</i>	BtBoV Ms		
	<i>Lagomorph bocaparvovirus 1</i>	<i>Rabbit bocaparvovirus</i>	LBoV1		
	<i>Pinniped bocaparvovirus 1</i>	<i>California sea lion bocavirus 1</i>		CsBoV1	
		<i>California sea lion bocavirus 2</i>		CsBoV2	
		<i>California sea lion bocavirus 3</i>		CsBoV3	
	<i>Primate bocaparvovirus 1</i>	<i>Human bocavirus 1</i>		HBoV1	
		<i>Human bocavirus 3</i>		HBoV3	
		<i>Gorilla bocavirus</i>		GBoV	
		<i>Human bocavirus 2a</i>		HBoV2a	
		<i>Human bocavirus 2b</i>		HBoV2b	
		<i>Human bocavirus 2c</i>		HBoV2c	
		<i>Human bocavirus 4</i>		HBoV4	
		<i>Ungulate bocaparvovirus 1</i>	<i>Bovine parvovirus</i>		BPV
			<i>Porcine bocavirus 1</i>		PBoV1
			<i>Porcine bocavirus 2</i>		PBoV2
	<i>Porcine bocavirus 6</i>			PBoV6	
	<i>Porcine bocavirus 5</i>			PBoV5	
<i>Porcine bocavirus 7</i>			PBoV7		
<i>Ungulate bocaparvovirus 3</i>	<i>Porcine bocavirus 3</i>		PBoV3		
	<i>Porcine bocavirus 4-1</i>		PBoV4-1		
	<i>Porcine bocavirus 4-2</i>		PBoV4-2		
<i>Ungulate bocaparvovirus 4</i>	<i>Ungulate bocaparvovirus 6</i>		BBoV2		

Dendrolimus punctatus cypovirus (DpCV) se fixait à une phosphatase alcaline (ALP) de l'intestin du lépidoptère *Spodoptera exigua* afin de permettre son attachement à l'intestin de la chenille (Su *et al.*, 2017). Les *Cypovirus* se répliquent dans les cellules columnaires uniquement, puis dans les autres tissus cibles (Tan *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2011; Marzban *et al.*, 2014)

1.2.2. Les tétravirus

Les tétravirus sont classés en trois familles. La famille des *Alphatetraviridae* avec deux genres, les *Betatetravirus* et les *Omegatetravirus* ; les *Carmotetraviridae* n'ayant qu'un seul genre, les *Alphacarmotetravirus* ainsi que la famille des *Permutotetraviridae* n'ayant qu'un genre également *Alphapermutotetravirus*. Ces virus possèdent un génome ARN sb linéaire monopartite ou dipartite, de polarité positive, une capsid non-enveloppée de 40 nm (Kemenesi *et al.*, 2016) (**Tableau III**). Tout comme les virus ci-dessus, ces virus sont ingérés par les larves puis se retrouvent dans l'intestin, s'y répliquent, puis se multiplient dans les autres les tissus cibles (**Figure 2**) (Sugiharti *et al.*, 2010; Ferrero *et al.*, 2015 ; Gordon *et al.*, 1998; Finch *et al.*, 1974; Pringle *et al.*, 2003; Short *et al.*, 2013)

1.2.3. Les iflavirus

Les iflavirus sont des virus à ARN monocaténaire positif, non-enveloppés à capsid icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre. Ces virus font partie de la famille des *Iflaviridae* qui ne comporte qu'un seul genre, les *Iflavirus* (**Tableau III**). Ces virus sont ingérés par les larves puis se retrouvent dans l'intestin, s'y répliquent, sortent de la cellule par lyse puis se multiplient dans les autres tissus cibles (**Figure 2**). Il a été montré que la plupart des *Iflavirus* sont peu infectieux chez leurs hôtes, mais certains de ces virus peuvent être mortels à forte concentration (Vail *et al.*, 1983) chez le ver à soie *Bombyx mori* (Himeno *et al.*, 1974) et chez les abeilles (Ribière *et al.*, 2010). De ce fait, ces virus ne semblent pas être de bons candidats pour la lutte biologique. Cependant, une étude a montré que l'association des baculovirus avec les *Iflavirus* augmentait leur infectiosité chez le lépidoptère *Spodoptera exigua* ainsi que leur stabilité dans l'environnement, grâce à leur co-inclusion avec les baculovirus (Jakubowska *et al.*, 2016).

En résumé :

Nous venons de voir que les études sur les virus entomopathogènes comme agent de biocontrôle ne sont pas toutes récentes, et que trop peu de mécanismes sont encore connus - tant sur l'interaction des virus avec l'intestin (virus-récepteur/ligand) que sur leur spécificité vis à vis d'autres espèces d'insectes. Il faut également considérer la stabilité des virus dans l'environnement pour pouvoir potentiellement les utiliser comme biopesticides. Les plus stables sont ceux possédant des corps d'inclusion, tels que les baculovirus ou les *Cypovirus*. D'autres virus entomopathogènes résistent très bien aux conditions environnementales de par leur simplicité même (capsid nue qui est en fait un corps d'inclusion basique). Parmi ces virus, il y a les densovirus qui ont un fort potentiel d'utilisation en tant que ACM.

Suite **Tableau IV**

Genus	Species	Virus/virus variants	Abbreviation	
<i>Copiparvovirus</i>	<i>Ungulate copiparvovirus 1</i>	<i>Bovine parvovirus 2</i>	BPV2	
	<i>Ungulate copiparvovirus 2</i>	<i>Porcine parvovirus 4</i>	PPV4	
<i>Dependoparvovirus</i>	<i>Adeno-associated dependoparvovirus A</i>	<i>Adeno-associated virus-1</i>	AAV1	
		<i>Adeno-associated virus-2</i>	AAV2	
		<i>Adeno-associated virus-3</i>	AAV3	
		<i>Adeno-associated virus-4</i>	AAV4	
		<i>Adeno-associated virus-6</i>	AAV6	
		<i>Adeno-associated virus-7</i>	AAV7	
		<i>Adeno-associated virus-8</i>	AAV8	
		<i>Adeno-associated virus-9</i>	AAV9	
		<i>Adeno-associated virus-10</i>	AAV10	
		<i>Adeno-associated virus-11</i>	AAV11	
		<i>Adeno-associated virus-12</i>	AAV12	
		<i>Adeno-associated virus-13</i>	AAV13	
		<i>Adeno-associated virus-S17</i>	AAVS17	
		<i>Adeno-associated virus-5</i>	AAV5	
		<i>Adeno-associated dependoparvovirus B</i>	<i>Bovine adeno-associated virus</i>	BAAV
			<i>Caprine adeno-associated virus</i>	CapAAV
		<i>Anseriform dependoparvovirus 1</i>	<i>Duck parvovirus</i>	DPV
	<i>Goose parvovirus-PT</i>		GPV2	
	<i>Avian dependoparvovirus 1</i>	<i>Goose parvovirus</i>	GPV	
		<i>Avian adeno-associated virus</i>	AAAV	
<i>Chiropteran dependoparvovirus 1</i>	<i>Bat adeno-associated virus</i>	BtAAV		
<i>Pinniped dependoparvovirus 1</i>	<i>California sea lion adeno-associated virus</i>	CsIAAV		
<i>Squamate dependoparvovirus 1</i>	<i>Snake adeno-associated virus</i>	SAAV		
<i>Erythroparvovirus</i>	<i>Primate erythroparvovirus 1</i>	<i>Human parvovirus B19-Au</i>	B19V-Au	
		<i>Human parvovirus B19-J35</i>	B19V-J35	
		<i>Human parvovirus B19-Wi</i>	B19V-Wi	
		<i>Human parvovirus B19-A6</i>	B19V-A6	
		<i>Human parvovirus B19-Lali</i>	B19V-Lali	
		<i>hHuman parvovirus B19-V9</i>	B19V-V9	
	<i>Human parvovirus B19-D91</i>	B19-D91		
	<i>Primate erythroparvovirus 2</i>	<i>Simian parvovirus</i>	SPV	
	<i>Primate erythroparvovirus 3</i>	<i>Rhesus macaque parvovirus</i>	RhMPV	
	<i>Primate erythroparvovirus 4</i>	<i>Pig-tailed macaque parvovirus</i>	PtMPV	
<i>Rodent erythroparvovirus 1</i>	<i>Chipmunk parvovirus</i>	ChpPV		
<i>Ungulate erythroparvovirus 1</i>	<i>Bovine parvovirus 3</i>	BPV3		

Dans la seconde partie de l'introduction, je présenterai le modèle d'étude d'interaction virus/insecte de notre équipe, qui nous permet d'évaluer le potentiel des densovirus, en particulier celui du *Junonia coenia densovirus* (JcDV), dans le cadre du biocontrôle des insectes ravageurs de culture.

II. Modèle d'étude des interactions virus-hôte chez l'insecte

Dans cette seconde partie d'introduction, je décrirai en détails notre modèle d'étude, entre le virus entomopathogène, JcDV, et l'insecte hôte, le lépidoptère ravageur de culture *Spodoptera frugiperda*.

1. Les densovirus

Les densovirus font partie de la famille des *Parvoviridae*. Ce sont des virus non-enveloppés à capsidie icosaédrique de 18 à 26 nm, contenant un génome à ADN simple brin, linéaire de 4-6 kb de long. (**Tableau III**) (Gosselin Grenet *et al.*, 2015). Ce sont donc de tout petits virus dont la famille se divise en deux sous-familles :

1. Les *Parvovirinae*, inféodés aux vertébrés, comportent 8 genres : les *Amdoparvovirus*, les *Aveparvovirus*, les *Bocaparvovirus* les *Copiparvovirus*, les *Dependoparvovirus*, les *Erythroparvovirus*, les *Protoparvovirus* et les *Tetraparvovirus* (**Tableau IV**). Les *Parvovirinae* les mieux connus sont les espèces l'Erythrovirus B19, responsable de pathologies chez les patients immunodéprimés et le fœtus, et les virus associés aux adénovirus (AAV), non pathogènes chez l'homme et utilisés comme vecteurs de thérapie génique (Naso *et al.*, 2017; de Souza *et al.*, 2018 ; Lykken *et al.*, 2018).
2. Les *Densovirinae* inféodés aux invertébrés, qui comptent à ce jour 21 espèces reconnues par l'ICTV et une cinquantaine de souches identifiées (François *et al.*, *in prep* ; Cotmore *et al.*, 2014; Tijssen *et al.*, 2016 ; ICTV 2018) (**Tableau V**).

Le premier densovirus, *Galleria mellonella densovirus* (GmDV autrefois nommé GmDNV) (Lavie *et al.*, 1965; Barwise and Walker, 1970) a été découvert en 1964 chez le lépidoptère *Galleria mellonella*, aussi nommée « fausse teigne » ou encore « papillon de la ruche » ou « Gallérie ». Cette dernière provoque des ravages dans les ruches des abeilles (*Apis mellifera* Linnaeus, abeilles à miel d'Europe ou *Apis cerana* Fabricius, abeilles à miel en Asie) en creusant des galeries de soie dans les rayons de cire, jusqu'à atteindre la nervure centrale (Kwadha *et al.*, 2017).

Depuis, des densovirus ont également été isolés à partir d'autres espèces de lépidoptères, des pucerons, des criquets, des blattes et des moustiques, mais également des crustacés comme les crevettes et plus récemment des échinodermes, lors d'une grande épizootie en Amérique du nord en 2013 qui a

Suite **Tableau IV**

Genus	Species	Virus/virus variants	Abbreviation
<i>Protoparvovirus</i>		<i>Feline parvovirus</i>	FPV
	<i>Carnivore protoparvovirus 1</i>	<i>Canine parvovirus</i>	CPV
		<i>Mink enteritis virus</i>	MEV
		<i>Raccoon parvovirus</i>	RaPV
	<i>Chiropteran protoparvovirus 1</i>	<i>Megabat bufavirus 1</i>	BtBuV1
	<i>Eulipotyphla protoparvovirus 1</i>	<i>Mpungu bufavirus</i>	ShBuV1
		<i>Bufavirus 1a</i>	BuPV1a
	<i>Primate protoparvovirus 1</i>	<i>Bufavirus 1b</i>	BuPV1b
		<i>Bufavirus 2</i>	BuPV2
	<i>Primate protoparvovirus 2</i>	<i>Wuharv parvovirus 1</i>	RhBuV1
	<i>Primate protoparvovirus 3</i>	<i>Cutavirus</i>	HCutaV1
		<i>H-1 parvovirus</i>	H1
		<i>Kilham rat virus</i>	KRV
		<i>Lull virus</i>	Lull
		<i>Minute virus of mice (prototype)</i>	MVMp
		<i>Minute virus of mice (immunosuppressive)</i>	MVMi
		<i>Minute virus of mice (Missouri)</i>	MVMm
		<i>Minute virus of mice (Cutter)</i>	MVMc
	<i>Rodent protoparvovirus 1</i>	<i>Mouse parvovirus 1</i>	MPV1
		<i>Mouse parvovirus 2</i>	MPV2
		<i>Mouse parvovirus 3</i>	MPV3
		<i>Mouse parvovirus 4</i>	MPV4
		<i>Mouse parvovirus 5</i>	MPV5
		<i>Hamster parvovirus</i>	HaPV
		<i>Tumor virus X</i>	TVX
		<i>Rat minute virus 1</i>	RMV1
		<i>Rat parvovirus 1</i>	RPV1
		<i>Rat bufavirus SY-2015</i>	RatBuV1
	<i>Ungulate protoparvovirus 1</i>	<i>Porcine parvovirus Kresse</i>	PPV-Kr
		<i>Porcine parvovirus NADL-2</i>	PPV- NADL2
<i>Ungulate protoparvovirus 2</i>	<i>Protoparvovirus Zsana/2013/HUN</i>	PBuV1	
<i>Tetraparvovirus</i>	<i>Chiropteran tetraparvovirus 1</i>	<i>Eidolon helvum (bat) parvovirus</i>	Ba-PARV4
		<i>Human parvovirus 4 G1</i>	PARV4G1
	<i>Primate tetraparvovirus 1</i>	<i>Human parvovirus 4 G2</i>	PARV4G2
		<i>Human parvovirus 4 G3</i>	PARV4G3
		<i>Chimpanzee parvovirus 4</i>	Ch-PARV4
	<i>Ungulate tetraparvovirus 1</i>	<i>Bovine hokovirus 1</i>	B-PARV4-1
		<i>Bovine hokovirus 2</i>	B-PARV4-2
	<i>Ungulate tetraparvovirus 2</i>	<i>Porcine hokovirus</i>	B-PARV4-1
	<i>Ungulate tetraparvovirus 3</i>	<i>Porcine Cn virus</i>	CnP-PARV4
	<i>Ungulate tetraparvovirus 4</i>	<i>Ovine hokovirus</i>	O-PARV4

fait disparaître plus d'un million d'étoiles de mer (Hewson *et al.*, 2014; Eisenlord *et al.*, 2016; Alavandi and Poornima, 2012; Dutilh *et al.*, 2017).

En ce qui concerne la possibilité d'utiliser des densovirus comme agents biopesticides, des essais sur le terrain visant à contrôler la pullulation de ravageurs ou vecteurs de maladie ont été réalisés par le passé pour plusieurs espèces d'insectes :

- *Galleria mellonella* densovirus (GmDV) contre *Galleria mellonella* par badigeonnage ou pulvérisation de broyat de larves infectées dans les ruches avec une pathogénicité dépendant de la densité de ravageurs (Lavie *et al.*, 1965).
- *Casphalia extranea* densovirus (CeDV) contre *Casphalia extranea*, un ravageur du palmier à huile et du cocotier. L'essai a été mené en Côte d'Ivoire en août 1985 avec 92% de mortalité du ravageur en 2 semaines à partir de 50 à 100 larves naturellement infectées dont le broyat dilué a été dispersé par hélicoptère (Fédière *et al.*, 1986 ; Fédière *et al.*, 2000).
- *Sibine fusca* densovirus (SfDV) contre *Sibine fusca*, un autre ravageur du palmier à huile également testé de manière « artisanale » en 1975 (Genty *et al.*, 1975 ; Meynadier *et al.*, 1977) sur un petit échantillon de larves puis en Colombie à plus grande échelle avec 100% de mortalité en 1 mois (Monsarrat *et al.*, 1984).

Le premier Densovirus spécifique des moustiques (« *Mosquito-specific densovirus* » MDV) a été découvert en 1972 en Russie, il s'agit de *Aedes aegypti* densovirus (AaeDV) (Lebedeva *et al.*, 1972). Les densovirus ont également été testés contre les moustiques vecteurs de maladie sur le terrain en Russie en 1987 (Buchatsky *et al.*, 1987) et un seul produit, le Viroden, a été commercialisé dans les années 90 (Vasil'eva *et al.*, 1990 ; Bawin *et al.*, 2015). Ce produit, non pathogène pour les vertébrés, s'est révélé efficace contre les larves de *Aedes aegypti*. Sa formulation est stable et résistante à différentes conditions (pH, température, ultra-violet (UV)) mais sa production à grande échelle n'a pas pu être menée à bien pour des raisons techniques de production (Becnel and White, 2007).

Dans les années 70, les technologies de séquençage ne permettaient pas d'interroger rapidement la présence d'un virus spécifique, son spectre d'hôte, son incidence et *a fortiori* son évolution. Il était peut-être trop tôt pour répandre du matériel biologique sur des champs infestés de ravageurs. Dans le même temps, le développement tous azimuts de pesticides de synthèse a mis de côté la recherche sur les biopesticides utilisant les ACMs.

Avant toute utilisation de pathogènes contre des ravageurs, il faut connaître entre autres la spécificité d'hôte du pathogène, les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'infection, la rentabilité de la production à grande échelle etc.

De plus, il paraît raisonnable de penser que la diversité des hôtes des densovirus est bien plus importante que ce que l'on en connaît actuellement. Depuis la découverte du premier virus (virus de la

Tableau V : Taxonomie de la famille des *Densovirinae* entomopathogènes (Cotmore et al., 2014 ; Tjissen et al., 2016 ; François et al., in prep ; ICTV 2018)

Family	Subfamily	Genus	Species	Virus/virus variants	Abbreviation
Parvoviridae	Densovirinae	Ambidensovirus	<i>Blattodean ambidensovirus 1</i>	<i>Periplaneta fuliginosa</i> densovirus	PfDV
			<i>Blattodean ambidensovirus 2</i>	<i>Blattella germanica</i> densovirus 1	BgDV1
			<i>Dipteran ambidensovirus 1</i>	<i>Culex pipiens</i> densovirus	CpDV
			<i>Hemipteran ambidensovirus 1</i>	<i>Planococcus citri</i> densovirus	PcDV
			<i>Orthopteran ambidensovirus 1</i>	<i>Acheta domesticus</i> densovirus	AdDV
			<i>Acheta domestica mini ambidensovirus</i>	<i>Acheta domestica mini ambidensovirus</i>	AdMADV
			<i>Diaphotrina citri</i> densovirus	<i>Diaphotrina citri</i> densovirus	DcDV
			<i>Solenopsis invicta ambidensovirus</i>	<i>Solenopsis invicta</i> densovirus	SiDV
			<i>Lepidopteran ambidensovirus 1</i>	<i>Diatraea saccharalis</i> densovirus	DsDV
				<i>Galleria mellonella</i> densovirus	GmDV
				<i>Helicoverpa armigera</i> densovirus	HaDV1
				<i>Junonia coenia</i> densovirus	JcDV
				<i>Mythimna loreyj</i> densovirus	MIDV
			<i>Pseudoplusia includes</i> densovirus	PiDV	
	Densovirinae	Brevidensovirus	Dipteran brevidensovirus 1	<i>Aedes aegypti</i> densovirus 1	AaeDV1
				<i>Aedes aegypti</i> densovirus 2	AaeDV2
				<i>Aedes albopictus</i> densovirus 1	AalDV1
				<i>Aedes albopictus</i> densovirus 4	AalDV4
				<i>Culex pipiens pallens</i> densovirus	CppDV
				<i>Anopheles gambiae</i> densovirus	AgDV
				<i>Aedes albopictus</i> densovirus 2	AalDV2
				<i>Aedes albopictus</i> densovirus 3	AalDV3
				<i>Haemagogus equinus</i> densovirus	HeDV
<i>Aedes Thailand</i> densovirus				AThDV	
<i>Aedes albopictus</i> densovirus 5				AalDV5	
<i>Aedes albopictus</i> densovirus 6				AalDV6	
<i>Toxorhynchites ambainensis</i> densovirus				TaDV	
Mosquito densovirus BR/07				MDV	
Densovirinae	Iteradensovirus	Lepidopteran iteradensovirus 1	<i>Bombyx mori</i> densovirus	BmDV	
			<i>Casphalia extranea</i> densovirus	CeDV	
			<i>Sibine fusca</i> densovirus	SfDV	
			<i>Danaus plexippus plexippus</i> densovirus	DppiDV	
			<i>Dendrolimus punctatus</i> densovirus	DpDV	
			<i>Papilio polyxenes</i> densovirus	PpDV	
			<i>Helicoverpa armigera</i> densovirus	HaDV2	
Unassigned	<i>Linville road virus</i>				

mosaïque du tabac) dans les années 1800 par Ivanoski et Beijerinck (Lecoq, 2001; Dutilh *et al.*, 2017), la découverte de nouveaux virus est en perpétuel essor. Avec la démocratisation du séquençage à haut débit, les études métagénomiques sans *a priori* ont considérablement augmenté nos connaissances sur la diversité des virus de manière générale, et des densovirus en particulier, permettant d'approfondir nos analyses sur leur histoire évolutive (Rosario and Breitbart, 2011; Alavandi and Poornima, 2012; François *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2018). Ainsi, des MDVs ont été isolés chez de nombreux moustiques tels que *A. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex pipiens* (*C. pipiens*), *Anopheles gambia* et *Anopheles sinensis* (Lebedeva *et al.*, 1972; Carlson *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013; Johnson and Rasgon, 2018) et il en reste sûrement encore à découvrir. Il n'est donc pas déraisonnable de penser que ces densovirus puissent dans les prochaines années pallier le manque d'insecticides efficaces.

D'après Cotmore *et al.* (2014), la notion d'espèce virale chez les parvovirus a été réadaptée. Désormais, la définition d'une espèce virale est basée sur la séquence conservée chez tous les *Parvoviridae* de la protéine de réplication NS1 (domaine hélicase SF3). Si deux virus montrent une différence d'identité de séquence de plus de 15% au niveau de cette protéine, alors ces virus sont considérés comme deux espèces à part entière. L'appartenance à deux genres différents nécessite une différence d'identité de séquence de plus de 30% au niveau de la protéine NS1.

Les *Densovirinae* se divisent en 5 genres : les *Ambidensovirus*, les *Brevidensovirus*, les *Iteradensovirus*, ces trois genres étant entomopathogènes (**Tableau V**), puis les *Hepadensovirus* et les *Penstyldensovirus* qui infectent les décapodes, plus particulièrement les crevettes (Cotmore *et al.*, 2014 ; Mendoza-Cano *et al.*, 2016 ; Tijssen *et al.*, 2016 ; ICTV 2018). La plupart des MDVs font partie du genre *Brevidensovirus*, excepté *C. pipiens* densovirus (CpDV) qui a été identifié comme appartenant au genre *Ambidensovirus* qui est le genre principal des Densovirus infectant les Lépidoptères (Jousset *et al.*, 2000; Baquerizo-Audiot *et al.*, 2009).

Les *Densovirinae* sont transmis à leurs hôtes par ingestion. Les *Ambidensovirus* et les *Brevidensovirus* ne se répliquent pas dans l'intestin (**Figure 2**) (Mutuel *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015; Kemmerer and Bonning, 2018), tandis que les *Iteradensovirus* se répliquent dans les entérocytes (Liu *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2013).

Nous savons que des Densovirus infectent plusieurs Ordres d'arthropodes (tels que les Diptères, les Lépidoptères, les Hémiptères etc.), les crustacés et plus récemment les échinodermes, ce qui nous amène à nous poser la question de la spécificité d'hôte des Densovirus. Nous savons que GmDV et SfDV sont spécifiques de leurs hôtes tandis que d'autres Densovirus peuvent être « généralistes » ou polyspécifiques, c'est à dire infectant des espèces différentes. C'est le cas de *Junonia coenia* densovirus (voir ci-dessous introduction 1.1) mais aussi pour *Mythimna loreyi* densovirus (MIDV) isolé en 1995 pour la première fois en Egypte (Fédière *et al.*, 1995) et infectant plusieurs espèces de Lépidoptères (*Mythimna loreyi*, *Spodoptera littoralis*, *Pectinophora gossypiella*, *Sesamia cretica*, *Chilo agamemnon*, et *Ostrinia nubilalis*) (Fédière, 1996, 2000).

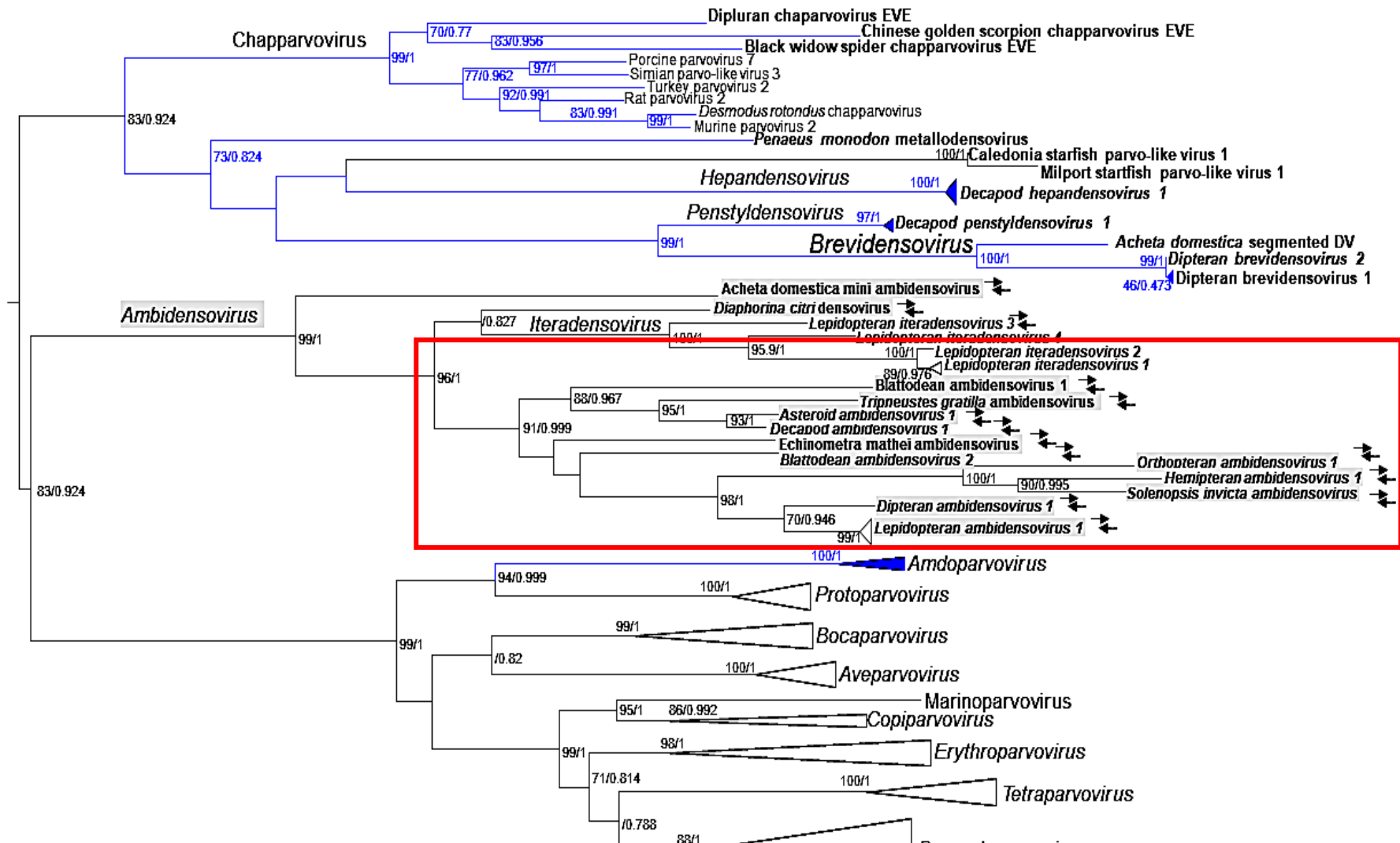


Figure 3 : Arbre phylogénétique des *Parvoviridae*, en particulier des *Ambidensovirus* (2018).

En gris et encadré en rouge, les espèces d'*Ambidensovirus*. La phylogénie est effectuée sur la séquence de la protéine structurale NS1 par une méthode basée sur le maximum de vraisemblance pour tester la topologie. $P > 0,7$; ALRT-SH : test de Shimodaira-Hasegawa correspondant au second chiffre. Le premier chiffre correspond aux ibootstrap (communication personnelle de Judith Pézses, PhD à l'Université de Floride).

1.1. *Junonia coenia* densovirus (JcDV)

Le variant JcDV a été découvert et isolé du lépidoptère *Junonia coenia* (Hübner, 1822 ; Papillon ocellé, en anglais *common Buckeye*) par Rivers and Longworth en 1972. Ce densovirus est un virus généraliste qui peut infecter plusieurs espèces de lépidoptères, notamment *Spodoptera littoralis*, *S. frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Mamestra brassicae*, *Junonia coenia*, et *Lymantria dispar* (Rivers&Longworth, 1972; Diallo, 1978 ; Longworth, 1978 ; Fédière, 2000 ; Bergoin & Tijssen, 2008; Mutuel *et al.*, 2010)

1.1.1. Structure et génome viral

JcDV fait partie du genre des *Ambidensovirus* qui comporte six espèces et onze variants et plus précisément du groupe *Lepidopteran ambidensovirus* et de l'espèce *Lepidopteran ambidensovirus 1* dont il est l'espèce type (**Tableau IV**) (**Figure 3**) (Gosselin Grenet *et al.*, 2015). C'est donc un virus non-enveloppé possédant une capsid de 22 nm icosaédrique avec une triangulation par face T=1, composée de 12 capsomères en pentamère pour un total de 60 protéines de capsid (**Figure 4A**) (Caspar and Klug, 1962). JcDV possède un génome ambisens à ADN simple brin linéaire de 6 kb environ codant pour trois protéines non structurales (NS1, NS2 et NS3) et quatre protéines structurales, les protéines de capsid (VP1, VP2, VP3 et VP4) (**Figure 4B**) (Marchal *et al.*, 2001; Bossin *et al.*, 2003; Bruemmer *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2013 ; Viswanathan *et al.*, 2015). Les quatre VP qui possèdent une partie C-terminale commune, sont présentes dans la capsid avec une stoechiométrie de 1 : 9 : 9 : 41 (VP1, 2, 3, 4), VP4 étant donc la protéine majoritaire de la capsid et la plus courte (Tijssen *et al.*, 1976 ; Tijssen and Kurstak, 1981 ; Bruemmer *et al.*, 2005).

Le génome viral est dit ambisens car composé de deux brins ayant des cadres de lectures ouverts (ORFs) opposés (Dumas *et al.*, 1992). Le brin dit « positif » code les protéines NS et les gènes sont localisés dans trois ORFs (ORF2, 3 et 4) (Wang *et al.*, 2013a). Leur rôle dans le cycle viral de JcDV est peu connu, avec seulement quelques données sur les activités ADN hélicase et nickase de NS1 (Ding *et al.*, 2002) et la participation de NS3 à la réplication virale (Abd-Alla *et al.*, 2004). Le brin dit « négatif » code les protéines VP dont les gènes se trouvent sur le même ORF, ORF1 (Shirk *et al.*, 2007). Par analogie de structure primaire, il a été montré une activité enzymatique phospholipase de type A₂ (PLA₂) portée par la protéine VP1, activité qui favoriserait l'introduction du génome viral dans le noyau cellulaire, comme cela a été montré pour les *Parvovirinae* (Zádori *et al.*, 2001). Ce motif PLA₂ se situe en N-terminal de VP1 chez JcDV, mais son rôle au cours du trafic cellulaire reste encore inconnu (Zádori *et al.*, 2001). *In silico*, des signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés pour toutes les VP et serviraient à l'importation de ces protéines vers le noyau de la cellule, notamment pour l'étape d'assemblage des particules virales (Owens, 2013).

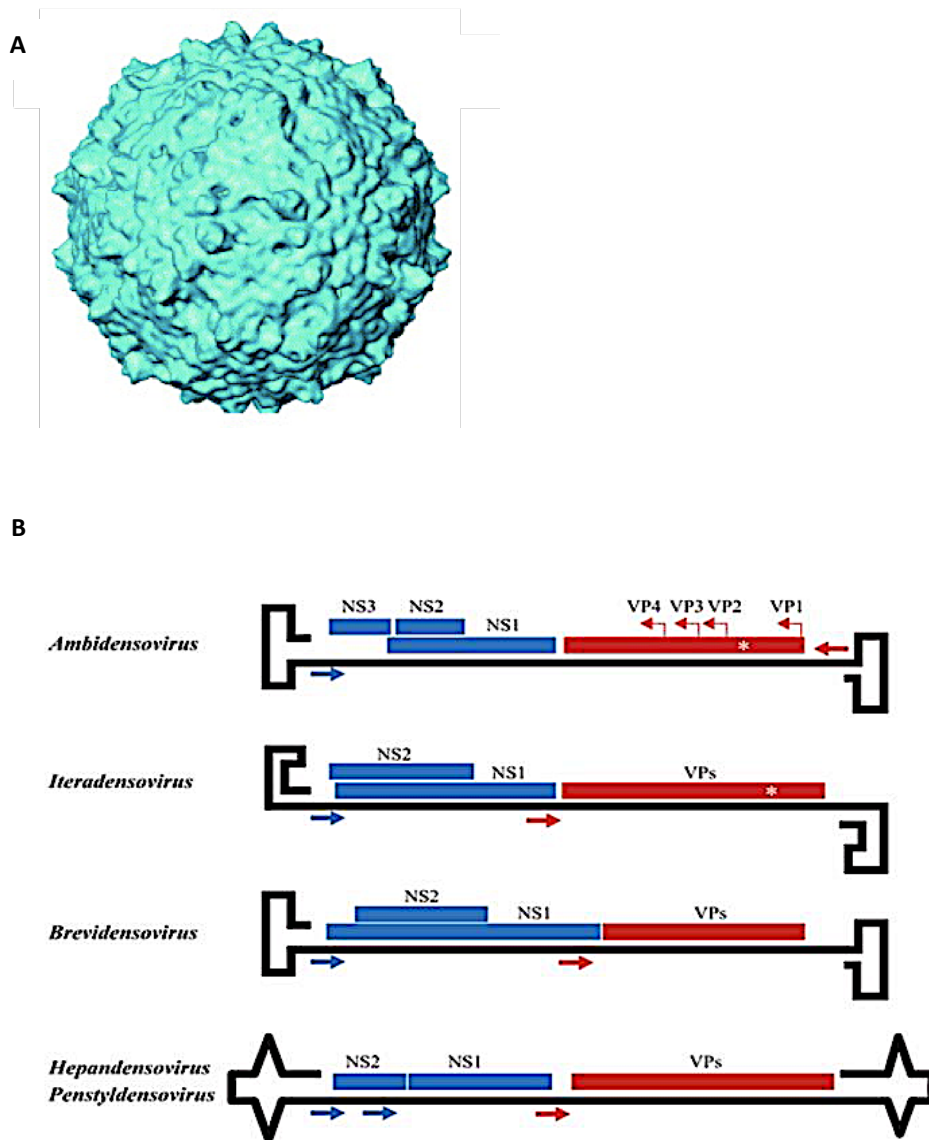


Figure 4 Structure et Organisation génomique des *Densovirinae* (Gosselin *et al.*, 2015 ; Cotmore, 2014 ; ICTV).

(A) Représentation de la capside de JcDV en cryo-microscopie électronique (cryo-ME). Elle est constituée de l'assemblage de 60 protéines de capsides (Bruemmer *et al.*, 2005) (B) Les *Densovirinae* sont composés de cinq genres. Les *Ambidensovirus* possèdent un génome ambisens, les *Iteradensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus* et *Penstyldensovirus* possèdent un génome monosens. Le génome viral des *Densovirinae* est un ADN sb de 3,7 à 6,3 kb dont les extrémités, répétitions terminales inversées (ITR), se replient en structure en épingle à cheveux servant d'amorce à la réplication virale. Les flèches représentent les promoteurs initiant la transcription des gènes codant les protéines non-structurales (NS, en bleu) et les protéines de capside (VP, en rouge).

1.2. Infection et entrée du virus in cellulo

Spodoptera frugiperda n'étant pas un organisme modèle, nous sommes limités dans la disponibilité des outils permettant de mieux comprendre les mécanismes de multiplication de JcDV. Néanmoins, le mécanisme d'entrée de JcDV dans les cellules a été étudiée *in cellulo* dans des cellules dites permissives issues d'une lignée ovarienne du lépidoptère *Lymantria dispar* (IPBL-Ld652) (Goodwin *et al.*, 1978; Li *et al.*, 1996a), dans laquelle la réplication du virus est possible. Il a également été étudié dans des cellules non-permissives à l'infection issues d'une lignée ovarienne de *Spodoptera frugiperda* (Sf9, ATCC CRL-1711) (Vaughn *et al.*, 1977). Dans cette dernière lignée, le virus peut entrer mais ne se réplique pas. *In cellulo*, il a été montré dans l'équipe que JcDV entrait par endocytose dépendante de la clathrine (Vendeville *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que des pseudo-particules virales (*Virus-Like Particules*, VLP) constituées de VP4 uniquement étaient capables également d'entrer par endocytose *in cellulo* (Vendeville *et al.*, 2009). Sachant que VP4 est la protéine de capsid majoritaire et la seule exposée à l'extérieur de la capsid, c'est probablement elle qui interagit avec le récepteur viral, qui reste à ce jour encore inconnu, présent à la surface des cellules *in cellulo* et *in vivo*.

In cellulo, après avoir interagi avec son récepteur, JcDV entre par endocytose dépendante de la clathrine, puis se retrouve dans des endosomes précoces (5-15 min) puis tardifs (15-30 min) qui s'accumulent autour du noyau jusqu'à 4 h post-infection (Vendeville *et al.*, 2009). Cette accumulation dans les endosomes peut-être liée à l'attente des virus avant l'entrée en phase S du cycle cellulaire; en effet, chez les *Parvovirinae*, il a été montré que ces virus étaient capables de stopper le cycle cellulaire à différents stades, mais dans l'incapacité de contrôler la cellule afin de la faire entrer en phase S (Chen and Qiu, 2010; Mosimann *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013). Une autre possibilité serait qu'une partie des particules virales reste bloquée à l'intérieur des endosomes tardifs et serait éliminée par le système lysosomal de la cellule ou encore utiliserait les endosomes de recyclage, comme AAV à MOI élevée (Ding *et al.*, 2006). Ensuite, l'acidification du pH des endosomes permettrait la libération du génome viral (Vendeville *et al.*, 2009). Le motif PLA₂ exposé au cours du trafic intracellulaire (*cf* 1.1.1 de l'introduction), faciliterait le passage du génome viral dans le noyau de la cellule (Zádori *et al.*, 2001; Suikkanen *et al.*, 2003). La multiplication virale débute 16 à 24 h environ après l'entrée du virus dans la cellule, mais les mécanismes de réplication de JcDV restent peu connus, contrairement à ceux des parvovirus de vertébrés. Cette multiplication engendre une modification phénotypique typique de la cellule, une augmentation de la taille des cellules ainsi qu'une densonucléose liée à l'accumulation des particules virales dans le noyau des cellules (Tijssen *et al.*, 1995 ; Abe *et al.*, 2000; Salasc *et al.*, 2016). Dans cette dernière étude réalisée par notre équipe, il a été montré que ce changement phénotypique cellulaire avait un coût énergétique pour la cellule et que cela activait des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie cellulaire (Sanlioglu *et al.*, 2000; Buchkovich *et al.*, 2008; Salasc *et al.*, 2016).

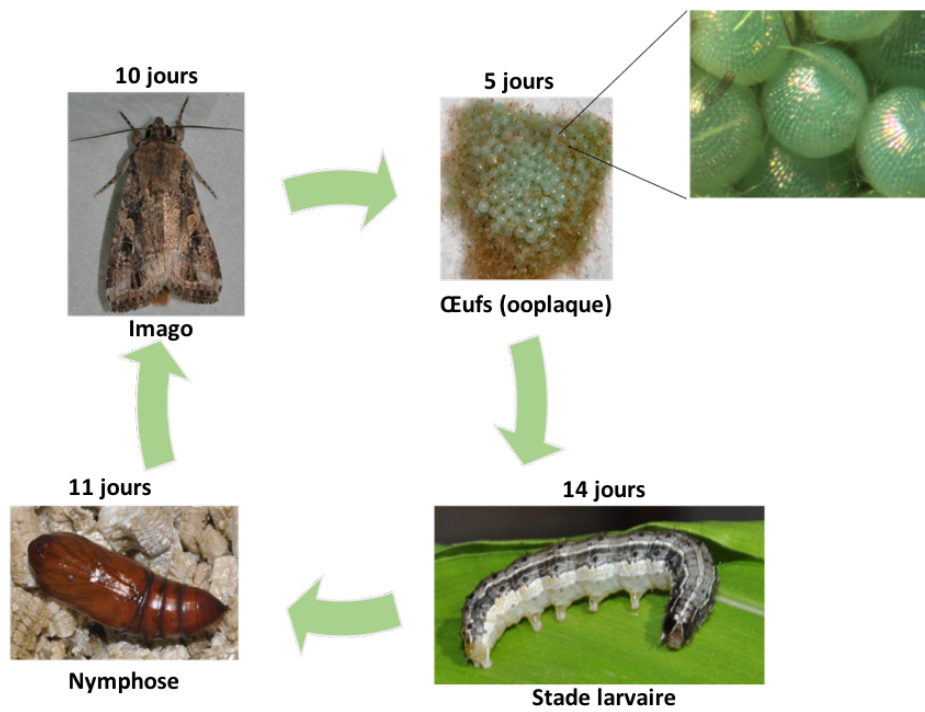


Figure 5 : Cycle de vie et phénotype de *S. frugiperda*

2. La légionnaire d'automne : *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (*S. frugiperda*) est nommée la légionnaire d'automne (« Fall ArmyWorm » FAM) car ses chenilles se déplacent en groupe, rangées tels de petits soldats. *S. frugiperda* fait partie de l'ordre des Lepidoptera, de la famille des Noctuidae et du genre *Spodoptera*. Le terme Lépidoptère signifie en grec « *lepidos* » pour écaille et « *pteros* » pour aile. D'après Kristensen *et al.* (2007), les lépidoptères comptent environ 160 000 espèces et 47 superfamilles (L. Capinera *et al.*, 2008), ce qui fait d'eux l'un des taxa de métazoaires les plus divers.

2.1. Le cycle de vie de *S. frugiperda*

Les papillons ont une durée de vie de 10 jours environ pendant lesquels ils se reproduisent et pondent leurs œufs sous forme d'œuf de 100 à 200 œufs pour un total de 1500 à 2000 œufs par femelle au cours de leur vie (**Figure 5**). Le stade œuf dure 5 jours pour faire éclore des larves. Ces larves vont subir 6 mues au cours du stade « chenille » avec une durée d'environ 14 jours au total. Lors du dernier stade larvaire, les chenilles mangent bien plus qu'aux autres stades afin de stocker des lipides (corps gras), pour se préparer à la métamorphose (nymphe) qui donnera une chrysalide dont la durée de vie est de 11 jours. A ce stade, et chez l'adulte (imago) également, nous pouvons distinguer les femelles des mâles phénotypiquement : la chrysalide des femelles est plus longue et fine que celle des mâles et présente des formes caractéristiques préfigurant les appendices génitaux. Après ces 11 jours, l'émergence des papillons survient et ces derniers reproduisent le même cycle de vie que leurs prédécesseurs. Les femelles sont plus grandes et leur abdomen est rond tandis que les mâles sont plus petits et leur abdomen plus pointu.

Dans des conditions climatiques optimales, c'est à dire en été lorsque la température avoisine les 30 degrés, et l'alimentation favorable à la reproduction et au développement larvaire, la durée totale de leur cycle de vie est de 30 jours mais peut atteindre entre 60 et 90 jours durant l'automne et l'hiver, dans des conditions plus défavorables¹³ (Spark, 1986; Johnson, 1987; Mitchell *et al.*, 1991).

2.2. *S. frugiperda*, un insecte phytophage et polyphage

L'alimentation des chenilles et celle des papillons sont différentes. Les imagos se nourrissent essentiellement de nectar (Krenn, 2010) tandis que les chenilles sont phytophages et sont défoliatrices car elles mangent essentiellement les feuilles des plantes. Ces chenilles sont retrouvées sur plusieurs espèces de plantes hôtes tel que la canne à sucre, le sorgho, le riz et le maïs (Pogue, 2002 ; Sparks,

¹³ http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm

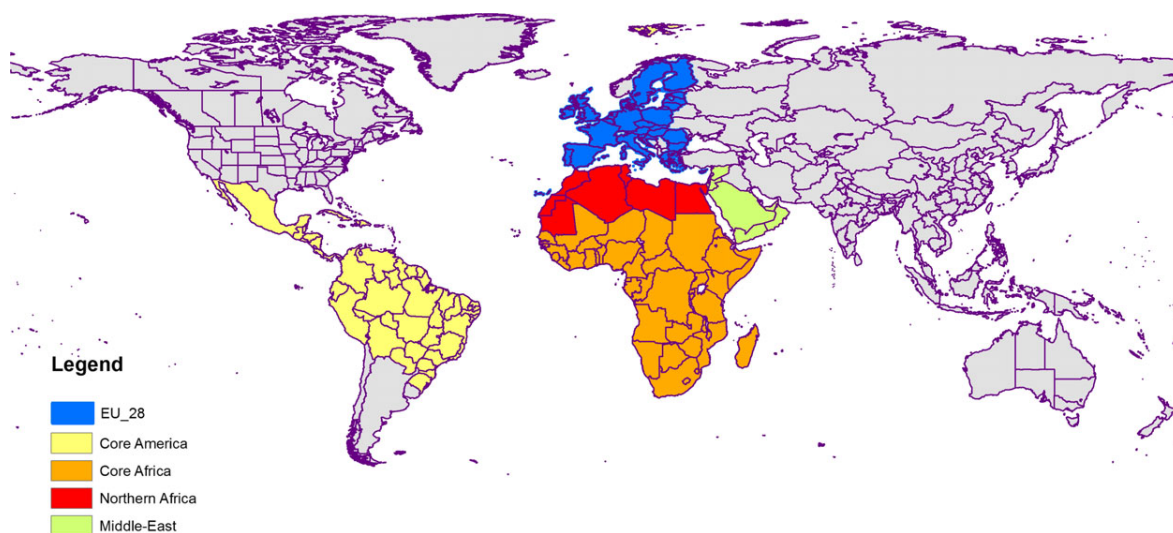


Figure 6 : Prédiction et actuelle répartition du ravageur de culture *S. frugiperda*.

L'EU_28 correspond à la zone potentielle d'invasion de ce ravageur en Europe. *S. frugiperda* est déjà présent en Afrique subsaharienne, et pourrait envahir l'Afrique du nord et le Moyen-Orient. Adapté du rapport de (Jeger et al., 2018).

1979). Donc *a priori*, ces chenilles pourraient se nourrir de toutes ces plantes, mais il a été montré que *S. frugiperda* était divisée en deux variants (Pashley, 1986) :

- Le variant riz, qui consomme essentiellement du riz, de la luzerne, du gazon et du chiendent lors des différents stades larvaires.
- Le variant maïs qui consomme essentiellement du maïs, du coton et du sorgho.

Cependant, une étude faite dans notre UMR par l'équipe d'Emmanuelle d'Alençon, a montré que ce ne sont pas deux variants mais bien deux espèces différentes (Dumas *et al.*, 2015). L'espèce avec laquelle nous avons travaillé est le « variant maïs » pour lequel les données de génomique (Gouin *et al.*, 2017) et de transcriptomique (Legeai *et al.*, 2014) sont plus complètes.

2.3. Répartition mondiale de *S. frugiperda*

S. frugiperda est majoritairement présent en Amérique centrale (Pashley *et al.*, 1985) et depuis 2016 en Afrique subsaharienne (**Figure 6**) (Goergen *et al.*, 2016; Cock *et al.*, 2017; Nagoshi *et al.*, 2018). *S. frugiperda* menace désormais de se répandre en Asie à partir de l'Inde où elle a été recensée¹⁴. Il a été demandé à l'Autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA) de réaliser une évaluation partielle des risques liés à *S. frugiperda* pour le territoire de l'UE, en se concentrant sur les principales voies d'entrée, les facteurs affectant l'établissement, les options de réduction des risques et la lutte antiparasitaire (Jeger *et al.*, 2018). Les prévisions faites par l'EFSA montrent que si aucun moyen n'est trouvé pour lutter efficacement contre ce ravageur de culture, *S. frugiperda* envahira l'Afrique du nord, l'Europe ainsi que le moyen-Orient (**Figure 6**). Il a été rapporté qu'au Brésil *S. frugiperda* est considéré comme le principal insecte nuisible pour le maïs, entraînant une réduction de 34% du rendement agricole (Lima *et al.*, 2010) et des pertes annuelles de 400 millions de dollars US (Figueiredo *et al.*, 2005).

Malgré les efforts réalisés pour trouver un moyen de lutte contre ce ravageur, aucun outil efficace n'est disponible actuellement. Les insecticides, l'utilisation d'ACMs (toxine Cry de Bt (Farias *et al.*, 2014)) ne sont plus efficaces car ces chenilles ont développé des mécanismes de résistances (*cf.* Préambule). Mais l'utilisation de virus entomopathogènes, tels que les baculovirus, serait un moyen de lutte biologique efficace face à ce ravageur de culture (Ferrelli *et al.*, 2018). Dans notre laboratoire, nous étudions le potentiel des densovirus en lutte biologique, en utilisant comme virus modèle le variant *Junonia coenia densovirus*.

2.4. Pathogénèse virale chez *S. frugiperda*

Comme tous les virus à transmission orale, les densovirus contenus dans la nourriture sont ingérés par l'insecte, puis atteignent le tractus intestinal par péristaltisme et pénètrent dans les cellules

¹⁴ <http://www.fao.org/news/story/fr/item/1148951/icode/>

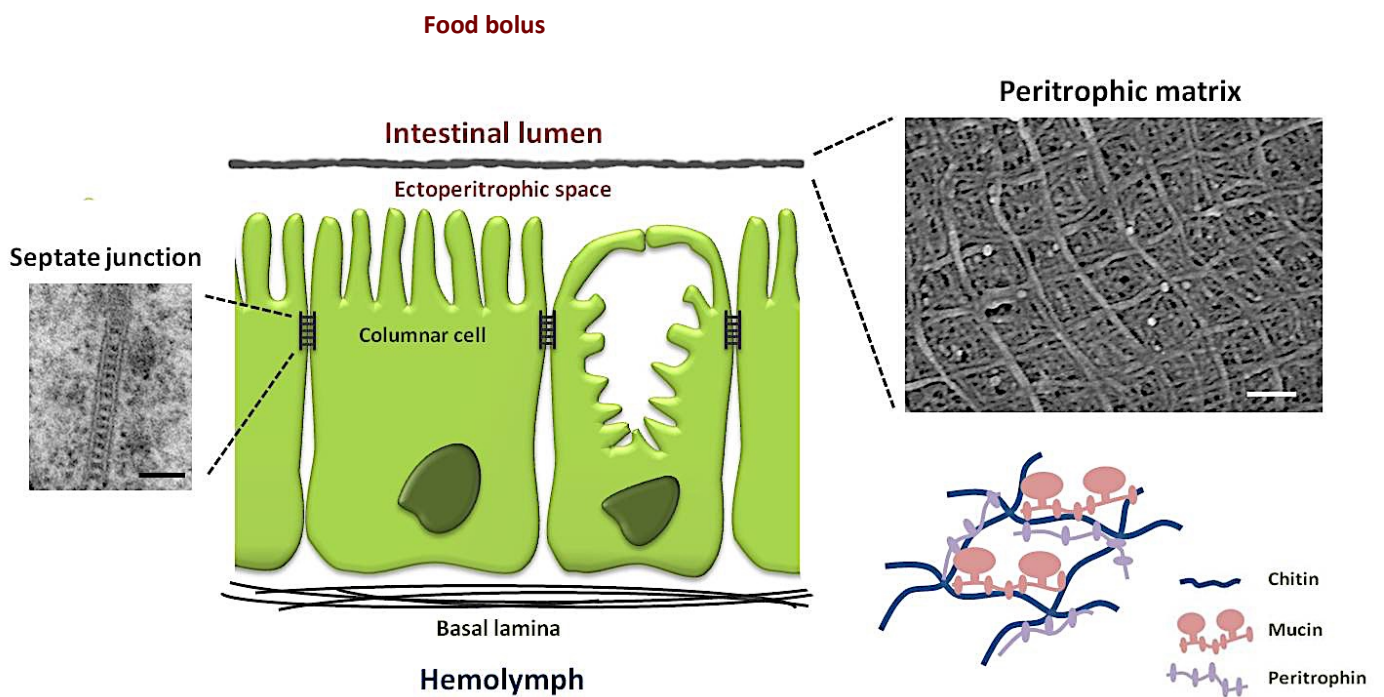


Figure 7 : La barrière intestinale du lépidoptère.

La barrière intestinale de l'insecte lépidoptère. L'épithélium est constitué de cellules jointes par des jonctions septées (à gauche, microscopie électronique en transmission [MET], M. Ravallec, barre 50 nm) et recouvert par une matrice péritrophique constituée d'un réseau de fibrilles de chitine associées avec des péritrophines de type mucines ou non (à droite, microscopie électronique à balayage [MEB], L. Pigeyre, barre 200 nm).

intestinales. Selon le densovirus considéré, il y a ou non répliation dans les cellules intestinales, puis les virus sortent des entérocytes, atteignent le compartiment intérieur de l'insecte (hémocoel) et les tissus cibles (hémocytes, trachées, corps gras, muscle, épiderme) pour se multiplier (hormis pour le BmDV (Ito *et al.*, 2013 ; Tomiya *et al.*, 2004).

Le franchissement de la barrière représente donc une étape clé de la pathogenèse virale qui permet d'initier l'infection et l'invasion de l'hôte (Bomsel and Alfsen, 2003; Wang *et al.*, 2013b).

2.4.1. Physiologie de l'intestin des insectes

L'intestin des insectes, et de *S. frugiperda* en particulier, est segmenté en trois parties d'origines embryonnaires (intestin antérieur, moyen et postérieur) et de fonctions physiologiques différentes. La particularité de l'intestin des insectes est qu'il est composé d'un épithélium monocouche (**Figure 7**) (van Dop and van den Brink, 2012; Franzetti *et al.*, 2014, 2016) contrairement à celui des vertébrés qui est composé d'un épithélium multicouches (De Santa Barbara *et al.*, 2003; Spence *et al.*, 2011).

L'intestin antérieur et postérieur de l'insecte ont tout deux une origine ectodermique et sont recouverts d'une cuticule les empêchant d'absorber les nutriments et d'être envahis par les pathogènes présents dans le bol alimentaire (Engel and Moran, 2013). Cette cuticule est composée de chitine et de glycoprotéines cuticulaires, comme l'exosquelette, et sépare la lumière de l'intestin des cellules intestinales. A chaque mue de l'insecte, cette cuticule est éliminée puis reformée.

Entre ces deux parties de l'intestin, il y a l'intestin moyen. Ce dernier a une origine endodermique et est dépourvu de cuticule. Ainsi, l'intestin moyen est le lieu principal de la digestion et de l'absorption des nutriments chez la plupart des insectes, et un lieu potentiel d'entrée pour de nombreux pathogènes.

2.4.1.1. La matrice péritrophique (MP)

Malgré l'absence de cuticule, pour protéger l'intestin moyen contre le passage de pathogènes et l'abrasion de l'épithélium par le bol alimentaire, l'intestin est recouvert d'une matrice appelé matrice péritrophique, qui entoure le bol alimentaire, qui est en quelque sorte l'équivalent du mucus chez les vertébrés (Bolognesi *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2008; Cohen and Moussian, 2016). Cette matrice est composée de microfibrilles de chitine (polymère de β -1,4-N-acétyl-D-glucosamine, GlcNAc) associées à des protéines glycosylées, principalement des péritrophines, qui sont caractéristiques de la MP (Wang and Granados, 1997; Terra, 2001; Sarauer *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Zhang and Guo, 2011; Lemaitre and Miguel-Aliaga, 2013). La chitine représente entre 3,7 et 12,9% de la totalité des constituants de la matrice péritrophique selon les espèces (Hegedus *et al.*, 2009), de ce fait elle n'est pas le constituant majoritaire mais a un rôle important dans le maintien de la structure de la MP. La chitine est synthétisée par la chitine synthase (CS), protéine transmembranaire, qui additionne les unités de GlcNAc. Cette chaîne de chitine s'associe sous forme de microfibrilles parallèles (β) et anti-parallèles (α) ou d'une combinaison des deux (Jang *et al.*, 2004), formant un maillage très résistant (Peters, 1992), observé en

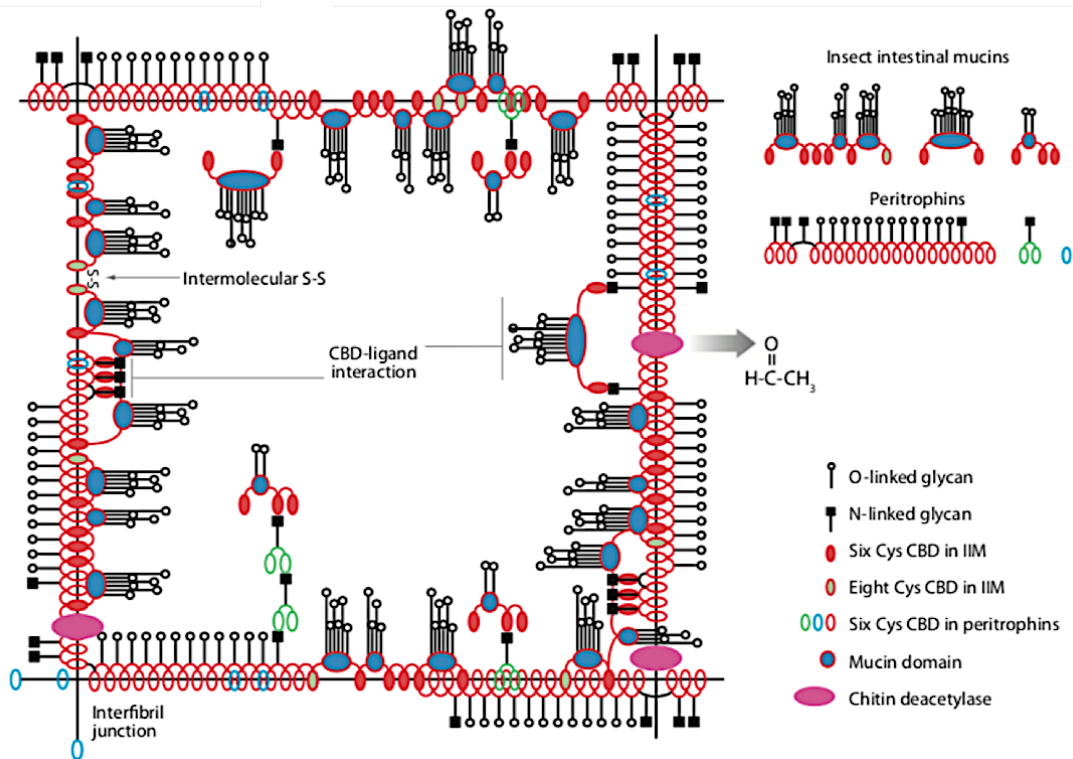


Figure 8 : Modèle d'architecture moléculaire de la MP de type I chez l'insecte.

(D'après Hegedus *et al.*, 2009). IIM : Invertebrate Intestinal Mucin.

microscopie électronique à balayage (Vandenborre *et al.*, 2011; Kawakita *et al.*, 2016). Dans l'intestin, la CS est codée par le gène *CHS-B* (Arakane *et al.*, 2005). Chez les lépidoptères, la CS de l'intestin moyen est exprimée seulement au chaque milieu de stade et est localisée à l'apex des microvillosités des cellules columnaires (Merzendorfer, 2006).

Les protéines, glycoprotéines et protéoglycannes, représentent environ 22 à 55% (Lehane, 1997; Tellam and Eisemann, 2000; Shi *et al.*, 2004). Elles sont acheminées depuis les cellules intestinales jusqu'à la MP par un mécanisme de sécrétion apocrine (Bolognesi *et al.*, 2001). Il existe quatre types de protéines de la MP : les protéines de type I et II sont des protéines faiblement associées à la MP, que l'on peut extraire avec des détergents doux ; les protéines de type III sont liées fortement à la MP et nécessitent donc de plus forts détergents ; ce sont les péritrophines. Les péritrophines contiennent des domaines de liaison à la chitine (CBD) possédant le motif général $CX_{15-17}CX_9CX_{12}CX_{6-7}$ (C : Cystéine, X : autre acide aminé). Il existe trois motifs contenant 6, 8 ou 10 cystéines nommés respectivement péritrophines à domaine A, B ou C. Il existe deux types de péritrophines, les mucines (appelées aussi *Intestinal invertebrate Mucin IIM*) qui sont hautement O-glycosylées et les non-mucines. Ces dernières sont tout de même appelées glycoprotéines car des sites de glycosylations putatifs liées à l'asparagine (N) sont présents mais leur degré et type de glycosylation différent de ceux des péritrophines de types mucine (Shi *et al.*, 2004; Hegedus *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2018). Les péritrophines de type IV ne peuvent pas être extraites car liées de façon covalente avec les autres protéines ou la chitine de la MP (Hegedus *et al.*, 2009).

La MP possède deux faces : la face endopéritrophique (côté bol alimentaire) et la face ectopéritrophique (microvillosité des entérocytes) (Kato *et al.*, 2008). La face endopéritrophique est donc en contact direct avec les pathogènes et le bol alimentaire contenant les enzymes digestives (Caldeira *et al.*, 2007), tandis que la face ectopéritrophique n'est pas en contact direct avec les cellules intestinales. En effet, il existe un espace entre les microvillosités des entérocytes et la face ectopéritrophique de la matrice, appelé espace interpéritrophique (Gringorten *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2018).

La matrice péritrophique peut être de deux types :

- La matrice péritrophique de type I (**Figure 8**): cette MP recouvre toute la longueur de l'intestin moyen de la plupart des insectes, notamment des Lépidoptères, mais aussi des Coléoptères et des Phasmes (Tellam *et al.*, 1999; Terra, 2001; Hegedus *et al.*, 2009). Elle est sécrétée par les cellules columnaires réparties le long de l'intestin moyen, souvent en réponse à l'ingestion et en fonction de l'alimentation et peut atteindre 1 μm d'épaisseur (Lehane, 1997).
- La matrice péritrophique de type II : elle est retrouvée chez certains Lépidoptères et chez les larves de moustiques (Wijffels *et al.*, 2001; Hegedus *et al.*, 2009). Elle est sécrétée de façon

continue par les cellules de la cardia, un tissu spécialisé de la partie antérieure de l'intestin moyen (Tellam *et al.*, 1999). Elle est plus organisée que celle de type I et constituée de plusieurs couches.

Il est intéressant de noter que de nombreuses espèces produisent différents types de MP aux différents stades de leur vie. Par exemple, les stades larvaires des moustiques produisent une MP de type II, tandis que les femelles adultes produisent une MP type I (Lehane, 1997). Certains insectes ne produisent pas de MP, comme beaucoup de Coléoptères, la plupart des Homoptères et certains Hyménoptères (Terra, 2001; Cook and Davidson, 2006), car leur alimentation n'apporte que des molécules de faible poids moléculaire.

La matrice péritrophique présente également des pores, de diamètre variable selon les insectes, qui permettent le passage des nutriments, mais empêchent celui des pathogènes (Ferreira *et al.*, 1994 ; V. Barbehenn and M. Martin, 1995; Edwards and Jacobs-Lorena, 2000; Barbehenn, 2001). Afin de mesurer le diamètre de ces pores chez l'insecte, une des méthodes utilisées chez les vertébrés pour étudier la perméabilité des matrices extracellulaire a été adaptée (Farquhar, 1991 ; van Haaren *et al.*, 2003). Cette méthode utilise des dextrans marqués ou des particules d'or de taille connue, ce qui permet la visualisation du passage de la MP (ou non) chez l'insecte, *in vivo*. Une autre méthode consiste à isoler la MP de l'épithélium intestinal, puis à la placer au centre d'un système reproduisant *ex vivo* les deux compartiments que sont la lumière de l'intestin et l'espace interpéritrophique (Berini *et al.*, 2018). Ce système se nomme la chambre de Ussing (Ussing and Zerahn, 1999). Le diamètre des pores n'est pas équivalent chez tous les Lépidoptères, il a été notamment rapporté chez les Lépidoptères *Orgyia leucostigma* et *O. pseudotsugata*, un diamètre de pore maximal de 25,6 nm et 21,3 nm, respectivement) (Barbehenn and Martin, 1995; Barbehenn, 2001). Une étude, utilisant la comparaison de la distribution granulométrique des enzymes digestives dans les espaces ecto- et endopéritrophiques, suggère que les pores de la MP de la chenille *S. frugiperda* ont un diamètre de 7,5 à 8 nm (Terra and Ferreira, 1994). Compte tenu de la taille d'exclusion de ces pores, les densovirus ne peuvent pas traverser passivement la MP.

2.4.1.2. L'espace interpéritrophique

Cet espace est une barrière complémentaire à la matrice péritrophique, car elle contient :

- Un mucus, autrefois appelé gel péritrophique (Terra, 2001), qui a la même fonction de protection que chez les vertébrés et contient également des péritrophines (Terra *et al.*, 1996; Caldeira *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2018). Cette couche de mucus était supposée absente des insectes, désormais elle est décrite chez plusieurs ordres d'insectes (Lépidoptères, Diptères) (Terra, 2001; Syed *et al.*, 2008). Le mucus a pour rôle de protéger les entérocytes de l'abrasion mécanique ou chimique. Dans notre modèle d'insecte, le lépidoptère *S. frugiperda*, le pH est alcalin (Dow, 1992; Terra and Ferreira, 1994) ; tandis que chez les diptères, le pH varie chez les moustiques femelles en fonction du contenu du bol alimentaire (pH acide avant puis basique après la prise de sang) (Nepomuceno *et al.*, 2017; Rivera-Ciprian *et al.*, 2017) ; et il est acide

- chez les hyménoptères (Cristofolletti *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011; Schünemann *et al.*, 2014). Ainsi, la couche de mucus protège l'épithélium intestinal contre ces différents pH afin de maintenir un pH neutre pour le fonctionnement optimal des enzymes interpéritrophiqes (Terra and Ferreira, 1994, 2012; Dias *et al.*, 2018).
- Un glycocalyx qui est une couche de glycannes à la surface des entérocytes, dont la fonction est la même que celle du mucus.

Ce qui différencie le mucus du glycocalyx est la composition en mucines. Le mucus est composé de mucines de type sécrété (libres dans le mucus) alors que le glycocalyx est composé de mucine non-sécrétées ou encore mucines transmembranaires à ancre Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) appelées *Glycocalyx-forming mucins* (Gxf-mucins) (Dias *et al.*, 2018).

2.4.1.3. L'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal des insectes est un épithélium monocouche constitué de trois types cellulaires principaux : les cellulaires columnaires sont les plus abondantes, semblables à celles des vertébrés, avec de longues microvillosités permettant une grande surface d'échange avec l'espace interpéritrophiq. Ce sont ces cellules qui synthétisent le GlcNac qui servira à la polymérisation de la chitine de la MP (Tellam *et al.*, 1999; Terra, 2001; Hegedus *et al.*, 2009).

Le second type cellulaire sont les cellules caliciformes, dites cellules « à mucus », qui possèdent des microvillosités différentes de celles des cellules columnaires, avec une cavité formée par une invagination de la membrane apicale de la cellule et occupant la majeure partie du volume de la cellule. Ces cellules ont pour fonction principale de réguler le pH intestinal de l'insecte grâce à l'activité de pompe à ions d'une V-ATPase permettant le transport des ions alcalins (tels que le potassium) vers le bol alimentaire (Dow, 1992 ; Terra *et al.*, 2006; Gosselin Grenet *et al.*, 2015). Enfin le troisième type cellulaire est constitué des cellules souches qui permettent le renouvellement des deux autres types cellulaires.

L'épithélium intestinal sépare donc le compartiment luminal de l'intestin (compartiment extérieur) du compartiment intérieur de l'insecte, l'hémolymphe, dans lequel baignent les hémocytes (les cellules immunitaires) (Ribeiro and Brehélin, 2006) et les autres tissus de l'organisme, notamment les tubes de malpighi¹⁵ qui assurent l'osmorégulation et l'excrétion des déchets, le corps gras qui est impliqué dans de multiples fonctions telles que la réserve d'énergie pour le passage des mues, la synthèse des lipides nécessaires à la reproduction et la production de la plupart des peptides anti-bactériens (Arrese and Soulages, 2010), ainsi que les trachées qui constituent le système respiratoire des

¹⁵ <https://www7.inra.fr/opie-insectes/pdf/i165maquart.pdf>

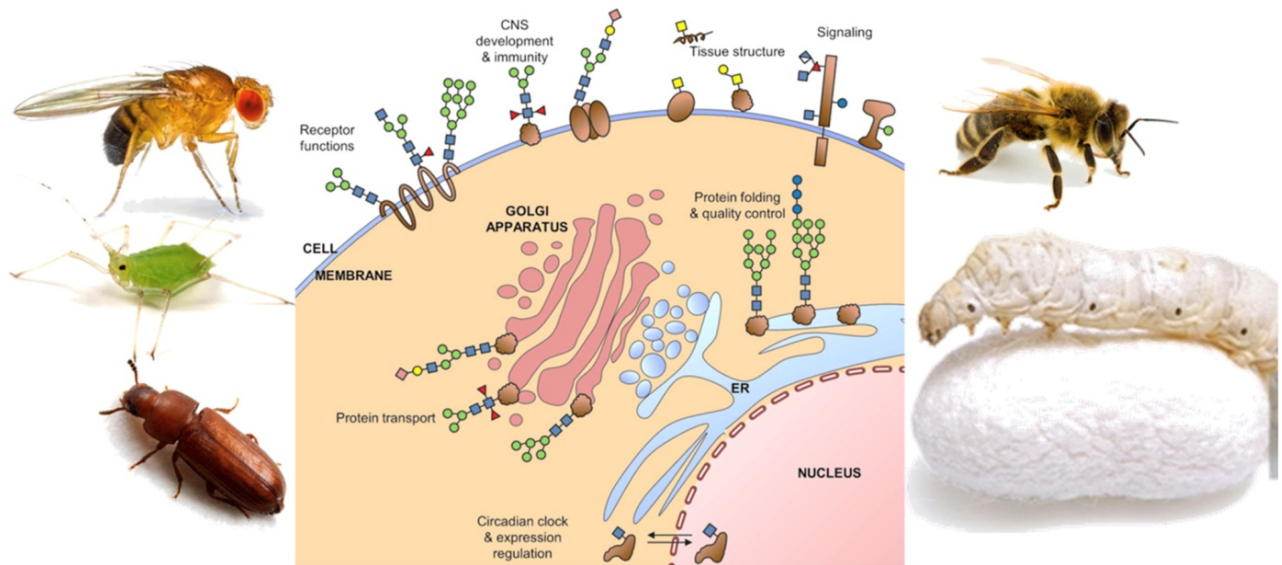


Figure 9 : Rôles de la glycosylation dans les processus cellulaires et physiologiques.

La glycosylation s'avère cruciale pour le repliement des protéines, la stabilité et la localisation subcellulaire, ainsi que pour les interactions protéine-protéine, la reconnaissance et la signalisation. La glycosylation des protéines est impliquée dans de nombreux processus physiologiques, notamment le développement embryonnaire, la croissance, les rythmes circadiens, l'ancrage des cellules ainsi que le maintien de la structure tissulaire, l'immunité et la fertilité (Walski *et al.*, 2017).

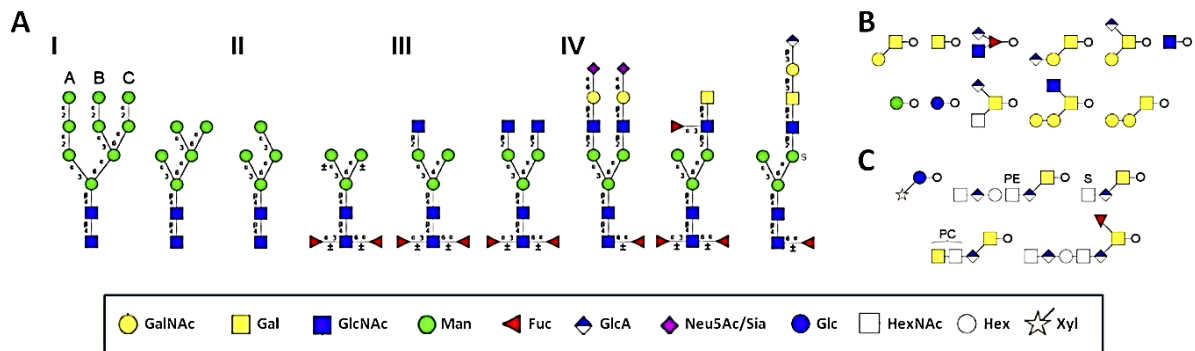


Figure 10 : Diversité des N-glycannes (A) et des O-glycannes (B, C) chez les insectes.

(A) (I) Glycannes oligomannosylés (5 à 9 résidus de mannose) ; (II) Paucimannose contenant moins de cinq mannoses, un ou deux fucoses sur le chitobiose et aucun GlcNAc terminal ; (III) Glycannes complexes avec des résidus de GlcNAc terminaux; (IV) Glycannes complexes rares avec diverses modifications terminales, notamment la présence d'acide sialique n'a pas été fermement identifiée chez l'insecte. (B) O-glycannes majeurs identifiés dans les embryons de drosophiles. (C) O-glycannes moins communs identifiés dans les larves de drosophiles, de moustiques ou dans les cellules de lépidoptères Sf9 et Hi-5 (D'après Walski *et al.*, 2017).

insectes (Engelhard *et al.*, 1994).

Cet épithélium est maintenu par des jonctions septées, l'équivalent des jonctions serrées chez les vertébrés, qui assurent l'étanchéité du tissu (Izumi *et al.*, 2012, 2016; Izumi and Furuse, 2014). Il constitue donc en soi une barrière entre l'extérieur et l'intérieur de l'insecte, même si certains pathogènes peuvent perturber cette étanchéité (Wang *et al.*, 2013; Torres-Flores and Arias, 2015).

2.4.1.4. Glycosylation chez l'insecte

Nous venons de voir que la barrière intestinale des insectes est riche en glycannes que ce soit sur la matrice péritrophique et dans l'espace interpéritrophique, mais également sur la membrane plasmique de l'épithélium intestinal. La glycosylation est une modification post-traductionnelle importante des protéines. Les glycannes ajoutés à la structure de la protéine peuvent changer sa charge (positive, négative ou neutre), sa structure secondaire, ses propriétés physico-chimiques (Lee *et al.*, 2015; Staudacher, 2015); ce qui lui confère des rôles dans plusieurs processus cellulaires (signalisation cellulaire ou attachement, sécrétion, activité enzymatique) (Stanley *et al.*, 2009; Varki, 2017) (**Figure 9**).

Les deux formes de glycosylation des protéines les plus étudiées sont la N-glycosylation et la O-glycosylation de type mucine (**Figures 9 et 10**). Néanmoins, de nombreuses autres formes de glycosylation co-existent telles que les glycosaminoglycannes (GAG), la O-fucosylation (O-Fuc), la O-mannosylation (O-Man) ou la O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc).

- La N-glycosylation substitue un résidu d'asparagine (Asn) sur une séquence consensus Asn-X-Ser/Thr d'un polypeptide en cours de biosynthèse dans laquelle X est différent de la Proline (Stanley *et al.*, 2009; Walski *et al.*, 2017). Chez la majorité des eucaryotes, la N-Glycosylation commence en même temps que la traduction dans le réticulum endoplasmique granuleux (REG) par la synthèse sur un accepteur dolichol pyrophosphate et le transfert en bloc d'un oligosaccharide de structure $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, à la protéine naissante (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Cette séquence oligosaccharidique peut néanmoins différer chez un certain nombre d'eucaryotes, en particulier unicellulaires (Samuelson *et al.*, 2005). La maturation de cette séquence consensuelle se poursuit dans le REG puis dans le Golgi, où une succession de monosaccharides peuvent être otés ou ajoutés à la structure par des glycosidases et des glycosyltransférases, formant des glycoprotéines dont la « décoration » glucidique est parfois complexe et longue. Cette modification s'effectue le plus souvent sur des protéines possédant en N-terminal le peptide signal qui leur permet d'accéder à la lumière du réticulum.
- La O-glycosylation de type mucine est constitué d'un grand nombre de glycannes ayant pour seul dénominateur commun leur liaison sur un résidu de Sérine ou une Thréonine *via* un résidu de GalNAc. La chaîne glucidique naissante peut être modifiée, dans le Golgi, de la même façon que pour les protéines N-Glycosylées par l'addition séquentiel d'un grand nombre de monosaccharides (Aoki *et al.*, 2008; Gaunitz *et al.*, 2013; Walski *et al.*, 2017). Il faut noter

toutefois qu'il existe une O-glycosylation particulière, connue aussi sous le nom de O-GlcNAcylation strictement nucléo-cytoplasmique. Il s'agit de la fixation, réversible et dynamique, d'un résidu unique de O-GlcNAc ajouté sur des sérines ou thréonine par une O-GlcNAc transférase (OGT) et retiré par une O-GlcNAcase. De nombreuses protéines cellulaires ou virales, y compris la protéine de tégument du baculovirus, peuvent être la cible de cette modification (Hart and Akimoto, 2009).

Bien que les principes généraux de la glycosylation soient similaires chez la majorité des organismes eucaryotes, les insectes synthétisent un répertoire de structures de glycannes distinct de celui des plantes et des vertébrés (**Figure 10**). Les glycannes d'insectes sont composés principalement de huit monosaccharides : fucose (Fuc), galactose (Gal), glucose (Glc), N-acétylgalactosamine, (GalNAc), N-acétylglucosamine (GlcNAc), acide glucuronique (GlcA), mannose (Man), xylose (Xyl) qui peuvent être assemblés en une centaine de structures différentes, et parfois complexes (**Figure 10**). À ce jour, la plupart des données sur la glycobiologie des insectes proviennent de la recherche sur la drosophile *Drosophila melanogaster*. Cependant, on dispose de plus en plus d'informations sur les structures des glycannes et sur l'importance de la glycosylation chez d'autres insectes, tels que les coléoptères, les lépidoptères, les abeilles et les pucerons (pour revue voir Walski, 2017).

- Chez *Drosophila melanogaster*, on sait que près de 90% des protéines O-glycosylées sont de type mucine, avec un GalNAc directement lié à une Sérine ou une Thréonine (Aoki *et al.*, 2008; Walski *et al.*, 2017).
- Chez les Lépidoptères, dont on connaît l'intérêt des lignées cellulaires en biotechnologie (Cousserans *et al.*, 2013), les travaux ont permis de définir quelques points spécifiques de la N-glycosylation des protéines d'insecte ; notamment une structure paucimannosidique Man1-3GlcNAc β (1, 4)GlcNAc-Asn, avec ou sans fucosylation en α (1, 6) ou α (1, 3). Il convient de noter aussi que la relative pauvreté des cellules d'insecte en équipement enzymatique approprié explique la rareté des glycoprotéines sialylées (Marchal *et al.*, 2001; Tomiya *et al.*, 2004).

2.4.1.5. La glycosylation, un des leviers de l'immunité

L'immunité de l'insecte est basée sur plusieurs systèmes complexes. Des travaux récents ont révélé les mécanismes sous-jacents à une immunité adaptative basée, non pas sur des protéines comme chez les vertébrés, mais bien sur l'ARN interférence (Tassetto *et al.*, 2017). Il n'en reste pas moins que ces mécanismes, globalement régis par les mêmes mécanismes de reconnaissance que l'immunité adaptative des vertébrés, ne concernent pas les agents infectieux présents dans l'intestin. Dans cet organe, de nombreux *pattern-recognition receptors* (PRR) servent de senseurs de la présence de *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Au sein de la pléthore de PRRs spécifiques de l'une et/ou l'autre des étiquettes infectieuses, les virus seraient plutôt reconnus par des lectines, en particulier des lectines de type-C (C-type lectins). Les lectines sont des protéines qui se lient spécifiquement et de

manière réversible aux glycanes (Cecioni *et al.*, 2015). Elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques (la communication cellulaire, la signalisation cellulaire, la reconnaissance des pathogènes (Bishop and Gagneux, 2007 Hilgard and Stockert, 2000; Lee and Lobigs, 2008; Kim *et al.*, 2017; Dam and Brewer, 2010). Les premières lectines ont été découvertes chez les plantes par P. Hermann Stillmark en 1888 qui a observé que des extraits des graines de ricin (*Ricinus communis*) contenaient une protéine (la toxine de la plante) capable d'hémagglutiner les globules rouge des mammifères, c'est pourquoi leur premier appellation était « agglutinines » (Varki *et al.*, 2009). Depuis, les lectines ont été identifiées et caractérisées également chez les animaux (vertébrés et invertébrés) et microorganismes (aussi appelées adhésines chez les bactéries) (Varki *et al.*, 2009 ; Nizet *et al.*, 2015 ; Pees *et al.*, 2016). La plupart des lectines contiennent des domaines de reconnaissance des carbohydrates (*carbohydrate recognition domain* CRD) conservés (Varki *et al.*, 2009). Il existe chez les lectines de plantes 7 familles de protéines qui sont classées selon leur structure et leur évolution : lectines se liant à la chitine avec un domaine *hevein*, lectines du phloème des Cucurbitaceae, lectines des légumineuses, lectines se liant au mannose des monocotylédones, lectines de types jacaline (non légumineuse), la famille des amaranthines et les protéines ribosomales inactivées de type 2 (Coelho, 2014). La famille des lectines des légumineuses est la plus étudiée et caractérisée. Chez la plante, les lectines sont impliquées notamment dans la régulation cellulaire (Jiang *et al.*, 2006), dans la symbiose de la plante avec des microorganismes (Limpens and Bisseling, 2003), dans les mécanismes de défense de la plante et peuvent être utilisées comme insecticides (Lucena *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2015).

Chez les vertébrés, les lectines étaient séparées en deux classes selon leur localisation : les lectines membranaires ou les lectines solubles, mais certaines peuvent avoir les deux localisations (Barondes, 1984). Toutefois (Gabius, 1997) divise les lectines en 5 groupes selon leur structure : les lectines de type-C, les lectines de type-I, les galectines (ou lectines de type-S), les pentranxines et les lectines de type-P.

Les lectines sont également présentes chez les microorganismes et y jouent plusieurs rôles : interaction avec la cellule hôte, l'adhésion, la phagocytose, la reconnaissance dans des processus immunologiques (Ponchel and Irache, 1998). La première lectine isolée dans les années 1950 et la plus étudiée chez les microorganismes se trouve sur l'enveloppe du virus de la grippe et appelée hémagglutinine (HA) (Chen and Li, 2013). D'autres lectines virales ont été découvertes par la suite et servent également de point d'ancrage des virus sur leurs cellules hôtes, tels que l'*hemagglutinin-esterase* (HE) du coronavirus sérotype 2a (Zeng *et al.*, 2008), la galectine de l'adénovirus de type 4 du porc (Guardado-Calvo *et al.*, 2010).

80 lectines des champignons et moisissures ont été recensées en 2014 (Kobayashi and Kawagishi, 2014).

Enfin les bactéries possèdent des lectines solubles ou non, telle que *Pseudomonas aeruginosa* qui sécrète deux lectines solubles, LecA et LecB, qui jouent un rôle dans l'adhésion de la bactérie à sa

cellule hôte (Chemani *et al.*, 2009). Les lectines non-solubles se retrouvent à la surface de la bactérie, au niveau des pili (Day *et al.*, 2017) et des fimbriae (Sokurenko *et al.*, 1997).

Chez les invertébrés les trois familles de lectines les plus décrites sont les galectines, les pantraxines et les lectines de type-C, distinguées selon leur CRD. Là encore, ces lectines sont impliquées dans des processus biologiques vus précédemment chez d'autres organismes (Vasta *et al.*, 2004).

Cependant, à ce jour il n'y a pas de classification unique et universelle des lectines. Dans ce chapitre de livre (Vasta *et al.*, 2004), les auteurs nous proposent une classification selon les homologies de séquences ou l'évolution des lectines, toutes espèces végétales, animales ou micro-organismes confondus.

La particularité des lectines de type-C (CTL) est que ce sont des protéines pouvant effectuer un pontage entre deux glycannes. Ces lectines sont des protéines solubles et/ou membranaires contenant des domaines de reconnaissance des carbohydrates (*carbohydrate recognition domain* CRD) conservés et dépendant du calcium (Pees *et al.*, 2016). A noter que ce domaine est également retrouvé chez des protéines ne se liant pas au glycannes et/ou indépendante du calcium.

Cette très récente et très complète revue de (Xia *et al.*, 2018) présente en particulier les lectines qui chez 10 lépidoptères, dont *Bombyx mori* et *Manduca sexta*, reconnaissent et généralement inhibent l'infection de l'insecte, par des bactéries essentiellement. La fonction des CTLs chez l'insecte n'est pas aisée à étudier et définir puisque chez l'insecte il est parfois difficile – voire impossible - d'utiliser la technique de l'ARN interférence (RNAi) ; toutefois la technique d'oblitération génique par le système utilisant CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) et l'endonucléase à guide ARN Cas9 (CRISPR-Cas 9) commence à se développer dans ce champ d'application et serait intéressante à utiliser dans le cas de *S. frugiperda* qui s'est jusqu'à présent montrée réfractaire aux techniques d'oblitération destinées à la génomique fonctionnelle. Seuls les moustiques ont fait l'objet d'études sur le rôle antiviral des lectines dont, de façon étonnante, l'activité est souvent détournée pour faciliter l'infection du diptère par les arbovirus (Cheng *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014, 2017; Adelman and Myles, 2018). Bien que l'activité lectine soit documentée surtout envers les protéines d'enveloppe virales – glycosylées – et bien que les protéines structurales des *Parvoviridae* n'aient pas été formellement identifiées comme des cibles de glycosylation (Murray *et al.*, 2006), nous ne pouvons pas négliger une possible interaction lectine/virus au niveau de la barrière intestinale.

2.4.1.6. Interactions virus/récepteurs à la surface cellulaire de l'insecte

Nous savons que de nombreux pathogènes se fixent aux glycannes des protéines glycosylées à la surface des cellules (**Figure 9**) (Bella *et al.*, 1998; Bobardt *et al.*, 2004; Bhella, 2015). Ces interactions ligands/récepteurs se retrouvent souvent localisées au niveau de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (Rosenberger *et al.*, 2000; Alonso and Millán, 2001; Zhuang *et al.*, 2002; Bayyareddy *et al.*, 2012). Ces derniers sont caractérisés par leur forte concentration en cholestérol, en sphingolipides,

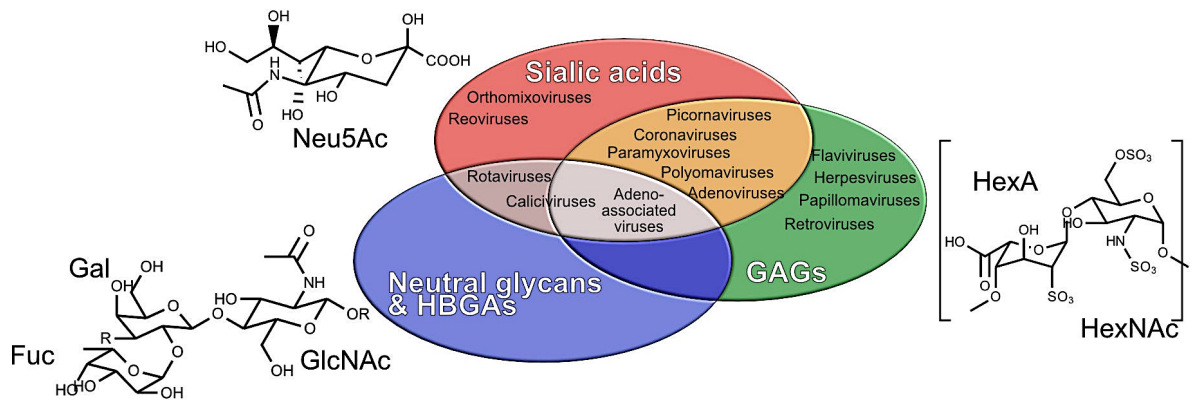


Figure 11 : Les glycanes en tant que récepteurs de virus.

Des variants de l'acide sialique spécifiques à l'hôte et aux cellules (en haut à droite), des oligosaccharides neutres tels que les antigènes de groupe sanguin (HBGA) (en bas à droite) et des glycosaminoglycanes (GAG) (à gauche) sont utilisés comme récepteurs par beaucoup de virus. Des exemples de familles de virus dont les membres sont connus pour interagir avec un ou plusieurs types de glycanes sont indiqués dans les ellipses qui se chevauchent du diagramme de Venn (adapté de (Stroh, 2014).

en cavéoline et flottiline, en récepteurs membranaires tels que les récepteurs à ancrés-GPI et récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Biochimiquement, ils sont insolubles dans le triton X100, c'est pourquoi ces domaines sont appelés MRD (Membrane Résistantes aux Détergents) (Manié *et al.*, 2000; Bayyareddy *et al.*, 2012). Une fois le pathogène lié à son récepteur au sein des radeaux lipidiques, un mécanisme d'endocytose se met en place, qui lui permet d'initier son cycle de multiplication ou de traverser l'épithélium par transcytose (Bella *et al.*, 1998; Bobardt *et al.*, 2004; Bhella, 2015). Il a été rapporté que des Aminopeptidases, qui sont des glycoprotéines membranaires, sont des récepteurs des toxines Cry de *Bacillus thuringiensis* et sont localisées dans les radeaux lipidiques de l'intestin moyen chez deux lépidoptères (Zhuang *et al.*, 2002; Bayyareddy *et al.*, 2012).

Plusieurs virus enveloppés et non enveloppés utilisent des protéines glycosylées comme molécules de liaison, d'attachement à la surface de la cellule, comme co-récepteur ou bien comme primo-récepteur (**Figure 11**).

Chez les vertébrés, le virus enveloppé le plus étudié se liant à un récepteur glycosylé est le virus Influenza A (Raman *et al.*, 2016). Comme celui-ci, de nombreuses particules virales interagissent avec un acide sialique porté par une glycoprotéine ; c'est le cas des Réovirus, des Adénovirus et des Rotavirus (Varki, 2009, 2017; Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014). Les glycannes de la surface cellulaire interviennent dans la liaison de façon subtilement différente selon les virus. Influenza virus, par exemple, mobilise l'acide sialique grâce à la protéine virale d'enveloppe Hémagglutinine (HA), liaison qui s'établit aussi bien avec les virions néoformés dont la libération nécessite l'activité de la Neuraminidase (NA) ancrée elle aussi dans l'enveloppe virale (Varki, 2009). Les glycosaminoglycannes (GAGs) sont utilisés comme facteur d'attachement également, chez plusieurs Flavivirus (les virus de la Dengue, DENV, le virus du Nil occidental, WNV ; le virus Zika, ZIKV) (Hilgard and Stockert, 2000; Lee and Lobigs, 2008; Kim *et al.*, 2017). Chez les *Parvovirinae* les glycannes sont bien documentés également en tant que récepteurs (Huang *et al.*, 2014). La majorité des *Parvovirinae* se lient directement à l'acide sialique (les virus adéno-associés (AAV) 1, 4 et 5, le *Minute virus of mice* (MVM), les bocavirus (BPV), le H-1 *parvovirus* (H-1PV), le *Canine parvovirus* (CPV), le *Feline panleukopenia virus* (FPV) et le *Porcine parvovirus* (PPV)) d'autres mobilisant des protéoglycannes de type héparane-sulfate (les AAVs 2, 3b, 6 et 13) (Huang *et al.*, 2014).

Il convient de souligner que les mécanismes récepteurs des arbovirus précédemment cités ont été caractérisés essentiellement pour des cellules et organismes vertébrés, voire mammifères, peu de travaux ayant été réalisés par le passé sur les processus d'infection des arthropodes par ces arbovirus. En fait, des récepteurs ou facteurs d'attachement putatifs d'arbovirus impliquant des glycannes et glycoconjugués ont été pressentis *in cellulo* ou *in vitro*, mais non validés *in vivo* (Ludwig *et al.*, 1996; Kuadkitkan *et al.*, 2010; Londono-Renteria *et al.*, 2015).

En revanche, de très nombreux travaux ont abordé les interactions entre les virus de plantes et leurs vecteurs. En effet, les plantes étant essentiellement pourvues de parois cellulaires, l'essentiel des infections virales nécessite l'intervention d'un vecteur arthropode (Brault *et al.*, 2010).

Au-delà de la transmission verticale, par les graines, la transmission peut être soit non-circulante soit circulante, multipliante, ou pas (Dietzgen *et al.*, 2016). Dans tous les cas, le maintien, même temporaire, du virus dans son vecteur est indispensable pour assurer l'infection d'une plante à l'autre. Les interactions virus de plante/vecteur sont donc essentielles et de plus en plus de mécanismes en sont élucidés (Dietzgen *et al.*, 2016). Ainsi, de nombreux récepteurs putatifs ont été mis en évidence qui permettent le maintien, puis la libération, d'une dose virale infectieuse à partir des pièces buccales du vecteur ou encore la circulation du virus d'un compartiment à l'autre de l'insecte vecteur (revue dans Deshoux *et al.*, 2018)

Chez le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum*, il s'agit d'une aminopeptidase de type N (*in vitro*) (Linz *et al.*, 2015), chez le puceron vert de pêcher, *Myzus persica*, il s'agit d'une protéine cuticulaire (Styline-01) (Webster *et al.*, 2018) de l'acrostyle (partie du stylet), interagissant avec le virus de la mosaïque du chou-fleur («*Cauliflower mosaic virus*» CaMV) (Uzest *et al.*, 2010) mais également la protéine membranaire Ephrine a été identifiée comme récepteur du virus «*Turnip yellow virus*» TuYV (Mulot *et al.*, 2018).

Enfin, le passage des virus d'un compartiment de l'insecte à un autre a été récemment éclairé par la caractérisation d'un « facilitateur », un transporteur de sucre nommé LsST6, qui permet l'invasion des entérocytes de l'intestin moyen de *Laodelphax striatellus*, permettant ainsi la propagation de 3 virus persistants chez l'insecte vecteur (Qin *et al.*, 2018). Il est à noter que ce type de transporteur est très largement exprimé au niveau de l'intestin moyen de tous les insectes car il permet l'assimilation des sucres (Yang *et al.*, 2017).

Un seul virus entomopathogène, un densovirus, a vu son récepteur identifié, il s'agit de BmDV qui infecte *Bombyx mori*. Ce récepteur, NSD1, est une pérित्रophine de type mucine dont la glycosylation, bien que non élucidée, est déterminante pour la reconnaissance de ses cibles par le virus (Ito *et al.*, 2018).

Notre virus modèle *Junonia coenia densovirus* n'a pas encore de récepteur connu. Nous pouvons donc nous demander si, comme pour tous les virus évoqués plus haut, mais surtout à la lumière de la récente découverte d'un récepteur de type mucine pour un densovirus, JcDV pourrait également interagir avec des glycanes pour franchir la barrière intestinale.

2.4.2. Le franchissement de la barrière intestinale par JcDV

Chez les *Densovirinae*, le franchissement de la barrière intestinale n'a été étudié que pour la souche JcDV (Wang *et al.*, 2013b). Dans cette étude réalisée par notre équipe, il a été montré que le

virus, une fois ingéré par la chenille, rejoint rapidement l'intestin moyen et se retrouve concentré sur la matrice péritrophique, puis la traverse par un mécanisme jusqu'alors inconnu.

Une fois le virus passé cette première barrière, il rencontre une seconde barrière biologique et dynamique qu'est l'épithélium intestinal. Il a été mis en évidence, par immunomarquage du virus (Mutuel *et al.*, 2010; Gosselin Grenet *et al.*, 2015), que JcDV, *in vivo*, met 15 min pour atteindre l'espace ectopéritrophique et les cellules columnnaires de l'intestin moyen et *in cellulo*, JcDV met 30 min pour entrer dans les cellules columnnaires mais pas dans les autres types cellulaires (les cellules caliciformes et les cellules souches). Il a été montré que JcDV entre dans les cellules permissives Ld652 par une endocytose dynamine- et clathrine-dépendante (Vendeville *et al.*, 2009) mais *ex vivo*, en utilisant le système de la chambre de Ussing (Cf en 2.4.1.1), JcDV entrerait dans les cellules columnnaires par une endocytose dynamine- et cavéoline-dépendante (Wang *et al.*, 2013b). De plus il a été montré que JcDV ne se réplique pas dans les entérocytes, contrairement aux itérovirus, mais traverse la cellule par transcytose, *ex vivo* en chambre de ussing, en 10 min seulement (Wang *et al.*, 2013b). Il est à noter que l'acide tanique (molécule chimique qui empêche, ici, l'exocytose des virus dans le compartiment hémolympatique) additionné à JcDV permet une ouverture partielle des jonctions septées ce qui n'est pas le cas lorsque JcDV ou l'acide tanique sont incubés seuls avec l'intestin moyen en chambre de Ussing et observés par microscope électronique à transmission (MET). L'acide tanique bloque la dynamique de la membrane basale ce qui provoque l'accumulation du virus dans les cellules columnnaires et entraînerait l'ouverture de ces jonctions, même si aucun virus n'a été co-localisé avec ces dernières (Wang *et al.*, 2013b).

In vivo, une fois le virion libéré dans l'hémolymphe, il rejoint les tissus cibles, qui sont principalement les hémocytes, les trachées et l'épiderme, afin de s'y répliquer (cette étape dure de 4 à 48h). La multiplication dans les tissus cibles induit plusieurs symptômes, à savoir une paralysie, un arrêt du développement, une hypoxie, une anorexie et à terme la mort de la chenille au bout de 5 à 10 jours p.i. (Mutuel *et al.*, 2010; Gosselin Grenet *et al.*, 2015).

Parmi les *Ambidensovirus*, JcDV et un autre variant *Galleria mellonella* densovirus (GmDV) possèdent 94% d'identité de séquence dans la protéine de capsid VP4, bien qu'ils aient un spectre d'hôte différent. Dans notre équipe, des analyses de structure de la protéine de capsid VP4 de ces deux variants ont prédit que quatre acides aminés en position 121, 165, 172 et 175 de la séquence de VP4 formaient un motif susceptible d'interagir avec le récepteur, localisé à proximité de l'axe de symétrie d'ordre 5 des capsides (Multeau *et al.*, 2012). Ces quatre acides aminés de JcDV ont été remplacés par ceux de GmDV et des tests *in vivo* ont été réalisés en utilisant le virus mutant, appelé 8m, pour infecter oralement la chenille *S. frugiperda*. Les résultats de cette étude ont montré que les chenilles mourraient moins vite qu'avec le virus sauvage (WT) et que le virus qui entrerait dans l'épithélium intestinal se retrouvait séquestré à l'intérieur de vésicules non caractérisées, contrairement au virus WT qui réalise la transcytose. Les résultats montrent toutefois qu'il n'y a pas de changement de spectre d'hôte lié à ces

mutations (Multeau *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013b). La surface de ce motif présent sur la VP4 serait potentiellement impliquée dans la reconnaissance du système récepteur intestinal de JcDV.

2.4.3. Adaptation de JcDV à son hôte

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'évolution des parvovirus d'insectes et à leur adaptation à de nouveaux hôtes, l'équipe a mis en place un protocole d'évolution expérimentale. Initiant des populations virales à partir d'un clone infectieux de JcDV (un seul génotype), nous avons réalisé plusieurs infections *per os* en lignées parallèles de deux espèces de chenilles, *S. frugiperda* et *S. littoralis*, soit en transmettant le virus dans la même espèce (environnement constant), soit en alternant l'espèce hôte (environnement variable). Après dix passages en série, les phénotypes obtenus (virulence) et les génotypes (séquences du génome viral) ont été comparés à ceux d'origine. Les résultats ont montré que la virulence diminuait dans un environnement constant et restait élevée lorsque les espèces hôtes alternaient, suggérant que des mutations étaient sélectionnées de manière différentielle avec les passages et donc dépendaient de l'environnement (Mutuel *et al.*, *in prep*). Le séquençage des populations virales a montré que, bien que différentes variations génomiques se soient produites en fonction de l'espèce et de l'environnement, aucune mutation adaptative susceptible de soutenir les résultats phénotypiques des infections observées n'a été sélectionnée. En changeant le mode de transmission, par ingestion *versus* la voie systémique en injectant le virus aux chenilles, nous avons constaté que toutes les populations virales présentaient la même virulence, ce qui indique que l'interaction des capsides avec l'intestin est une étape qui limite l'infection par des virus transmis dans des environnements constants (Mutuel *et al.*, *in prep*). Ceci fait donc le lien avec mes travaux sur la compréhension du ou des mécanismes mis en jeu lors de l'interaction de la capside de JcDV avec les composants de la barrière intestinale.

Objectif de mes travaux de thèse

Dans l'équipe nous développons une étude globale de l'interaction virus-insecte en utilisant comme modèle le lépidoptère ravageur de cultures *Spodoptera frugiperda* infecté par le densovirus type *Junonia coenia Densovirus* (JcDV). Comme pour tous les virus à transmission orale, l'intestin est la porte d'entrée des virus. C'est, également, la première barrière que le virus doit franchir pour initier l'infection, une étape conditionnant l'invasion virale. Les travaux de l'équipe (Wang *et al.*, 2013b) ont permis de comprendre le mécanisme moléculaire permettant au virus JcDV de traverser l'épithélium intestinal de l'insecte. Suite à leur ingestion par la chenille, les particules virales de JcDV se concentrent initialement sur la matrice péritrophique, réseau maillé poreux de chitine et de glycoprotéines qui gaine l'épithélium intestinal et permet le passage des nutriments du bol alimentaire mais empêche celui des pathogènes. Ce résultat suggère une forte affinité des capsides virales pour les glycanes.

Dans le contexte du biocontrôle, les densovirus remplissent une bonne partie des critères prérequis pour leur utilisation efficace dans le respect de la sécurité. Ils sont infectieux par ingestion, pathogènes aux stades où la chenille fait des ravages sur les cultures en se nourrissant, c'est à dire aux stades larvaires et ne sont pas capable d'infecter les cellules de vertébrés au sens large (El Far, M. *et al.*, 2004). Enfin les densovirus, même s'ils sont dépourvus de corps d'inclusion comme chez les baculovirus, sont extrêmement résistants aux conditions environnementales (UV, pH, chaleur). Des interrogations subsistent quand aux mécanismes d'entrée du virus dans la chenille, mécanismes clés car liés à la problématique de la spécificité d'hôte.

Nous avons pu voir dans cette introduction que la structure de la première barrière de l'intestin moyen, la matrice péritrophique, est bien décrite dans la littérature mais peu de mécanismes mise en jeu lors du passage des virus entomopathogènes sont actuellement connus. Il en va de même pour la seconde barrière, l'épithélium intestinal dont on connaît seulement deux récepteurs, NSD1 et 2, putatifs de virus entomopathogènes BmDV1 et BmBDV chez le « ver à soie » *Bombyx mori*.

Mes travaux de thèse visent à comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'infection de JcDV pour le passage de la barrière intestinale de *S. frugiperda*. Les objectifs sont de savoir :

- Par quel(s) mécanisme(s) et avec quelle(s) molécule(s) le JcDV interagit sur la MP et comment il réussit à s'en détacher.
- Avec quel(s) interactants le virus interagit sur les microvillosités des entérocytes de l'intestin moyen, afin de trouver son récepteur spécifique.

J'ai tenté de répondre à ces questions en utilisant des approches complémentaires *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* à l'aide de techniques variées, microscopiques, biochimiques et moléculaires.

Matériels & Méthodes

I. Organismes et virus utilisés

1. Élevage des insectes

Les chenilles *Spodoptera frugiperda* (*S. frugiperda*) et *Spodoptera littoralis* (*S. littoralis*) ont été élevées dans une plateforme de l'UMR 1333 DGIMI¹⁶. La plateforme se compose de deux structures, l'insectarium réglementé pour l'élevage des animaux sains et la plateforme d'expérimentation d'insecte de quarantaine (PIQ) (Campus de la Faculté des Sciences de l'Université de Montpellier), dans des conditions contrôlées avec une température de 25 ± 1 ° C, une hygrométrie de 45 à 60% [RH] et une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit. Les chenilles ont été nourries sur un milieu artificiel à base de farine de maïs appelé milieu Poitout (Sugiharti *et al.*, 2010 ; Poitout and Buès., 1974) . Les expérimentations sur chenilles ont été effectuées sur PIQ de l'UMR DGIMI, dans une zone de confinement de niveau 2. Les chenilles se développent au cours de 6 stades larvaires (L1 à L6) dont les durées sont légèrement différentes entre *S. frugiperda* (L1 2,5 jours, L2 1,5 jours, L3, L4 et L5 2 jours et L6 4 jours) et *S. littoralis* (L1 3 jours, L2, L3 et L4 2 jours, L5 2,5 jours et L6 4 jours).

2. Production de densovirus JcDV

2.1. Le virus sauvage (WT) semi-purifié

Des chenilles *S. frugiperda* ou *S. littoralis*, préalablement infectées au stade L3 avec du virus JcDV sauvage (WT) et mortes de l'infection ont été broyées dans un tampon TE 1X (1 mM Tris pH7,5 ; 0,1 mM EDTA pH 7,3) contenant 2% d'acide ascorbique. Le broyat obtenu a été clarifié à 10 000 g à 4°C pendant 10 min, puis le culot viral a été filtré sur 0,22 µm et stocké à -20°C. La qualité du stock de virus obtenu (nommé JcDV) a été contrôlée par coloration négative avec 2% d'acide phosphotungstique (PTA ; pH 7) et observation au MET JEOL 1200 EX II opérant à 100 kV (plateforme MEA, Université de Montpellier). La concentration virale a été estimée à $1,16 \cdot 10^{11}$ génomes équivalent virus [veg]/µl par PCR quantitative (qPCR) comme décrit dans (Wang *et al.*, 2013b). Le titre infectieux viral a été déterminé en culture cellulaire sur cellules permissives d'insectes IPLB-Ld-652 (Goodwin *et al.*, 1978; Volkman and Goldsmith, 1982; Carrillo-Tripp *et al.*, 2014) par immunofluorescence comme étant la dose infectieuse pour laquelle 50% des cellules sont infectées (Tissue Culture Infectious Dose 50, [TCID50]) (Li *et al.*, 1996b).

¹⁶ <https://www6.montpellier.inra.fr/dgimi/Plateforme-experimentale-sur-insectes>

2.2. Le virus WT purifié

Le virus JcDV WT semi-purifié a été déposé sur un gradient de densité de 15 à 55% d'OptiPrep™ (Sigma) et ultracentrifugé 16 h à 100 000g à 8°C. La bande de virus sédimentant dans la couche d'Optiprep à 45% a été récoltée puis dialysée à l'aide d'une solution tampon phosphate salin (PBS) 1X. La qualité du stock de virus purifié obtenu (appelé P_JcDV) a été contrôlée comme précédemment. La concentration virale a été estimée à $1,13.10^{11}$ veg/ μ l, comme précédemment.

2.3. Le virus mutant 8m

Le virus mutant 8m a été généré par mutagenèse dirigée pour remplacer 8 acides aminés (aa) de la protéine VP4 exposés à la surface de la capsidie par les acides aminés correspondant de la capsidie du densovirus de *Galleria mellonella* (GmDV) (Multeau *et al.*, 2012). Les substitutions ont été réalisées dans le plasmide pBRJH, plasmide qui contient la séquence complète du génome de JcDV avec les deux ITRs (Inverted Terminal Repeat) (souche Oxford, GenBank: KC883978.1)(Jourdan *et al.*, 1990; Multeau *et al.*, 2012). Le plasmide mutant 8m a ensuite été injecté avec du DEAE-Dextran à 2 μ g/ μ l dans des 80 chenilles *S. frugiperda* ou *S. littoralis* au stade L4. Les chenilles mortes de l'infection ont été collectées et le virus 8m a été semi-purifié comme décrit pour le virus WT (*cf* partie I.2.1). La qualité du stock de virus obtenu (appelé 8m) a été contrôlée comme précédemment. La concentration virale a été estimée à 5.10^{10} veg/ μ l, comme précédemment. La présence des mutations a été contrôlée par séquençage de la partie génomique VP4 (Multeau *et al.*, 2012).

II. Tests de compétition et imagerie

1. Tests de compétition

1.1. Bioessais sur chenilles *S. frugiperda*

Des cohortes de chenilles *S. frugiperda* (stade L3) ont été individuellement infectées avec JcDV, soit par voie orale en les nourrissant sur du milieu Poitout (Poitout et Buès, 1979) imbibé avec du virus (10^9 veg/chenille), soit par injection (10^8 veg/chenille). Le Calcofluor à 0,5% (F3543 ; Sigma) a été administré de manière concomitante avec le virus. Pour les tests de compétition, JcDV a été pré-incubé avec différents glycanes : N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc; A4106; Sigma), N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc; A2795 ; Sigma), D-(+)-Fucose (Fucose; F8150; Sigma) ou D-(+)-Mannose (Mannose; M6020 ; Sigma) à 5 μ M et/ou 5 mM, ou avec de la mucine provenant de l'estomac de porc à 7 mM (Porcine mucin; M2378; Sigma), pendant une heure avant l'infection. Dans toutes les expériences, des chenilles témoins ont été nourries ou injectées avec du PBS 1X. Chaque traitement a été appliqué à une cohorte de 24 chenilles et trois expériences indépendantes ont été réalisées. La

mortalité des chenilles a été suivie quotidiennement pendant 10 jours et les résultats sont présentés comme des taux de survie par jour. Le temps que mettent les chenilles à mourir (Letal Time 50 [LT50]) a été évalué en comparant les courbes de survie à l'aide de la méthode de Kaplan Meier (logiciel GraphPad Prism, version 7). La significativité entre les groupes a été analysée en utilisant des tests log-rank (Mantel-cox) et des tests Gehan-Breslow-Wilcoxon.

1.2. Infection orale et coupes semi-fines

Les chenilles *S. frugiperda* (stade L3) ont été nourries individuellement comme ci-dessus, avec du JcDV, du P_JcDV ou du virus 8m (10^9 veg/chenille). Des chenilles témoins ont été nourries avec du PBS 1X. Deux heures ou 24 h plus tard, les chenilles ont été anesthésiées sur glace et sacrifiées, puis fixées à l'aide de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage dans du PBS 1X, les chenilles ont été déshydratées séquentiellement dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50% pendant 10min, 70% pendant 10 min deux fois, 90% et 100% pendant 10 min ; trois bains par concentration), avant un enrobage progressif dans de la résine Unicryl (BB International), comme décrit dans (Wang *et al.*, 2013). Des coupes semi-fines transversales de 1 μ m d'épaisseur ont été ensuite réalisées à l'aide d'un microtome au niveau de la partie moyenne de l'intestin et traitées pour l'immunomarquage comme décrit ci-dessous (II.2).

1.3. Isolement des matrices péritrophiques et infection *ex vivo*

Les chenilles *S. frugiperda* ou *S. littoralis* (stade L6) ont été anesthésiées sur glace puis sacrifiées, et les matrices péritrophiques isolées par microchirurgie et lavées avec du PBS 1X pour éliminer le bol alimentaire. Pour les observations au microscope à fluorescence, les matrices péritrophiques ont été incubées pendant 30 min à température ambiante (TA) avec du virus JcDV seul (10^9 veg/matrice ; dans 300 μ l final de PBS 1X) ou du JcDV pré-incubé 1 h avant l'infection avec 5 μ M, 0,5 mM ou 50 mM de GlcNAc, GalNAc, Fucose ou Mannose. Pour les observations au microscope électronique à balayage (MEB), les matrices péritrophiques ont été incubées pendant 30 min ou 2 h à TA avec du virus JcDV seul, du JcDV pré-incubé 1 h avant l'infection avec 5 mM de GlcNAc, du P_JcDV ou du virus 8m (10^9 veg/matrice ; dans 300 μ l final de PBS 1X). Des matrices supplémentaires ont été incubées 30 min ou 2 h à TA avec 0,1% d'agglutinine de germe de blé de *Triticum vulgare* (Wheat Germ Agglutinin [WGA] ; Merck) ou 1% de Calcofluor. Enfin, pour quelques-unes des conditions testées, les expériences ont été réalisées dans du PBS à pH 9 (JcDV, P_JcDV, Calcofluor). Des matrices péritrophiques témoins ont été incubées dans les mêmes conditions avec du PBS 1X (non-infecté [NI]) ou avec un homogénat clarifié et filtré de chenilles non infectées ([Mock]). Dans toutes les conditions testées, les matrices péritrophiques ont été lavées après traitement avec du PBS 1X et fixées 1 h à l'aide de PFA à 4% pour l'immunomarquage ou de glutaraldéhyde à 2,5% pour le MEB.

1.4. Test d'hémagglutination

Des érythrocytes de lapin ont été dilués à 3% (v/v) avec du NaCl à 150 mM, puis traités avec 0,5 mg/ml de trypsine (Sigma) pendant 30 minutes à 37°C. Les érythrocytes ont ensuite été centrifugés à 500 g pendant 5 min à TA afin d'éliminer la trypsine et 6 lavages ont été réalisés avec du NaCl à 150 mM. Des dilutions en série au ½ dans du NaCl à 150 mM de JcDV ou de P_JcDV (volume final 25µl) ont été mélangées avec 25 µl d'érythrocytes dans des plaques de 96 puits pendant 30 minutes à 37°C. Un contrôle positif d'hémagglutination a été effectué en utilisant 25 µl de WGA (1 mg/ml) avec 25µl d'érythrocytes. Pour les tests de compétition, 25 µl des dilutions en série de glycanes à 25 mM (GlnAc, GalNAc, Sialylactose, Glucosamine, Galactosamine, Fucose et Mannose) ont été incubés avec 25 µl de P_JcDV (10^{11} veg/µl) pendant 30 min à TA. Puis, 50 µl d'érythrocytes ont été ajoutés dans chaque puits pour une nouvelle incubation de 30 min à 37°C. Les résultats d'hémagglutination ont été lus à l'aide d'un microscope photonique. Les tests d'hémagglutination ont été réalisés en plaque 96 puits, à l'aide de dilutions en série au ½ de virus semi-purifié (JcDV) ou de virus purifié sur gradient (P_JcDV) afin de déterminer le titre hémagglutinant (c'est-à-dire la dernière dilution pour laquelle on observe visuellement une hémagglutination). En témoin positif, j'ai utilisé la lectine WGA (Wheat Germ Agglutinin) qui a une affinité pour le GlcNAc (Kubota *et al.*, 2017).

1.5. Immunomarquage et analyses microscopiques

L'immunomarquage des particules virales sur les coupes semi-fines d'intestin et les matrices péritrophiques isolées a été réalisé en utilisant un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-capside (Eurogentec, dilution 1/1000^{ème}). L'anticorps primaire a été incubé avec les échantillons pendant 2 h à TA et l'anticorps secondaire anti-lapin (Alexa Fluor® 568 ; Invitrogen ; dilution 1/500^{ème}) pendant 45 min à TA. Les coupes semi-fines ont été incubées 45 min avec de la WGA-FITC (L4895 ; Sigma, dilution 1/300^{ème}) pour marquer les GlcNAc et les matrices péritrophiques, ou avec de la Phalloïdine-FITC (Sigma ; dilution 1/300^{ème}) pour marquer le cytosquelette d'actine des cellules épithéliales, et 10 min avec du DAPI (1 µg/ml final ; Invitrogen) pour marquer l'ADN. Les matrices péritrophiques et les coupes semi-fines marquées ont ensuite été montées dans du milieu de montage Dako (Sigma) entre lame et lamelle pour l'observation. Pour les mesures d'épifluorescence, nous avons utilisé un microscope Zeiss AxioImager Z2, équipé de filtres adaptés pour les marqueurs utilisés, avec les objectifs 40X/1.3 Plan-Apochromat Oil PH3 et 63X/1.4 Plan-Apochromat Oil PH3. Pour les images en illumination structurée, le module Zeiss ApoTome a été introduit dans le plan d'arrêt de champ du microscope pour améliorer la résolution des images. Nous avons utilisé le logiciel ZEN pour faire fonctionner le microscope et toutes les images sont prises avec un appareil photo CMOS Orca Flash 4.0 N & B (Plateforme Montpellier Ressources Imagerie). Les images ont été traitées avec le logiciel Fiji. L'intensité de la fluorescence (unité arbitraire) a été mesurée sur les images d'épifluorescence. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du test de Kruskal-Wallis non paramétrique (logiciel

GraphPad Prism, version 7). Chaque expérience a été répétée au moins trois fois, et chaque expérience indépendante a donné des résultats similaires.

2. Microscopie électronique à balayage

Les matrices péritrophiques fixées ont été déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante comme en II.1.2, puis dans un volume 1:1 d'éthanol 100% et d'hexaméthylsilazane (HMDS) et, enfin, dans 100% de HMDS. Après évaporation complète du HMDS, les échantillons ont été revêtus de Platiniun et observés avec un microscope électronique à balayage HITACHI S-4800 (tension d'accélération de 2 kV et distance de travail de 5 mm). Le diamètre des pores a été mesuré sur des images (8 bits) prises au hasard sur les matrices péritrophiques totales et dans les zones endommagées (7 à 12 images par condition, minimum 3 matrices péritrophiques représentant un total de 1000 mesures) en comptant les pixels dont l'intensité était inférieure à un seuil choisi de 130 (logiciel Fiji). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test paramétrique Tukey-Kramer (GraphPad Prism, version 7¹⁷).

III. Identification des protéines de la matrice péritrophique et de l'intestin moyen de *S.frugiperda* et interaction avec JcDV

1. Extraction des protéines de la matrice péritrophiques

Les protéines de la matrice péritrophique, appelées péritrophines, ont été extraites à partir de 5 matrices péritrophiques isolées de chenilles *S. frugiperda* (stade L6) dans 200 µl de tampon Laemmli 2X (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue and 0.125 M Tris HCl, pH 7) chauffées à 95°C pendant 5 min et centrifugées à 8 000 g pendant 10 min à 4 ° C comme dans (Shi *et al.*, 2004). Le surnageant, qui contient les péritrophines, a été recueilli pour la suite des expériences (voir plus loin SDS-PAGE, coloration PAS et Far-western).

2. Préparation de vésicules membranaires de bordures en brosse (VMBB)

L'ensemble de la préparation a été réalisée à 4°C. Les intestins moyens de 120 chenilles *S. frugiperda* (stade L6) ont été isolées, lavées dans du PBS 1X, puis infectés (ou non) avec JcDV ou le virus 8m (10¹⁰ veg) pendant 30 min et finalement incubés 5 min dans du tampon sucrose (210 mM sucrose, 45 mM de KCl et 10 mM d'Hepes-Tris pH 7). Un gramme de tissu a ensuite été broyé dans un

¹⁷ <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>

Dounce avec 10 ml de tampon hypotonique (100 mM mannitol, 10 mM Hepes-Tris pH 7,2) et filtré sur de gaze. Le filtrat obtenu a été mélangé à une solution de CaCl₂ à 250 mM de manière à obtenir une concentration finale de 10 mM, vortexé pendant 15 min et centrifugé 15 min à 3000 g. Le surnageant a été ultracentrifugé 20 min à 58915 g (rotor TLA110, Beckman) et le culot obtenu (les VMBB) a été resuspendu dans 250 µl de tampon hypotonique et conservé à -80°C. L'enrichissement de l'extrait en éléments spécifiques des bordures en brosse a été contrôlé par dosage colorimétrique de l'activité aminopeptidase-N à 410 nm en utilisant la L-Leucine-4-p-nitroanilide (L2158 ; Sigma) comme substrat (Crava *et al.*, 2013).

3. Isolement des radeaux lipidiques à partir des VMBB par gradient de flottaison

Un volume de 200 µl de VMBB infectées ou non a été repris avec 300 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)) et vortexé pendant 30 min à 4°C. 200 µl du lysat obtenu ont été déposés au fond d'un tube TLS55 (Beckman) (et le volume restant repris avec du Laemmli 2X), puis homogénéisés avec 400 µl d'Optiprep 60% (Sigma) pour obtenir une concentration finale de 40% d'Optiprep. Au-dessus, 1,2 ml d'Optiprep à 30 %, puis 400 µl de TNE 1X ont été déposés en surcouche. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 2 h à 89 503 xg (Beckman) à 4°C, puis 7 fractions de 300 µl ont été collectées. La fine bande jaunâtre qui flotte dans la partie supérieure du gradient (bande 2) correspond aux radeaux lipidiques. Les protéines de chacune des fractions ont enfin été précipitées à l'aide et d'acide trichloroacétique à 100% additionné de déoxycholate de sodium à 2 %, puis resuspendues dans du Laemmli 4X, bouillies à 95°C pendant 5 min et conservées à -80°C. Chacune des fractions protéiques a été analysée en Western blot ; la fraction correspondant aux radeaux lipidiques issus de chenilles non infectées a également été analysée en Far-western (voir ci-dessous).

4. SDS-PAGE, coloration PAS, Western blot et Far western

Les protéines (1/15 des échantillons de péritrophines et ½ des échantillons protéiques de radeaux lipidiques) ont été déposées en triplica sur mini gel gradient de polyacrylamide 4-15% (Biorad) et séparées par SDS-PAGE. Parallèlement, 30 µg de mucine porcine ont été chargés sur le même gel. Une partie du gel a été coloré au Page blue (ThermoFisher Scientific) pour analyser les protéines totales, la deuxième partie a été colorée selon la technique PAS (« *Periodic Acid Schiff* » acide périodique de Schiff) décrite dans (Zacharius *et al.*, 1969) pour analyser les protéines glycosylées. Pour la dernière partie du même gel, les protéines ont été transférées sur membranes de nitrocellulose (Biorad) pendant 3 h à 70 V pour une analyse en western blot ou Far western. Pour le western blot, la membrane a été saturée avec 5% de lait en poudre dans du PBS 1X et Tween 0,1% (PBST) pendant 30 min à TA, puis incubée toute la nuit avec un anticorps de lapin anti-cavéoline-1 (Santa Cruz ; dilution 1/200^{ème}) et un

anticorps polyclonal de souris anti-capside de JcDV (home made ; dilution 1/1000^{ème}). Après lavages en PBST, la membrane a été incubée 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin ou anti-souris conjugué à HRP (Biorad ; dilution 1/3000^{ème}). Pour le Far western, les membranes ont été saturées avec 3% de BSA dans du PBST pendant 2 h à TA, puis incubées pendant 16 h à 4°C avec 10⁹ veg de JcDV (pré-incubé ou non les glycanes GlcNAc, GalNAc, Fucose et Mannose à 5 µM et 5 mM) dans du PBST contenant 1% de BSA. Après lavages en PBST, les membranes ont été incubées comme précédemment avec un anticorps de lapin anti-capside de JcDV, puis avec un anticorps secondaire anti-lapin conjugué à HRP. Dans les deux types d'expériences, les protéines ont été révélées par chimiluminescence (Millipore) en utilisant l'imageur Odyssey Fc (LI-COR Biosciences).

5. Identification des protéines de la matrice périréplique, des VMBBs et des radeaux lipidiques par LC-MS/MS

Les bandes protéiques révélées par Far western blot ont été coupées dans le gel SDS-PAGE coloré au Page-blue et décolorées par 3 lavages dans 50% d'acétonitrile (ACN) et 50 mM de bicarbonate de triéthylammonium (TEABC). Après réduction (10 mM de dithiothréitol dans 50 mM de TEABC pendant 30 min à 60°C à l'obscurité) et alkylation (55 mM d'iodoacétamide en TEABC pendant 30 min à TA), les protéines ont été digérées dans le gel en utilisant de la trypsine à 0,5 µg/bande (Gold, Promega, Madison USA) comme décrit précédemment (Thouvenot *et al.*, 2008). Les produits digérés ont été déshydratés dans une centrifugeuse sous vide et remis en suspension avec 0,05% d'acide trifluoroacétique et 2% d'ACN. Les peptides générés ont été analysés en ligne en utilisant une HPLC nano débit (Ultimate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific) couplée à un spectromètre de masse ayant une source nanoelectrospray (Q-Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific). Les peptides ont été séparés sur une colonne capillaire (phase inverse C18, NanoViper, Dionex) suivant un gradient de 0-40% de B en 33 min (run de 60 min) (A = 0,1% acide formique ; B = 0,1 % acide formique dans 80% acetonitrile) à un débit de 300 nl/min. Les spectres ont été enregistrés *via* le logiciel Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) comme décrit dans (Olsen *et al.*, 2005). Les données spectrales ont été analysées *via* le logiciel MaxQuant v1.5.5.1. (Cox and Mann, 2008). Tous les spectres MS / MS ont été recherchés en utilisant Andromeda sur une base de données de « leurrage » constituée d'une combinaison de bases de données de *S.frugiperda* (Legeai *et al.*, 2014; Gouin *et al.*, 2017) OGS2.2_proteins_20151204.fasta, version 20151204, http://bipaa.genouest.org/is/lepidodb/spodoptera_frugiperda) et 236 contaminants classiques, contenant des entités directes et inverses. Les paramètres suivants ont été appliqués : les spectres ont été recherchés avec une tolérance de masse de 7 ppm (MS) et 0,5 Th (MS / MS). La spécificité enzymatique a été fixée à la trypsine. Jusqu'à deux clivages manqués ont été autorisés et seuls les peptides ayant une longueur d'au moins sept acides aminés ont été considérés. La carbamidométhylation a été fixée en tant que modification fixe de la cystéine et l'oxydation a été fixée en tant que modification de la méthionine variable pour les recherches. Le taux de faux-positifs (FDR) a été fixé à 0,01 pour les peptides et les protéines. Les

protéines identifiées avec au moins 2 peptides uniques ont été annotées selon les termes de l'ontologie génique (GO), classées en utilisant le logiciel Blast2Go¹⁸ (<https://www.blast2go.com/>) (Conesa *et al.*, 2005). L'enrichissement par rapport à la référence (OGS2.2_proteins_20151204.fasta) a été représenté pour le niveau 2 des catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire ».

IV. Analyse de la réponse transcriptomique de l'intestin moyen de *S. frugiperda* à l'infection orale par JcDV

L'analyse complète du transcriptome de l'intestin moyen a été réalisée en utilisant l'expression génique digitale (Digital Gene Expression [DGE]). Cette méthode génère des séquences courtes (tags) spécifiques des ARNm et fournit des données d'expression génétique qualitatives et quantitatives (de Lorgeril *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2006; Velculescu *et al.*, 1995).

1. Extraction des ARN totaux de l'intestin moyen

Les chenilles *S. frugiperda* (stade L4) ont été infectées oralement (ou non) avec JcDV (10^{12} veg par chenille et 20 chenilles par condition). À 24 h pi ou 72 h pi, les chenilles ont été anesthésiées sur glace et disséquées. Les intestins moyens ont été isolés, lavés dans du PBS 1X pour éliminer le bol alimentaire et les matrices péritrophiques. Les trachées, les tubes de Malpighi et les muscles viscéraux ont été éliminés et les épithéliums ont été incubés avec de la trypsine à 2,5% pendant 30 min pour dissocier les tissus. Après lavages en PBS 1X, les cellules intestinales ont été lysées dans 800 µl de TRIzol® (Invitrogen) pour l'extraction de l'ARN total selon les instructions du fabricant. La quantité totale d'ARN et la pureté ont été vérifiées en utilisant le spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) et l'intégrité de l'ARN total a été analysée par électrophorèse capillaire (2100 Bioanalyzer Instrument, Agilent).

2. Construction et séquençage des banques DGE

Quatre banques DGE ont été construites à partir des ARN totaux de l'intestin moyen extraits de chenilles infectées (ou non) à 24 et 72 h pi. La préparation des tags a été effectuée avec le kit Digital Gene Expression Tag Profiling d'Illumina selon le protocole du fabricant (version 2.1B) comme décrit dans (de Lorgeril *et al.*, 2011). Pour les 4 banques, 10 pg d'ARN total ont été incubés avec des billes recouvertes d'oligo-dT. Les synthèses d'ADNc ont été réalisées en utilisant le kit Superscript II reverse transcription (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. Les ADNc ont été clivés en utilisant l'enzyme d'ancrage *NlaIII*, puis ligués avec l'adaptateur GEX 1 contenant un site de restriction *MmeI*. Une digestion avec *MmeI* a été réalisée, qui coupe 17 pb en aval du site CATG. À ce stade, les fragments

¹⁸ <https://www.blast2go.com/>

se détachent des billes. L'adaptateur GEX 2 a alors été ligué à l'extrémité 3' des tags. Une amplification par PCR de 15 cycles en utilisant la polymérase « Phusion » (Finnzymes) a été réalisée avec des amorces complémentaires des séquences adaptatrices pour enrichir les échantillons en fragments désirés. Les fragments obtenus de 85 pb ont été purifiés par excision à partir d'un gel de polyacrylamide à 6%. L'ADN a été élué du gel en utilisant un filtre Spin-X Cellulose Acétate (0,45 µm), précipité, remis en suspension dans du Tris-HCl 10 mM (pH 8,5) et quantifié en utilisant un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). La génération des clusters a été réalisée après application de 4 pM de chacun des échantillons sur les pistes individuelles de la cellule Illumina 1G. Après hybridation des amorces de séquençage aux produits monocaténares, 18 cycles d'incorporation de bases ont été effectués sur l'analyseur 1G selon les instructions du fabricant. L'analyse des images a été effectuée en utilisant le *pipeline* d'Illumina¹⁹, dans lequel les séquences des tags ont été obtenus après le passage par un filtre de pureté.

3. Annotation fonctionnelle des tags

Les fichiers de séquences de chaque banque DGE ont été analysés avec le logiciel BIOTAG (Skuld-Tech, Grabels, France). La valeur statistique des comparaisons de données DGE, en fonction du nombre de tag, a été calculée en supposant que chaque tag a une chance égale d'être détectée. L'expression différentielle du nombre de tags dans les conditions « infectées » par rapport aux conditions « non infectées » a été réalisée pour obtenir une liste de tags sur-représentés et sous-représentés pour chaque condition. Les tags pour lesquels l'expression différentielle a été modifiée de 5 fois au moins ont été assignés en utilisant le transcriptome de référence pour *S. frugiperda* (Legeai *et al.*, 2014; Gouin *et al.*, 2017), puis annotés selon les termes de l'ontologie génique (GO), classés et représentés pour le niveau 2 des catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire » en utilisant le logiciel Blast2Go¹⁶ (Conesa *et al.*, 2005). L'enrichissement par rapport à la référence (transcrits prédits à partir du génome OGS2.2) a été représenté pour le niveau 2 des catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire ».

V. Analyse biochimique et *in silico* de la glycosylation des protéines structurales de JcDV

1. SDS-PAGE, coloration PAGE-blue, PAS

Les particules virales de JcDV et P_JcDV ont été dénaturées dans du tampon Laemmli 2X (composition chapitre M&M III.1) puis chauffées à 95°C pendant 5 min. Les protéines virales ont été

¹⁹ https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_genome_analyzer_software.pdf

déposées en duplica sur mini gel gradient de polyacrylamide 4-15% (Biorad) et séparées par SDS-PAGE. Une partie du gel a été coloré au Page blue (ThermoFisher Scientific) pour analyser les protéines totales, la deuxième partie a été colorée selon la technique PAS (Periodic Acid Schiff) décrite dans (Zacharius *et al.*, 1969) pour analyser les protéines glycosylées.

2. N-Glycosylation

Les plus grandes protéines structurales codées par l'ORF 1(VP1) de JcDV [AGO32183.1], *Galleria melonella* DV [AAA66966.1], *Mythimna loreyi* DV [AAR30040.1] et du mutant 8m de JcDV (Multeau *et al.*, 2012) ont été alignées à l'aide de Clustal Omega (Sievers and Higgins, 2018) puis annotées pour la présence de sites de N-Glycosylation à l'aide de l'outil "NetNGlyc 1.0 Server"²⁰ qui prédit l'existence probable de sites de N-Glycosylation à l'aide de réseaux neuronaux qui prennent en compte le contexte structural des séquences cibles Asn-Xaa-Ser/Thr. Les séquences ayant un potentiel de N-Glycosylation estimé >0.5 sont considérées comme positives.

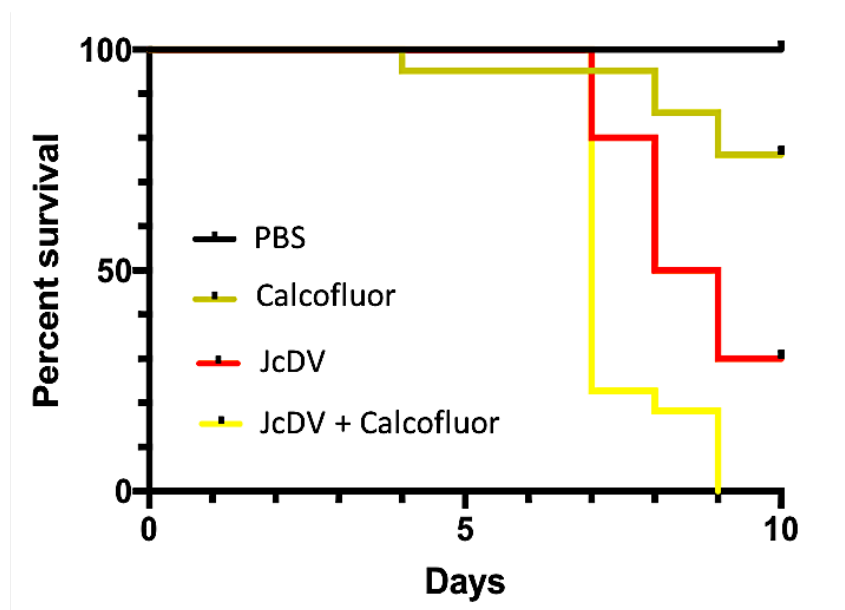
3. O-Glycosylation

La présence de sites potentiels de O-Glycosylation a été prédite *in silico* en soumettant *online* les séquences de protéines structurales VP1 (*cf.* V.1 N-Glycosylation), la plus grande protéine virale codée par l'ORF 1, à une analyse utilisant l'outil « NetOglyc server »²¹ (Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology) (Steentoft *et al.*, 2013) qui produit, grâce à un réseau neuronal, des prédictions de sites de O-glycosylation par GalNAc, de type mucine. Cet outil a été développé pour l'étude des protéines humaines, néanmoins les enzymes responsables de cette modification post-traductionnelle sont bien conservées (Wandall *et al.*, 2007) et le résultat de la prédiction peut être interprété comme la définition de régions susceptibles d'être la cible d'une modification plutôt que comme la désignation d'un acide aminé particulier.

Principalement, pour chaque séquence ambidensovirale testée (JcDV [AGO32183.1], *Galleria melonella* DV [AAA66966.1], *Mythimna loreyi* DV [AAR30040.1] et le mutant JcDV 8m (Multeau *et al.*, 2012)).

²⁰ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

²¹ <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOglyc/>



Pairwise comparison	Log-rank (Mantel-Cox)	Gehan-Breslow-Wilcoxon
JcDV + Calcofluor vs JcDV	P value = 0.0013 **	P value = 0,0026 **
Calcofluor vs JcDV	P value = 0.0027 **	P value = 0.0039 **

Figure 12 : Le calcofluor augmente la sensibilité de *S. frugiperda* à l'infection orale par JcDV.

Les chenilles (n=24, par condition) ont été nourries avec du PBS (contrôle), du Calcofluor à 0,5%, JcDV (10^9 veg/chenille) ou un mélange de Calcofluor et de JcDV. La mortalité des chenilles a été suivie pendant 10 jours. Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les tests statistiques utilisés sont Mantel-Cox et Wilcoxon (**p<0,01).

Résultats et discussion

I. La première barrière que JcDV doit franchir : la matrice péritrophique

Les arthropodes en général et les insectes en particulier possèdent un squelette externe essentiellement composé de chitine. Cette particularité limite évidemment les possibilités d'infection par des micro-organismes, ces derniers déployant en général des stratégies étonnantes pour parvenir à infecter leur hôte. La transmission des virus d'insectes est limitée à deux possibilités: la transmission verticale - dont nous ne parlerons plus dans ce mémoire - et la transmission horizontale. Cette dernière peut certes s'effectuer d'individu à individu par morsure d'une chenille infectée à une chenille saine (Cory, 2015), ou l'inverse, mais la voie la plus couramment utilisée pour infecter une larve est la voie orale. Nous parlerons ici de mécanismes d'entrée du virus JcDV par voie orale chez la chenille ravageuse de culture *S. frugiperda*.

1. La matrice péritrophique est une barrière contre l'infection par JcDV

Nous savons que la susceptibilité des chenilles *S. frugiperda* à l'infection orale par le densovirus JcDV diminue au cours du développement larvaire (Mutuel *et al.*, 2010). Cette résistance peut être attribuée, au moins en partie, à une augmentation de l'épaisseur des matrices extracellulaires incluant la matrice péritrophique. Comme cela a été décrit dans l'introduction, la matrice péritrophique est en effet une barrière contre les pathogènes et il a été notamment observé que les infections par les baculovirus seraient rendues plus efficaces en terme de mortalité lorsqu'elles sont associées avec des azurants optiques, tels que le « Calcofluor white », qui se lie et déstructurent les microfibrilles de chitine (Herth, 1980; Wang and Granados, 2000; Zhu *et al.*, 2007; Merzendorfer, 2013; Zhu *et al.*, 2016).

Afin de tester l'effet "barrière" de la matrice péritrophique contre l'infection orale par JcDV, nous avons effectué des bioessais, dans lesquels, des chenilles *S. frugiperda* au deuxième stade larvaire ont été nourries, ou non, avec une dose sub létale de Calcofluor white avant l'infection par JcDV (**Figure 12**). La mortalité larvaire, évaluée quotidiennement, montre que le traitement par le Calcofluor accélère la mortalité des chenilles infectées. En effet, le temps auquel on peut compter 50% de chenilles mortes (TL50) est de 7 jours pour les chenilles traitées contre 9 jours pour les chenilles non traitées ($p < 0,05$; **Figure 12**). JcDV pourrait traverser la matrice péritrophique plus efficacement lorsque cette dernière est déstructurée, cette modification favorisant ainsi le passage de la barrière intestinale et l'invasion de

T +	+
T -	-

Virus dilutions	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
P_JcDV	+	+	+	-	-
JcDV	-	-	-	-	-

Glycans dilutions	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucosamine	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Syalylactose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GlcNAc	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GalNAc	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 13 : Hémagglutination des érythrocytes par JcDV

Les érythrocytes de lapin ont été incubés avec des dilutions au demi en série de JcDV ou de P_JcDV (concentration initiale de 10^{11} veg/ μ l) pendant 30 min à 37°C. Le contrôle positif d'hémagglutination (T+) a été réalisé en utilisant 25 μ l de WGA (1 mg/ml) au lieu de la dilution du virus. Pour les tests de compétition, des dilutions au demi en série de 25 mM de glycanes ont été incubées avec du P_JcDV avant les tests d'hémagglutination. Le virus semi-purifié (JcDV) a induit une coloration verte dans les puits, signe d'hémolyse et de mélanisation des érythrocytes. Le tableau 2 est un contrôle du pouvoir hémagglutinant du virus JcDV. Le virus purifié (P_JcDV) présente une hémagglutination nette pour les 3 premières dilutions. Le tableau 3 montre l'inhibition d'hémagglutination pour les différents glycanes testés. L'inhibition d'hémagglutination a été obtenue avec 25 mM de GlcNac et GalNac, et 12,5 mM pour le D-Glucosamine. Les D-Fucose, D-Mannose et D-Galactosamine inhibent l'hémagglutination jusqu'à au moins 3 nM (dernière dilution testée).

l'hôte. Ce résultat confirme donc que la matrice péritrophique constitue une barrière limitant l'infection par JcDV, au moins.

Il est à noter que le Calcofluor lui-même induit une mortalité des chenilles non infectées, de 18%, mais tardivement, à 10 jours post traitement. Nous supposons que dans cette condition, c'est l'interférence avec la synthèse de chitine induite par le Calcofluor qui a probablement affecté le développement larvaire (Merzendorfer, 2013).

2. L'interaction de JcDV avec les glycannes de la matrice péritrophique est impliquée dans la pathogenèse virale

La concentration des particules virales observée sur la matrice péritrophique, après leur ingestion par les chenilles (Wang *et al.*, 2013), ainsi que le fait que cette matrice possède une structure hautement glycosylée (chitine et protéines glycosylées) suggéraient que les capsides pouvaient avoir une affinité pour les glycannes, évoquant ainsi une activité lectine portée par la particule virale (Goldstein and Hayes, 1978; Sharon, 2004).

2.1. Le virus JcDV possède un faible pouvoir d'hémagglutination

Afin d'évaluer cette possible activité lectine de JcDV, j'ai tout d'abord testé la capacité des particules virales à agglutiner les érythrocytes, comme le font la plupart des lectines et comme cela a été montré pour plusieurs parvovirus de vertébrés (Tresnan *et al.*, 1995; Marulappa and Kapil, 2009; Huang *et al.*, 2014). J'ai utilisé les hématies les plus couramment utilisées dans les laboratoires, celles de mouton et de lapin. Il s'est vite avéré que les hématies de lapin pouvaient être agglutinées dans certaines conditions par JcDV (**Figure 13**).

En présence de virus semi-purifié (JcDV), une coloration verdâtre des puits est obtenue, empêchant toute lecture. Sous microscope, nous observons que les hématies ont subi une hémolyse et une mélanisation, ce qui correspond à un phénomène bien identifié d'élimination des corps étrangers chez l'insecte (Jiang *et al.*, 2010; Nakhleh *et al.*, 2017) et de ce fait, cette expérience n'a pas pu être poursuivie avec le virus semi-purifié. En présence de P_JcDV, nous observons une hémagglutination caractéristique jusqu'à la 3^{ème} dilution ($6,25 \cdot 10^{11}$ copies/50 μ l), donnant un titre hémagglutinant de 1/8 pour une concentration en hématies de 1,5% au total. Ce résultat indique que le virus purifié est capable d'hémagglutiner les hématies de lapin et donc que la capside (plus particulièrement la protéine VP4, protéine unique de la surface de la capside) aurait une activité lectine, néanmoins assez faible car il faut une grande quantité de virus pour hémagglutiner peu d'hématies.

Par la suite, j'ai réalisé des tests de compétition (inhibition de l'hémagglutination) avec différents glycannes monomériques : GlcNAc, GalNAc, sialylactose, D-glucosamine, Fucose, Mannose et

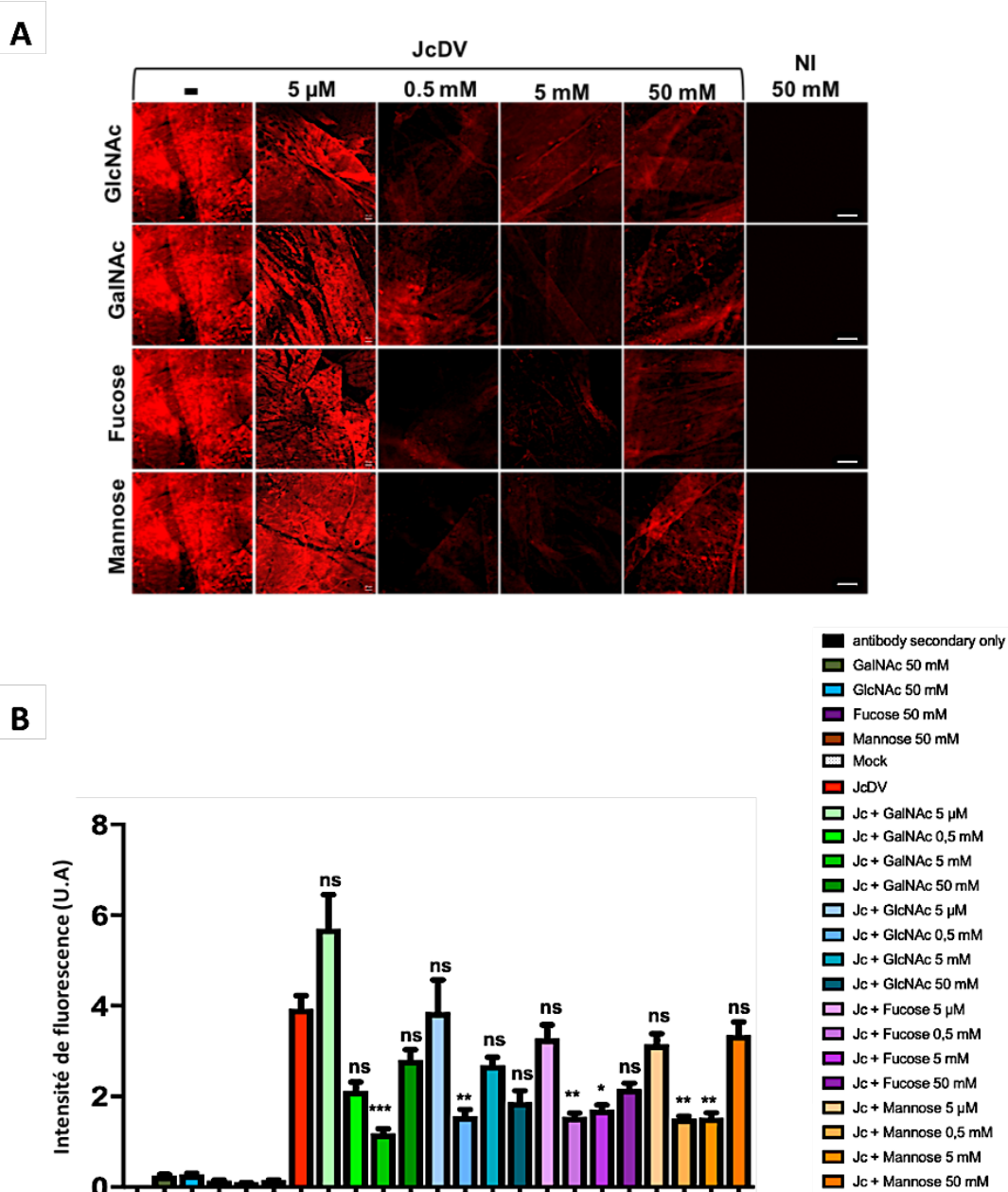


Figure 14 : JcDV interagit avec des glycanes de la MP *ex vivo*.

L'interaction du virus avec la MP a été observé par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-capside. Les MP ont été incubées avec du virus pré-incubé avec du GlcNAc, GalNac, Mannose et Fucose indépendamment à 5 μ M, 0,5 mM, 5 mM et 50 mM. **(A)** Observation de la fluorescence au microscope Zeiss AxioImager Z2, équipé de filtres adaptés pour les marqueurs utilisés, avec les objectifs 40X/1.3 Plan-Apochromat Oil PH3 et 63X/1.4 Plan-Apochromat Oil PH3. La barre d'erreur de 50 μ m. Chaque expérience a été répétée trois fois indépendamment, chaque expérience indépendante ayant donné des résultats similaires, une est représentée ici. **(B)** L'intensité de fluorescence (U.A, unité arbitraire) a été mesurée sur des images en épifluorescence. Ces données sont le résultat de la quantification d'au minimum 10 images issues de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique utilise un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Les p values < 0,05 sont considérées comme significative (ns, non significatif, *, p < 0.05; **, p < 0.01; *** p < 0.001). La condition mock correspond à une MP incubée avec du broyat de chenille non-infectée.

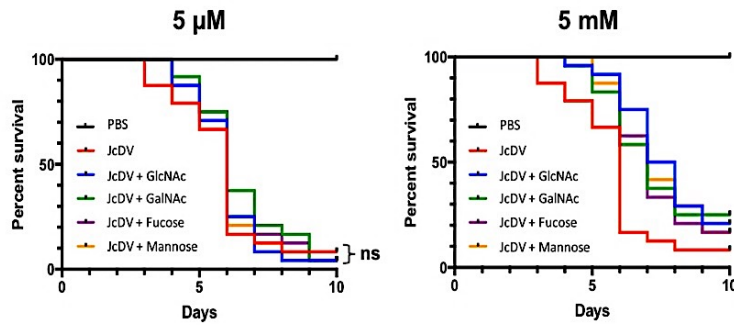
Galactose. Par ces tests d'inhibition, on détermine la concentration minimale de sucre permettant l'inhibition d'hémagglutination (CMI). Les résultats montrent que nous avons une compétition jusqu'à 3 nM de Fucose, Mannose et Galactose, alors que la CMI pour D-glucosamine est de 12,5 mM et celles pour GlcNAc, GalNAc et sialylactose est à la plus forte concentration de 25 mM (**Figure 13**). Ainsi, l'affinité de JcDV n'est pas spécifique d'un seul glycanne ; JcDV aurait une affinité plus importante pour le D Man, D GalN, D Fuc que pour les quatre autres glycannes. Cependant, la reproductibilité de cette expérience laissant à désirer, l'activité lectine potentielle de JcDV a dû être évaluée par d'autres techniques (voir ci-dessous).

2.2. Les monosaccharides libres entrent en compétition avec le virus pour la liaison à la MP (*ex vivo* et *in vivo*)

Pour tester l'affinité de JcDV pour les carbohydrates de la matrice péritrophique de *S. frugiperda*, nous avons mis en place des tests de compétition, *ex vivo* et *in vivo*, en utilisant des glycannes entrant dans la constitution de cette matrice. Les glycannes de la matrice péritrophique sont ceux constituant la chitine, donc le GlcNAc, et ceux constituant les ramifications des protéines glycosylées (les péritrophines), dont on ne connaît pas encore la composition exacte chez *S. frugiperda*. Pour les identifier, j'ai extrait les péritrophines de matrices isolées à partir de chenilles au stade L6 et envoyé les échantillons à la Plateforme d'Analyses des Glycoconjugués (PAGés, responsable scientifique Dr. Yann Guerardel). Dans l'attente des résultats de cette analyse, j'ai donc utilisé le monosaccharide constituant la chitine, la GlcNAc, ou ceux présents sur les protéines d'insecte glycosylées en général, GalNAc, Fucose et Mannose, pour réaliser les expériences de compétition *ex vivo* et *in vivo*.

2.2.1. Compétition *ex vivo* sur matrices péritrophiques isolées

Les tests de compétition *ex vivo* ont été réalisés sur des matrices péritrophiques isolées de l'intestin moyen de chenilles *S. frugiperda* et séparées du bol alimentaire. Le virus JcDV a été préalablement incubé (ou non) avec chacun des 4 glycannes cités ci-dessus, à concentrations croissantes, puis mis en contact avec les matrices isolées pendant 30 min. Après immunomarquage avec un anticorps anti-capside, les matrices péritrophiques ont été observées au microscope à épifluorescence (**Figure 14A**) et les niveaux relatifs de fluorescence ont été quantifiés (**Figure 14B**) comme marqueur de l'attachement du virus sur la matrice et de la modulation de cette interaction par les sucres libres. La **figure 14A** montre que l'interaction de JcDV seul avec les matrices péritrophiques donne un intense signal fluorescent, ce qui suggère une fixation sur la matrice et donc une affinité des capsides de JcDV pour cette structure. La pré-incubation de JcDV avec chacun des quatre glycannes testés entraîne une diminution significative de l'intensité de fluorescence (**Figure 14B**). Cependant, aucune dose-réponse n'est observée, ce qui indique probablement une affinité globale des capsides pour une combinaison de

A

Pairwise comparison	Log-rank (Mantel-Cox)	Gehan-Breslow-Wilcoxon
JcDV + GlcNAc vs JcDV	P value = 0.0024 **	P value = 0,0003 ***
JcDV + GalNAc vs JcDV	P value = 0.0159 *	P value = 0.0075 **
JcDV + Fucose vs JcDV	P value = 0.0131 *	P value = 0.002 **
JcDV + Mannose vs JcDV	P value = 0.0179 *	P value = 0.0038 **

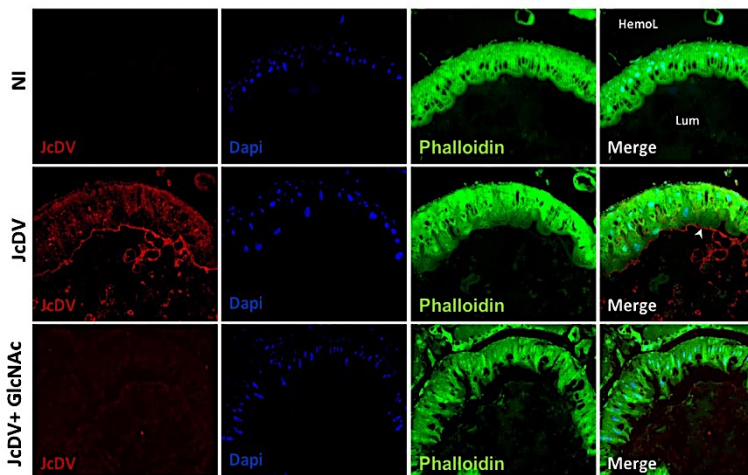
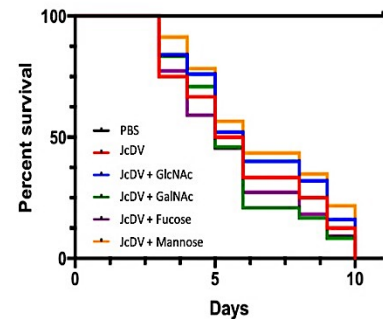
B**C**

Figure 15 : Les glycanes sont impliqués uniquement dans l'infection orale par JcDV.

(A) Courbe de survie de chenilles (n=24) infectées par voie orale avec JcDV ou JcDV pré-incubés avec différents glycanes à 5 µM ou 5 mM ; les chenilles témoins ont été nourries avec une solution de PBS. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, chaque expérience indépendante ayant donné des résultats similaires. Les tests log-rank (Mantel-cox) et Gehan-Breslow-Wilcoxon ont été utilisés pour déterminer les valeurs statistiques. Des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives (*, p<0,05, **, p<0,01, ***, p<0,001). PBS désigne les chenilles témoins (nourries avec du PBS et non infectées). (B) Immunomarquage des coupes transversales semi-fine (1 µm) d'intestin moyen 2 h après l'ingestion de JcDV seul ou de JcDV pré-incubé pendant 1 h avec 5 mM de GlcNAc avant l'infection. Les chenilles témoins ont été nourries avec du PBS. La MP (indiquée par une flèche blanche) marquée en rouge par l'anticorps anti-capside. La phalloïdine-FITC est en vert, JcDV en rouge et les noyaux sont marqués avec du Dapi (bleu). Barres, 30 µm. Lum, lumière de l'intestin moyen ; HemoL, compartiment hémolymphatique (C) Courbes de survie de chenilles (n=24) infectées par injection avec JcDV seul ou JcDV pré-incubé avec 5 mM de glycanes (GlcNAc, GalNAc, Fucose ou Mannose) avant l'infection. Les chenilles témoins ont reçu une injection de PBS. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, chaque expérience indépendante ayant donné des résultats similaires, une est représentée ici. Les tests log-rank (Mantel-cox) et Gehan-Breslow-Wilcoxon ont été utilisés comme tests statistiques. Les valeurs de p<0,05 ont été considérées comme non significatives (ns).

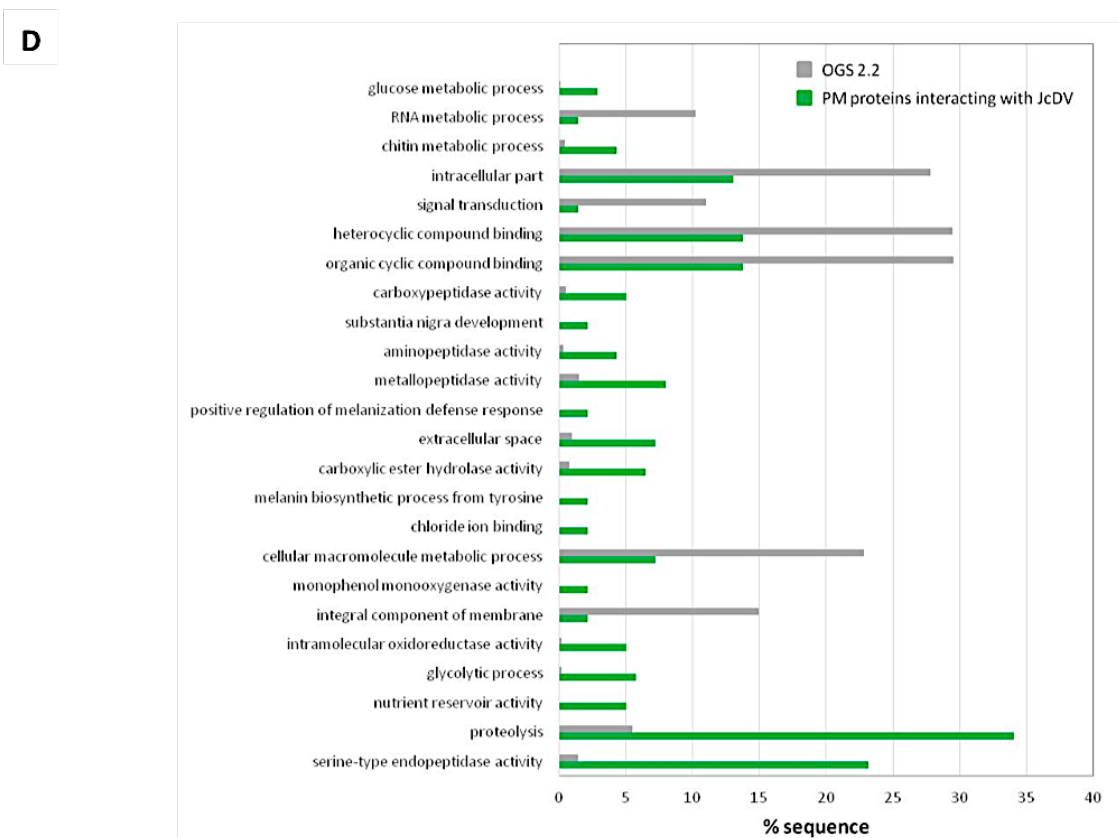
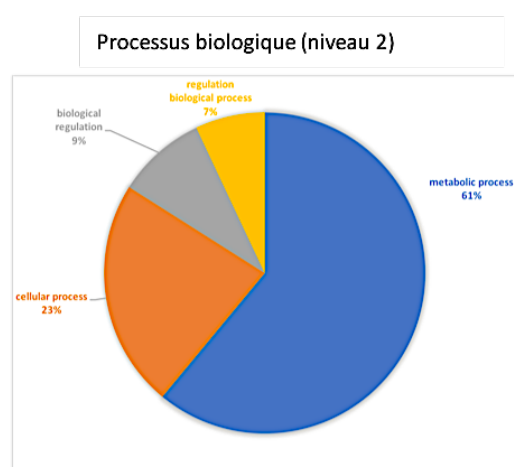
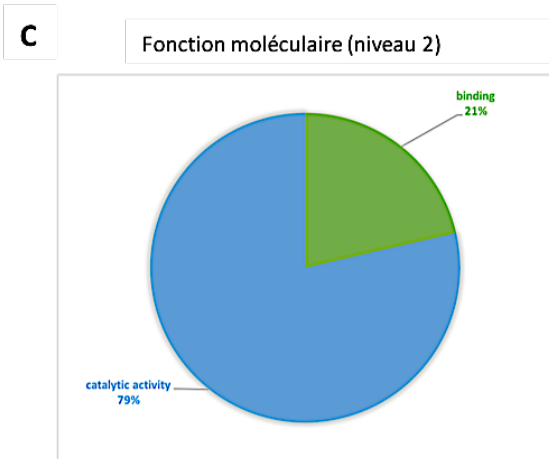
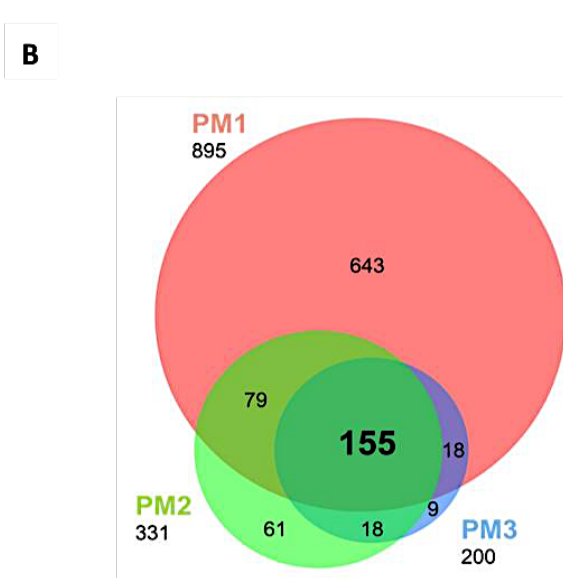
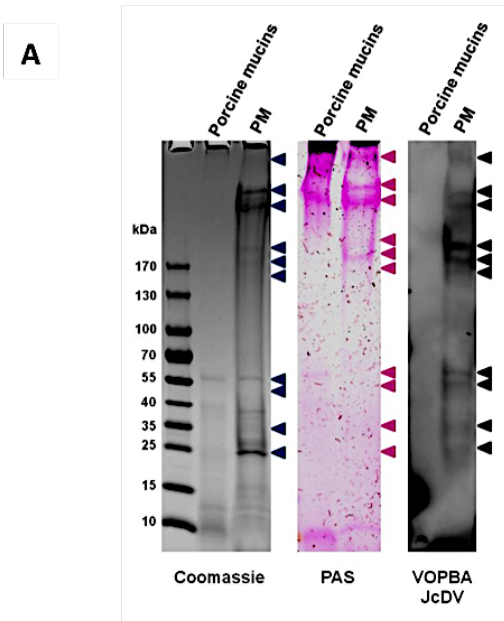
carbohydrates de la matrice péritrophique sans nette spécificité pour l'un d'entre eux, comme nous l'avons pressenti au vu des résultats de l'hémagglutination.

2.2.2. Compétition *in vivo* sur chenilles de *S. frugiperda*

Afin de tester le rôle des glycanes dans le passage de la barrière intestinale par JcDV ainsi que dans la pathogenèse virale, j'ai réalisé le même type de tests de compétition que précédemment mais cette fois-ci *in vivo*. Pour cela, les chenilles ont été infectées *per os* avec le virus JcDV préalablement incubé, ou non, avec 5 μ M ou 5 mM de GlcNAc, GalNAc, Fucose ou Mannose et le TL50 a été déterminé pour chaque traitement. Comme on peut le voir sur la **figure 15A**, à une concentration de 5 μ M, aucun des glycanes n'a d'impact sur l'infection orale des chenilles par JcDV, tandis que la pré-incubation de JcDV avec 5 mM de chacun des quatre glycanes retarde significativement la mortalité des chenilles, comparativement au témoin (TL50 de 7 jours en présence des glycanes à 5 mM contre 6 jours en présence du virus seul; $p < 0,05$), suggérant que chacun des glycanes utilisés pourrait interférer avec l'interaction entre JcDV et la matrice péritrophique *in vivo*. La N-Acétyl-Glucosamine, constituant majeur de la chitine et constituant notable des péritrophines et mucines, sera utilisé comme compétiteur dans la majorité des expérimentations suivantes.

Pour confirmer ces données, nous avons analysé la localisation du virus par immunomarquage sur des coupes semi-fines de l'intestin moyen des chenilles infectées oralement avec du virus pré-incubé ou non avec 5 mM de GlcNAc (**Figure 15B**). Quand le virus est pré-incubé avec du GlcNAc, le signal de fluorescence est diminué aussi bien dans la lumière intestinale qu'au niveau de la matrice péritrophique, confirmant ainsi la compétition du GlcNAc avec la matrice péritrophique pour la liaison à JcDV (**Figure 15B**). De manière intéressante, la réduction de la fluorescence dans le bol alimentaire suggère que le GlcNAc peut probablement entrer également en compétition avec les hydrates de carbone présents dans le bol alimentaire et qui pourraient se lier à JcDV.

Il faut garder à l'esprit que chacun des quatre glycanes utilisés dans les tests de compétition est ubiquitaire et est retrouvé, en particulier, comme composant commun des matrices extracellulaires et des surfaces cellulaires. En considérant une affinité globale de JcDV pour les glycanes ou pour une combinaison d'entre eux, nous pouvons nous attendre à ce que ces glycanes soient également compétitifs pour l'entrée du virus dans les cellules cibles, après le passage de la barrière intestinale. Pour vérifier ce point, nous avons donc testé la capacité des glycanes à limiter l'infection systémique par JcDV, à savoir en injectant directement les particules virales (pré-incubées ou non avec les glycanes) dans l'hémolymphe de la chenille pour contourner la barrière intestinale. Comme le montre la **figure 15C**, aucune différence significative n'est observée entre les taux de survie des chenilles de cohortes injectées avec du JcDV pré-incubé ou non, indiquant que l'affinité de JcDV pour les glycanes est probablement beaucoup moins importante dans la dynamique de l'infection une fois passée la barrière intestinale.



3. JcDV interagit avec plusieurs péritrophines de la matrice péritrophique de *S. frugiperda*

Les péritrophines de l'intestin moyen sont peu conservées entre les espèces, bien qu'elles soient tout de même étroitement apparentées et sont largement représentées dans la matrice péritrophique (*cf* Introduction) (Tellam and Eisemann, 2000; Terra, 2001; Hegedus *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2018). Leur diversité chez *S. frugiperda* est peu caractérisée (Bolognesi *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2018).

3.1. JcDV interagit *in vitro* avec des protéines glycosylées de la matrice péritrophique

Afin d'explorer les interactions JcDV/péritrophines, les protéines de la matrice péritrophique de *S. frugiperda* ont été extraites et séparées par SDS-PAGE (voir § Matériels et Méthodes). Ces protéines ont tout d'abord été colorées, dans le gel de polyacrylamide, avec du bleu de Coomassie pour visualiser les protéines totales, ou à l'aide d'acide périodique de Schiff (PAS) pour visualiser les protéines glycosylées. Une mucine hétérologue provenant d'intestin de porc a été également déposée sur gel comme contrôle de protéines hautement glycosylées (PM>250 kDa) (**Figure 16**, ligne 1). Il faut savoir que les protéines hautement glycosylées, les mucines en particulier, migrent mal dans les gels de polyacrylamide en raison de leurs très nombreuses ramifications de O-glycannes. Les résultats présentés en **Figure 16** révèlent la présence, dans la matrice péritrophique de *S. frugiperda*, de protéines de poids moléculaire supérieur à 250 kDa, vraisemblablement hautement O-glycosylées d'après la coloration de Schiff, et qui pourraient correspondre à des protéines de type mucines. Des protéines glycosylées sont également observées à des poids moléculaires moins élevés, allant de 150 et 200 kDa. Un petit nombre de bandes sont colorées en Schiff comparativement à quantité de protéines totales révélées par le bleu de Coomassie, ce qui indique que peu de protéines de la matrice sont glycosylées, même si les protéines glycosylées sont certainement les plus importantes fonctionnellement.

Pour identifier les péritrophines avec lesquelles le virus JcDV peut interagir, les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose et soumises à un Far Western blot ou Virus Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) (Edmondson and Dent, 2001) en utilisant du virus JcDV révélé par un anticorps anti-capside. Les bandes protéiques ainsi révélées (10 à 13 selon les répliques) sont, selon les cas, de haut ou de bas poids moléculaire, fortement (bande 1 à 6) ou peu/pas glycosylées (bandes 8 à 11) (**Figure 16A**). L'analyse protéomique réalisée sur ces bandes, en utilisant comme référence les séquences protéiques inférées du génome de référence de *S. frugiperda* (OGS 2.2), a permis d'identifier 895 protéines pour le replica 1, 331 pour le second et 200 pour le troisième avec 155 protéines communes aux 3 répliques (**Figure 16B**). Parmi ces 155 protéines, 138 sont annotées parmi lesquelles nous trouvons beaucoup de Sérine protéases, des ATP-binding cassette A de type 5 (ABCA 5) autour de 190 et 170 kDa, des APN dans les bandes de hauts poids moléculaires, des mucines intestinales et des protéines de liaisons à la chitine (**Figure 16B**) (**Annexe1 Tableau S1**). Ces résultats nous montrent que nous avons bien des péritrophines de types mucines dans notre extrait de protéines

Figure 16 : Analyse protéomique des protéines de la MP interagissant avec JcDV.

(A) Les péricitrophines ont été extraites de la MP et séparées par SDS-PAGE comme décrit dans le M&M. Trente μg de mucines de porc ont également été chargés dans le gel en tant que témoin de protéines hautement O-glycosylées. Les protéines ont ensuite été colorées au bleu de Coomassie ou à l'acide périodique Schiff (PAS, rose) afin de visualiser les protéines totales ou glycosylées, respectivement, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose et incubées avec le JcDV et l'anticorps anti-capside. PM, protéines extraites de la matrice péricitrophine. Les protéines interagissant avec les capsides de JcDV ont finalement été révélées par chimioluminescence (flèches noires). Les flèches bleue et rose indiquent la position correspondante de ces protéines dans un gel coloré respectivement au PAGE-bleu ou au PAS. (B) Diagramme de Venn des trois répliques de protéomique réalisé à partir des protéines identifiées par protéomique comme interagissant avec JcDV en VOPBA. Nous avons 155 protéines communes aux trois répliques ; parmi elles, 138 protéines ont pu être annotées. (C) Les protéines identifiées avec au moins 2 peptides uniques ont été assignées selon les termes de l'ontologie génique (GO) avec un $\text{FRD} < 0,01$ en utilisant le logiciel Blast2Go²² (Conesa *et al.*, 2005). L'enrichissement par rapport à la référence (OGS2.2_proteins_20151204.fasta) a été représenté par un diagramme, montrant les fonctions de ces péricitrophines. (D) La distribution des termes GO des protéines assignées est représentée par des « camemberts » pour les catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire » de niveau 2.

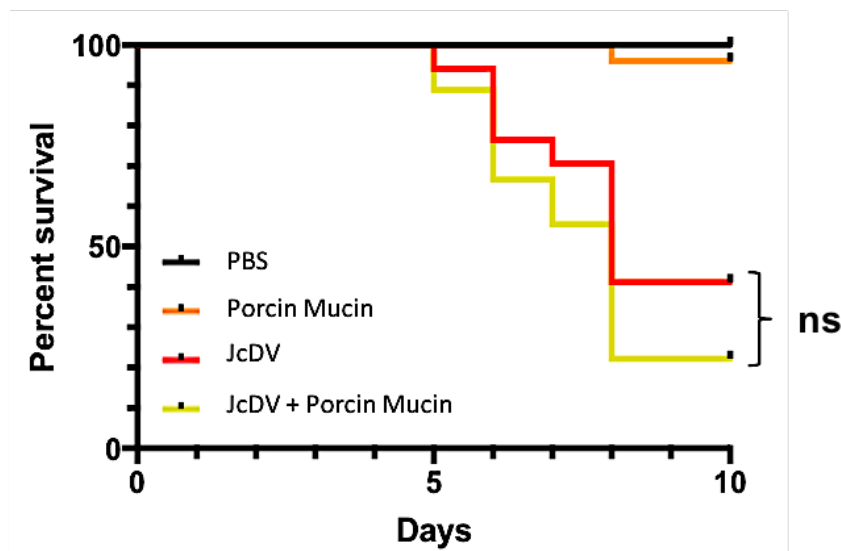


Figure 17 : L'utilisation de mucines hétérologues en compétition n'inhibe pas la virulence de JcDV.

Courbes de survie de chenilles ($n = 24$) infectées par alimentation avec JcDV seul ou avec JcDV incubées pendant 1 h avec 7 mM de mucine de porc avant l'infection. Les chenilles témoins (non infectées) ont été nourries avec du PBS. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, chaque expérience indépendante ayant donné des résultats similaires, une seule est représentée ici. Les tests log-rank (Mantel-cox) et Gehan-Breslow-Wilcoxon ont été utilisés comme tests statistiques. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (ns, non significatives).

²² <https://www.blast2go.com/>

de MP et que le virus interagit avec celles-ci. Les fonctions attribuées aux gènes sont représentées par des secteurs ou « camemberts » (Processus Biologiques et Fonctions Moléculaires, niveau 2 (**Figure 16C**)). L'annotation de ces protéines selon l'ontologie génique (GO) met en évidence un enrichissement, entre les GO de référence et les GO obtenus après analyse, en activité protéolytique, plus particulièrement avec des endopeptidases de type sérine, ainsi qu'en métabolisme de la chitine et du glucose. L'ensemble est cohérent avec l'activité d'un intestin et le renouvellement permanent de la matrice péritrophique (**Figure 16D**).

3.2. L'interaction JcDV/péritrophines semble spécifique des péritrophines d'insecte

Nous notons qu'aucune interaction n'a été révélée avec la mucine porcine hétérologue, suggérant que les interactions mises en évidence entre la capsid de JcDV et les péritrophines de lépidoptères sont spécifiques. Afin d'étayer ce résultat, des tests de compétition ont été réalisés *in vivo* chez les chenilles de *S. frugiperda* infectées par voie orale, comme en 2.2.2., avec du virus JcDV pré-incubé ou non avec la mucine porcine. Aucune différence significative n'a été observée dans la survie des chenilles infectées par JcDV en présence, ou pas, de la mucine hétérologue (**Figure 17**), confirmant ainsi la spécificité des interactions JcDV/péritrophines observées chez l'insecte. Nous ne pouvons pas pour l'instant affirmer que cette interaction avec les péritrophines est spécifique de notre chenille *Spodoptera frugiperda*, pour cela il faudrait évaluer l'impact d'une préincubation du virus avec des péritrophines d'autres insectes sur les courbes de survies (Wang and Granados, 1997; Wijffels *et al.*, 2001; Zhang and Guo, 2011).

3.3. Le virus mutant 8m a une affinité pour les protéines glycosylées de haut poids moléculaire de la matrice péritrophique

Nous avons également voulu étudier, par Far Western blot, l'interaction du virus mutant 8m avec les péritrophines de la matrice péritrophique. En effet, le virus 8m est un mutant de capsid qui pénètre dans l'épithélium intestinal selon un mécanisme différent de celui utilisé par le virus sauvage et qui présente un retard dans la mortalité larvaire induite par l'infection orale (Multeau *et al.*, 2012). Nous nous sommes donc demandé si le virus 8m interagissait avec les mêmes interactants que le virus JcDV sauvage au niveau de la matrice péritrophique. Les résultats de VOPBA blot présentés en **Figure 18** révèlent que le virus 8m interagit avec les protéines glycosylées de hauts poids moléculaires (entre 170 et 250 kDa). Ces données nous montrent que le 8m interagit donc de la même façon que le virus WT au niveau de la matrice péritrophique. Ces données restent encore à être vérifiées et validées.

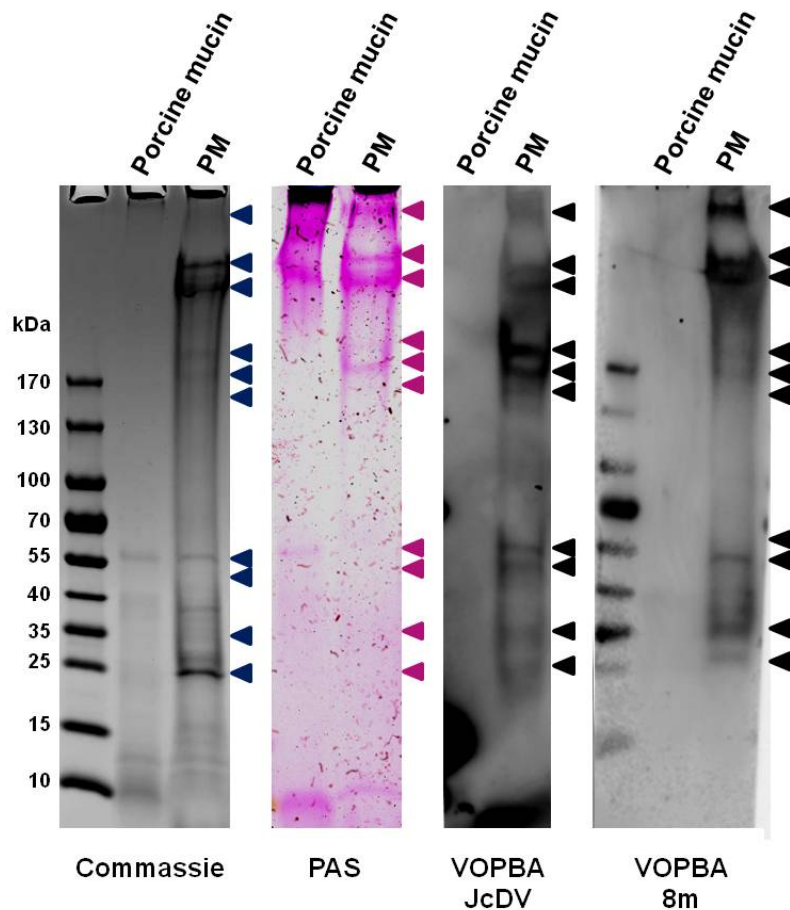


Figure 18 : Analyse d'interaction du virus mutant 8m avec les péritrophines de la MP.

Les péritrophines ont été extraites des MP et s par es par SDS-PAGE comme décrit dans le M&M. Trente μg de mucines de porc ont également été charg es dans le gel en tant que témoin de protéines hautements O-glycosylées. Les protéines ont ensuite été colorées au bleu de Coomassie ou à l'acide périodique Schiff (PAS, rose) afin de visualiser les protéines totales ou glycosylées, respectivement, puis transf r es sur des membranes de nitrocellulose et incub es avec le mutant 8m et l'anticorps anti-capside du JcDV. Les protéines interagissant avec les capsides de JcDV ont finalement été révélées par chimioluminescence (flèches noires à droite).

En résumé :

L'ensemble de ces résultats montre que la liaison de JcDV aux composants de la matrice péritrophique est pertinente et permet aux particules virales de se concentrer à proximité des bordures en brosse de l'épithélium intestinal, pour favoriser le franchissement de la barrière intestinale et atteindre les tissus cibles. Les quelques résultats obtenus en utilisant des sucres libres comme compétiteurs de l'interaction ne nous permettent pas d'augurer précisément de la nature des sucres impliqués dans l'interaction entre matrice péritrophique / protéines associées d'une part et virus JcDV d'autre part. Néanmoins, GlcNAc, GalNAc et Fucose mais aussi Mannose déplacent l'interaction. Nous pourrions interpréter ces données comme la reconnaissance par le virus d'un motif complexe N-glycannique présentant des sites di-fucosylés (alpha 1, 3 et alpha 1,6) sur un *core* paucimannosidique avec un GlcNAc terminal et peut-être un GalNAc comme dans la structure Lewis (Rendić and Wilson, 2008; Schiller *et al.*, 2012). Une caractérisation plus poussée des glycoprotéines nous permettra de répondre à ces hypothèses.

4. L'interaction de JcDV avec la matrice péritrophique modifie son ultrastructure

Les pathogènes ont développé des mécanismes spécifiques qui perturbent les matrices péritrophiques, leur permettant ainsi d'atteindre l'espace ectopéritrophique et l'épithélium intestinal (Rees *et al.*, 2009). L'interaction spécifique de JcDV avec la matrice péritrophique pose la question de savoir comment les particules virales traversent cette barrière pour atteindre l'épithélium intestinal sous-jacent. Les densovirus sont des petits virus dont la protéine VP4 apparaît seule à la surface de la capsid, sans activité chitinase ou protéasique connue. En revanche, l'activité *lectine-like* du virus pourrait déplacer l'interaction entre les fibres de chitine et les péritrophines, ce qui conduirait à la désorganisation de la matrice péritrophique et favoriserait par conséquent le passage du virus en augmentant la taille des pores de celles-ci.

1. JcDV affecte l'ultrastructure de la matrice péritrophique ex vivo

Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé *ex vivo* l'impact de l'interaction entre JcDV et la matrice péritrophique sur l'ultrastructure de celle-ci. Pour cela, des matrices péritrophiques isolées ont été incubées avec du virus JcDV pendant 30 min et 2 h à pH 7 puis préparées pour l'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB). Dans ces conditions, l'ultrastructure des matrices péritrophiques semble désorganisée, présentant de larges zones montrant des pores de taille visiblement plus importante que celle des matrices contrôles (matrices péritrophiques incubées avec des extraits de chenilles non infectées, Mock) (**Figure 19A**). Le diamètre des pores mesuré varie entre 5 et 50 nm aux deux temps, ce qui est significativement plus grand que le diamètre des pores mesurés dans les conditions contrôles non-infectées Mock (diamètre entre 5 et 25 nm, en prenant en compte les mesures de part et d'autre des

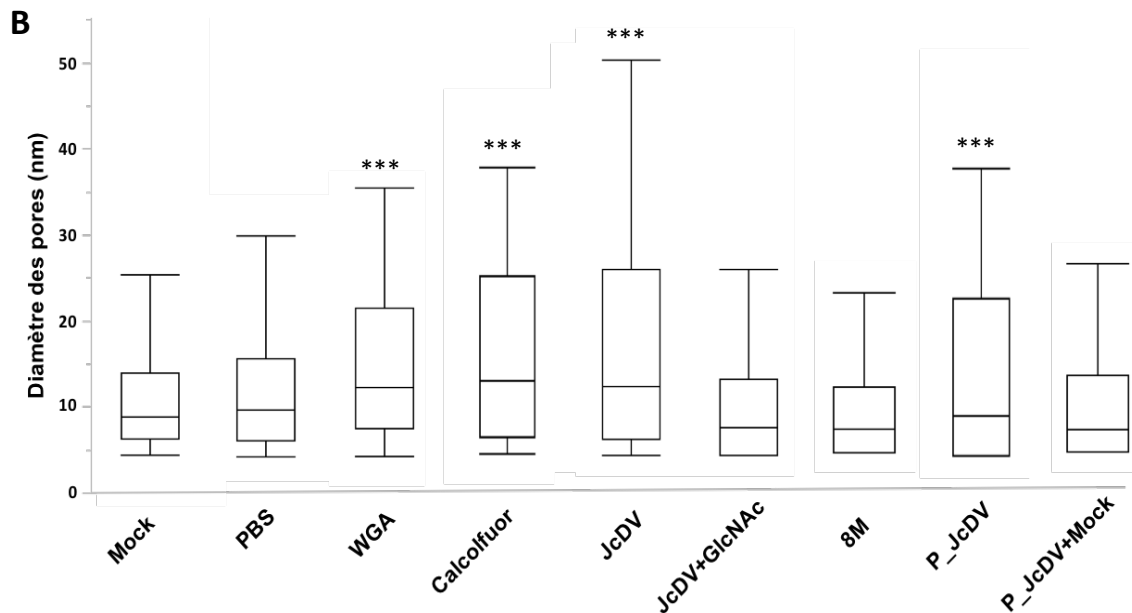
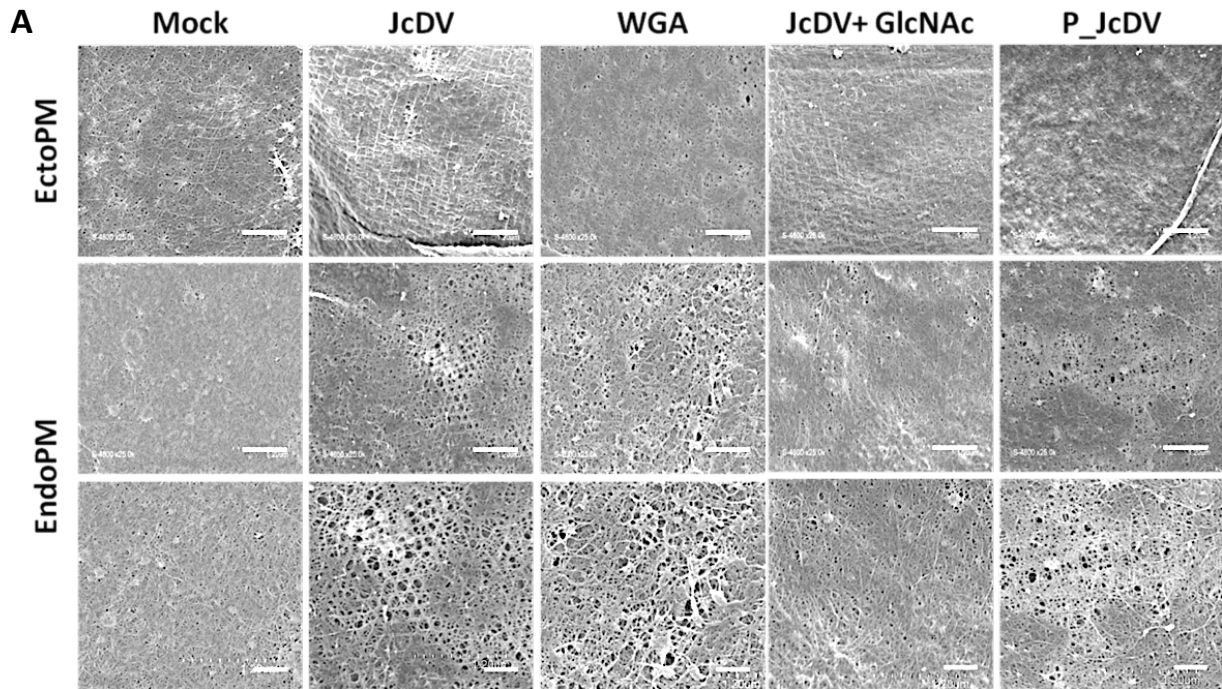


Figure 19 : JcDV induit une destruction de la MP 30 min p.i (pH7), *ex vivo*.

Les MP ont été isolées puis traitées à pH 7 pendant 30 min avec différentes conditions : contrôle Mock (MP incubée avec du broyat de chenille non-infectée) et PBS, JcDV, JcDV pré-incubé avec du GlcNAc, P_JcDV, P_JcDV + Mock (virus purifié incubé avec du broyat de chenille non infectée), le mutant 8m, WGA à 0,1%, Calcofluor 1%. La WGA et le calcofluor sont des contrôles positifs de destruction de la MP. **(A)** Image de MEB montrant les face endo- et ecto-péritrophiques de la MP (endoPM, du côté du bol alimentaire ; ectoPM, côté microvillosité de l'épithélium intestinal). La surface est très destructurée en présence de JcDV. Barre d'échelle 50µm. **(B)** Mesure du diamètre des pores avec l'outil d'imagerie Fiji software. Le test Tukey-Kramer a été utilisé pour déterminer les valeurs statistiques entre les différentes conditions et le contrôle Mock. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (***, $p < 0,001$).

« moustaches » [*Box and Whiskers Plot*] (**Figure 19B**). Fait intéressant, ces caractéristiques sont observées seulement sur la face endopéritrophique (endoMP, face à la lumière intestinale, côté bol alimentaire), l'aspect de la face ectopéritrophique (ectoMP, face à l'épithélium intestinal) restant inchangé (**Figure 19A**). Ces résultats suggèrent une destructuration de la chitine et/ou de la couverture de péritrophines étayant ainsi notre hypothèse. Il convient de noter que ce résultat souligne également le fait que l'organisation et/ou l'accès des composants de la matrice péritrophique sont différents sur les deux faces de cette dernière.

2. L'activité lectine de JcDV est impliquée dans la désorganisation de l'ultrastructure de la matrice péritrophique

Afin de déterminer la cause de cette désorganisation de la matrice péritrophique, nous avons testé si l'activité *lectin-like* de la capsid pouvait désorganiser la matrice péritrophique de manière similaire à la lectine WGA (Harper *et al.*, 1998). Pour cela, j'ai incubé la matrice péritrophique avec de la WGA pendant 30 min puis analysé sa surface par MEB. Contrairement aux résultats obtenus avec le virus JcDV (entre 5 et 50 nm), les zones de dégradation observées sont moins importantes sur les matrices pour la condition WGA, mais la mesure des pores indique des diamètres significativement supérieurs (entre 5 et 35 nm) à ceux des matrices péritrophiques contrôles traitées avec du broyat non-infecté (**Figure 19**). Pour confirmer que les effets observés avec JcDV dépendent bien de l'activité *lectin-like* de la capsid, j'ai alors réalisé un test de compétition, en pré-incubant le virus avec du GlcNAc avant l'incubation avec les matrices péritrophiques, puis j'ai analysé la surface de celles-ci par MEB et mesuré le diamètre des pores. Dans ces conditions, aucun impact significatif sur la structure de la matrice péritrophique n'est alors observable et le diamètre des pores mesurés, entre 5 et 25 nm, reste équivalent à celui des pores sur les matrices contrôles non-infectées (**Figure 19**). Ces résultats suggèrent que la destructuration des matrices péritrophiques est bien la conséquence de l'interaction de JcDV avec un glycanne, portant notamment GlcNAc mais sans avoir tout à fait le même effet que la lectine WGA.

3. Un co-facteur serait nécessaire pour la désorganisation de l'ultrastructure de la matrice péritrophique

L'effet du virus purifié sur gradient (P_JcDV), du virus mutant 8m ainsi que du calcofluor (comme contrôle de la destructuration des mailles de chitine) ont également été analysés à pH 7 après 30 minutes et 2 h d'incubation (**Figure 19, 20**).

En présence de calcofluor, les matrices présentent une désorganisation réduite par rapport à celles modifiées après une incubation avec le virus semi-purifié, avec une taille de pores également réduite à 30 min (entre 5 et 38 nm). Par contre, à 2 h en présence de calcofluor, la matrice est plus désorganisée et les pores de diamètre plus importants qu'avec JcDV semi-purifié (entre 5 et 60 nm) (**Figure 20**).

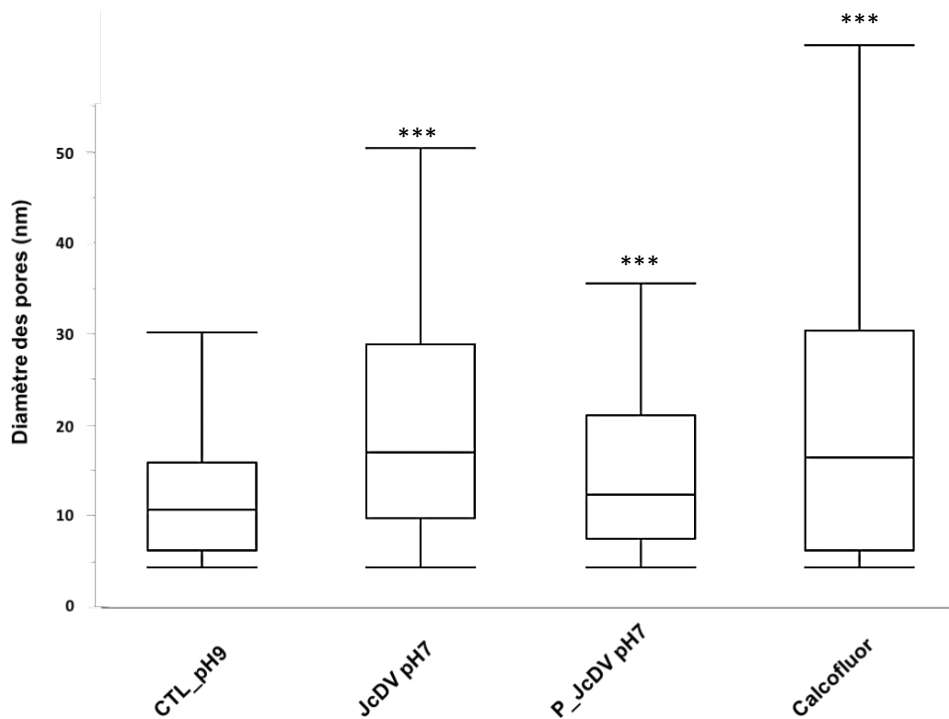


Figure 20 : JcDV induit une destructuration de la MP 2h pH7 p.i, *ex vivo*.

Mesure du diamètre des pores avec l’outil d’imagerie Fiji software. Les MP ont été isolées puis traitées avec différentes conditions : CTL_pH9 correspond à une MP non-traitée et non-infectée (contrôle) (Au temps 30 min, le contrôle pH7 et le CTL_pH9 sont significativement similaires). JcDV, P_JcDV et le calcofluor 1% ont été préparés dans une solution de PBS à pH 7 et incubés 2h. Le calcofluor est un contrôle positif de destructuration de la MP. P_JcDV + Mock correspond à du virus purifié pré-incubé avec du broyat de chenilles non-infecté. Le test Tukey-Kramer a été utilisé pour déterminer les valeurs statistiques. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (***, $p < 0,001$). Les significativités sont indiquées par comparaison avec le contrôle CTL-pH9.

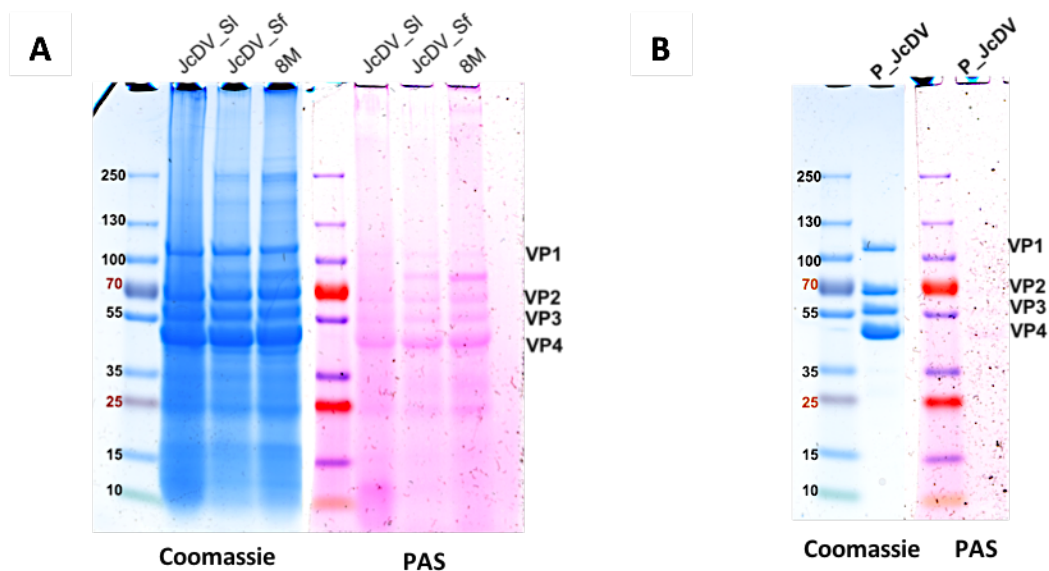


Figure 21 : Les protéines de capsid de JcDV semblent glycosylées en coloration PAS.

Les particules virales de JcDV ont été dénaturées puis séparées par SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été colorées au bleu de Coomassie ou à l'acide périodique Schiff (PAS, rose) afin de visualiser les protéines totales ou glycosylées, respectivement. (A) JcDV_Sl correspond à du broyat de *S. littoralis* infecté par JcDV, JcDV_Sf correspond à du broyat de *S. frugiperda* infecté par JcDV, 8m à du broyat de *S. frugiperda* infecté avec le virus mutant 8m Les protéines de capsid du mutant 8m semblent être plus fortement glycosylées que les VP des deux JcDV WT. (B) P_JcDV correspond au JcDV purifié sur gradient. Nous notons une légère coloration des protéines de capsid VP2, 3 et 4, moins importante que le JcDV issu de broyat de chenilles infectées (A).

En présence de P_JcDV, les matrices présentent une désorganisation réduite par rapport à celles modifiées par le virus semi-purifié, avec une taille de pores réduite à 30 min et à 2 h (entre 5 et 38 nm). Ces résultats suggèrent donc qu'un co-facteur présent dans l'inoculum semi-purifié, associé à la capsidie ou non, participe à la désorganisation de la matrice péritrophique, et favorise alors le passage des particules virales dans le compartiment ectopéritrophique. Un tel co-facteur pourrait être une molécule ou un ensemble de molécules, quelle qu'en soit la nature et l'origine, préexistant dans la lumière intestinale de la chenille. Pour explorer cette possibilité, nous avons donc soumis la matrice péritrophique à une incubation avec P_JcDV, additionné d'un extrait de chenilles non-infectées (condition "P_JcDV+Mock"). De manière inattendue, la taille des pores (entre 5 et 26 nm de diamètre) et les surfaces affectées ne sont pas significativement différentes de celles obtenues avec la condition Mock, ce qui suggère que le co-facteur, s'il existe, pourrait être induit, ou activé, au cours de l'infection virale. Il est également possible d'envisager que dans l'extrait de chenille non-infectées, il y ait une molécule capable d'inhiber l'activité intrinsèque de P_JcDV de destruction de la matrice péritrophique.

Enfin, les mutations effectuées sur la capsidie du virus 8m semblent affecter sa capacité à désorganiser la matrice péritrophique, car le diamètre des pores mesurés se situe entre 5 et 24 nm, tout comme la condition Mock. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, le retard observé de mortalité des chenilles suite à l'infection *per os* par ce virus mutant par rapport au virus sauvage (Multeau *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013b).

4. Les protéines de capsidie de JcDV semblent être glycosylées

L'intervention possible d'un co-facteur pour initier l'infection nous a poussés à nous poser la question d'une possible interaction indirecte du virus avec la matrice péritrophique, et donc de l'éventuelle intervention d'un intermédiaire, de type lectine binaire (*C-type lectin*), entre la particule virale et les glycanes de la matrice péritrophique. Si tel est le cas, la capsidie du virus devrait être glycosylée. Pour tester cela, nous avons déposé sur gel SDS-PAGE du virus JcDV, ainsi que du P_JcDV et du virus mutant 8m, et réalisé une coloration des protéines totales ainsi séparées à l'aide de bleu de Coomassie et une coloration des protéines glycosylées à l'aide de PAS (comme en 3.1.). En bleu de Coomassie, nous pouvons voir les protéines de capsidie VP1, VP2, VP3 et VP4, à 110 kDa, 70 kDa, 55 kDa et 47 kDa, respectivement. Avec la coloration PAS, nous observons que toutes les protéines de capsidie sont glycosylées pour le JcDV (**Figure 21**). La coloration des protéines de capsidie est plus marquée encore pour le virus 8m, avec la mise en évidence d'une protéine supplémentaire de 90kDa environ. Dans le cas du P_JcDV, les protéines de capsidie ne sont pas ou très peu glycosylées, ou détectables par cette technique. La protéine de 90 kDa peut être cellulaire ou pourrait correspondre à une VP dont la glycosylation différencierait de celle du virus sauvage. Afin de vérifier la nature virale de cette protéine, un western-blot anti-protéines de capsides est actuellement en cours.

Bien qu'il faille prendre toutes les précautions liées à un possible faux-positif, plusieurs fois évoqué dans la littérature (Murray *et al.*, 2006; Mitchell, 2008), la capsid de JcDV semble glycosylée, et donc l'hypothèse d'une lectine, notamment une lectine de type-C (Cummings and McEver, 2009; Bermejo-Jambrina *et al.*, 2018), impliquée dans l'interaction de JcDV avec la matrice périréplique est envisageable. L'activité de ces lectines étant calcium-dépendante, nous pourrions vérifier notre hypothèse en testant l'effet d'un chélateur de calcium (EDTA par exemple) sur la capacité du virus à interagir avec la matrice périréplique et à la désorganiser.

Afin de prédire *in silico* les sites potentiels de glycosylation sur les protéines structurales (VP), nous avons soumis les séquences de la plus grande protéine structurale, VP1, de quelques *lepidopteran Ambidensoviruses 1* (JcDV [AGO32183.1], *Galleria melonella* DV [AAA66966.1], *Mythimna loreyi* DV [AAR30040.1] et le mutant 8m de JcDV (Multeau *et al.*, 2012) à l'analyse des sites de N-Glycosylation en utilisant le serveur en ligne NetNGlyc 1.0 Server qui prend en compte l'environnement structural des séquences cibles Asn-Xaa-Ser/Thr (**Figure 22**). Même si nous sommes conscients des précautions à prendre pour envisager la N-Glycosylation de protéines ne possédant pas de *signal peptide*, nous avons tout de même relevé que les séquences analysées montrent trois cibles communes de N-glycosylation potentielle mais aussi des différences, localisées pour certaines sur des structures importantes de la surface du virion. Toutefois, une analyse plus précise nous a fait ignorer la séquence NDTA 566-569 commune à GmDV et au mutant 8m (non soulignée) qui aurait pu affecter la surface à proximité de la protubérance majeure mais qui ne présente pas un score suffisant. Le site potentiel NV/ITE introduit dans le mutant 8m et naturellement présent dans la séquence de VP1 de MIDV pourrait introduire un site potentiel de glycosylation à la position 305, celle-ci n'étant vraisemblablement pas susceptible de modifier les propriétés de ce mutant considéré comme « neutre » (Multeau *et al.*, 2012).

Nous avons aussi soumis les mêmes séquences au serveur en ligne NetOglyc 4.0 Server, qui produit des prévisions en réseau de sites de O-glycosylation de GalNAc (Steentoft *et al.*, 2013), modification fréquemment associée aux protéines de type mucine mais aussi à d'autres protéines du compartiment nucléo-cytoplasmique pour ce qui est de la O-GlcNAcylation. Bien que l'outil soit initialement dédié et validé avec des protéines de mammifère, la machinerie enzymatique responsable de telles modifications post-traductionnelles est bien conservée au cours de l'évolution (Wandall *et al.*, 2007). Ainsi, nous avons considéré les résultats comme une bonne approximation des régions locales susceptibles de porter sur les sérines, les thréonines et, plus rarement, les tyrosines des additions de O-GalNAc plutôt que des sites individuels de glycosylation. Pour les séquences ambidensovirales testées (JcDV [AGO32183.1], *Galleria melonella* DV [AAA66966.1], *Mythimna loreyi* DV [AAR30040.1] et JcDV, mutant 8m (Multeau *et al.*, 2012), nous observons une multitude de cibles possibles de O-glycosylation organisées en clusters entre les résidus 274-538 (numérotation VP1 JcDV) avec peu de différences entre eux (**Figure 23**). Si elle était réelle, une telle modification affecterait principalement les propriétés de la partie « non VP4 » de la molécule qui est supposée être enfouie dans la capsid. Nous notons toutefois

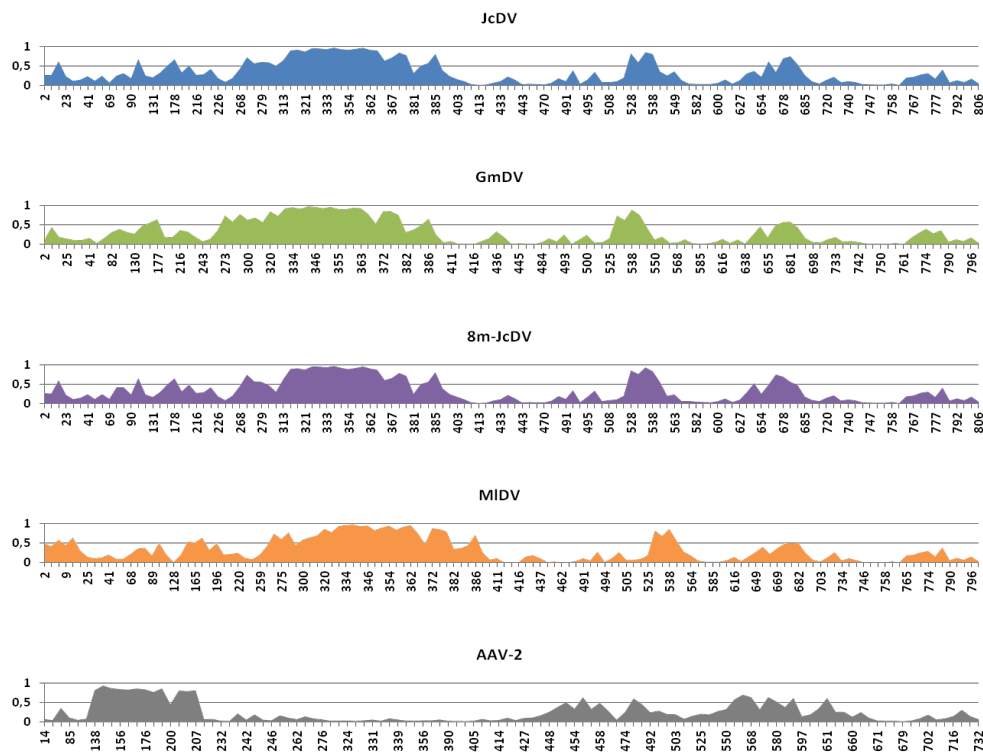


Figure 23 : Des sites potentiels de O-glycosylation pourraient être présents sur les protéines structurales (VP1) des Lepidopteran Ambidensovirus 1.

Les indices (> 0 à 1) de la glycosylation potentielle ont été obtenus à partir du serveur NetOGlyc 4.0 en ligne et représentés avec un graphique pour chacun des types MIDV, GmDV, JcDV et leurs mutants 8M. L'axe des ordonnées représente l'indice, les catégories le long de la référence de l'axe des abscisses sont numérotées après la position de l'acide aminé potentiellement glycosylé sur la séquence.

que la séquence VP du virus JcDV, ainsi que de son mutant 8m, possèdent par rapport aux autres séquences de *Lepidopteran ambidensovirus* 1, un groupe d'acides aminés dont la possible O-glycosylation est plus marquée entre les résidus 674 et 680 (numérotation JcDV VP1) qui pourrait affecter la protéine VP4, la seule exposée sur la capside.

5. Le pH ne semble pas avoir d'effet sur la désorganisation de la matrice péritrophique

Toutes les expériences décrites précédemment ont été réalisées dans des conditions de pH neutre (pH=7,4 solution tampon de PBS). J'ai donc testé les conséquences de l'interaction du virus avec la matrice péritrophique à pH physiologique de l'intestin d'insecte, à savoir pH 9, afin de déterminer si le pH a une influence sur la capacité du virus à désorganiser la matrice péritrophique. Nous constatons que la taille des pores est significativement augmentée lorsque l'on incube la matrice péritrophique avec JcDV (5 à 62 nm au temps 30 min et 5 à 50 nm à 2 h), P_JcDV (5 à 35 nm à 30 min et 5 à 50 nm à 2h) et le Calcofluor (5 à 35 nm à 30 min et 5 à 50 nm à 2 h) par rapport à la condition contrôle CTL_pH9 (5 à 25 nm à 30 min et 5 à 30 nm à 2 h) (**Figure 24**). Étonnement, à 30 min d'incubation, nous n'avons pas constaté d'effet pH de manière significative sur l'augmentation de la taille des pores, quelles que soient les conditions (JcDV pH 7 *versus* JcDV pH 9 et P_JcDV pH 7 *versus* P_JcDV pH 9) (**Figure 25**).

De façon synthétique, nous pouvons dire que les effets sur la taille des pores à pH 7 et 30 min sont tels que JcDV>P_JcDV/Calcofluor>8m/P_JcDV+Mock/Mock et à 2h nous obtenons Calcofluor>JcDV>P_JcDV>CTL_pH9 (pour ce temps j'ai pris le CTL_pH9 car les deux pH n'ont pas de différence significative). Quant au pH 9, nous avons à 30 min JcDV>P_JcDV/Calcofluor>CTL_pH9 et à 2 h JcDV>P_JcDV>Calcofluor>CTL_pH9. Étonnement, nous ne constatons pas d'effet "temps", bien que nous puissions présumer d'un effet plus important à 2 h qu'à 30 min. Le 8m n'a pas pu être intégré dans les expérimentations en condition pH 9.

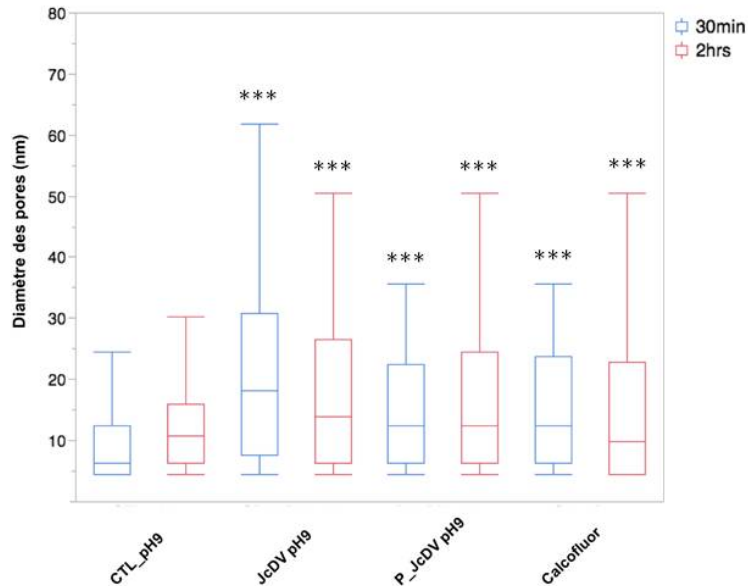


Figure 24 : JcDV induit une destructuration de la MP à 30 min et 2h pH9 post-infection, *ex vivo*.

Mesure du diamètre des pores avec l’outil d’imagerie Fiji software. Les MP ont été isolées puis traitées avec différentes conditions : CTL_pH9 correspond à une MP non-traitée et non-infectée (contrôle). JcDV, P_JcDV et le Calcofluor 1% ont été préparés dans une solution de PBS à pH 9 et incubés 30 min et 2h avec les différentes conditions. Le Calcofluor est un contrôle positif de destructuration de la MP. Le test Tukey-Kramer a été utilisé pour déterminer les valeurs statistiques. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (***, $p < 0,001$). Les significativités sont indiquées par comparaison au contrôle correspondant.

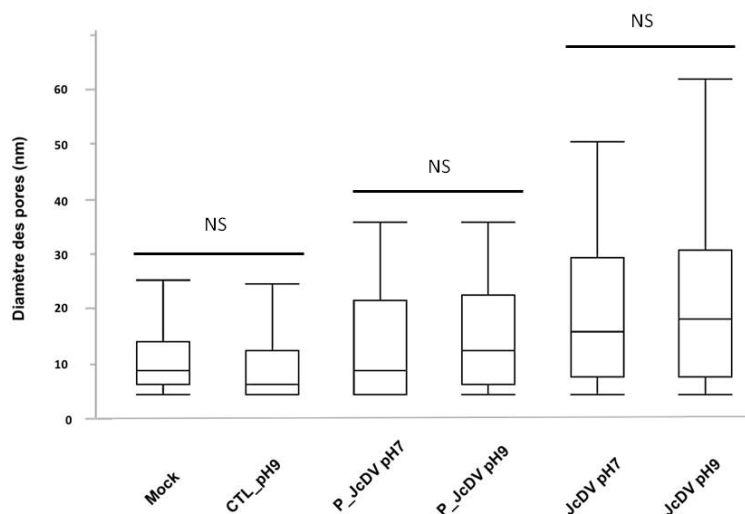


Figure 25 : Le pH n’influence pas la destructuration du virus avec la matrice périthroïque par le virus *ex vivo*.

Mesure du diamètre des pores avec l’outil d’imagerie Fiji software. Les MP ont été isolées puis traitées avec différentes conditions pendant 30 min : CTL_pH9 et Mock correspond à une MP non-traitée et non-infectée (contrôle). JcDV, P_JcDV ont été préparés dans une solution de PBS à pH 7 et 9 puis incubés 30 min. Le test Tukey-Kramer a été utilisé pour déterminer les valeurs statistiques. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (***, $p < 0,001$). Les significativités sont indiquées par comparaison au contrôle correspondant (Mock *versus* CTL_pH9, puis P_JcDV pH7 *versus* P_JcDV pH9, JcDV pH7 *versus* JcDV pH9).

6. Spécificité des interactions JcDV/MP sur la désorganisation de l'ultrastructure de la matrice

Les travaux de l'équipe sur l'évolution expérimentale ont montré que la virulence de JcDV diminue au cours des passages réalisés dans des chenilles hôtes de la même espèce *S. frugiperda*, alors qu'elle est maintenue si les passages sont réalisés en alternance dans des chenilles d'espèces hôtes différentes, *S. frugiperda* et *S. littoralis*. Ceci fait donc le lien avec mon travail sur la compréhension du ou des mécanismes mis en jeu lors de l'interaction de la capsid de JcDV avec les composants de la barrière intestinale.

Le déterminant permettant d'expliquer cette différence serait intestinal. Pour étayer cette hypothèse, j'ai comparé l'impact de virus JcDV semi-purifié à partir de *S. frugiperda* ou de *S. littoralis* sur l'ultrastructure de matrices péritrophiques issues de la même espèce ou de l'autre espèce de *Spodoptera*. Les résultats préliminaires indiquent que le virus JcDV produit à partir d'infection de *S. littoralis* désorganise plus l'ultrastructure des matrices péritrophiques hétérologues (*S. frugiperda*) que celle des matrices homologues isolées de *S. littoralis*. Cet effet potentialisé « croisé » est également vérifié si l'on met la matrice péritrophique de *S. littoralis* en contact avec du virus produit à partir d'infection de *S. frugiperda* (**Figure 26**). Ces résultats confirmeraient que le passage de la matrice péritrophique est une étape clé déterminant la réussite de l'infection et le maintien de la virulence de JcDV, et qu'il impliquerait un co-facteur, ou une modification, "espèce-spécifique" induit(e) par l'infection.

En résumé :

L'interaction de JcDV avec la matrice péritrophique induit sa destruction. L'activité *lectin-like* supposément associée à la capsid est nécessaire à la destruction observée, mais un co-facteur/une modification, induit(e) ou activé(e) par l'infection, semble participer à l'augmentation de la perméabilisation de la matrice péritrophique, ce qui optimiserait le passage de JcDV. Le pH basique, pH physiologique de l'intestin de chenille, ne semble pas améliorer l'efficacité du virus vis-vis de la désorganisation de la matrice péritrophique.

En l'état actuel des choses, une autre hypothèse serait que le contenu du bol alimentaire qui contient des enzymes, des lectines et d'autres molécules d'origine « insecte » ou provenant de l'alimentation, pourrait « activer » tout ou partie de l'*input* viral, entraînant une déstabilisation des capsides susceptible d'exposer en surface des motifs protéiques normalement internes au virion. Nous suggérons de réexaminer les structures primaires des protéines virales VP1, VP2 et VP3 à la recherche de motifs porteurs d'une possible activité directement destructurante (enzymatique) ou susceptible de recruter un co-facteur (une lectine de type C par exemple, qui pourrait être impliquée dans l'immunité de l'insecte hôte (Xia *et al.*, 2018)). Les différences d'activité entre virus purifié et semi-purifié ainsi que

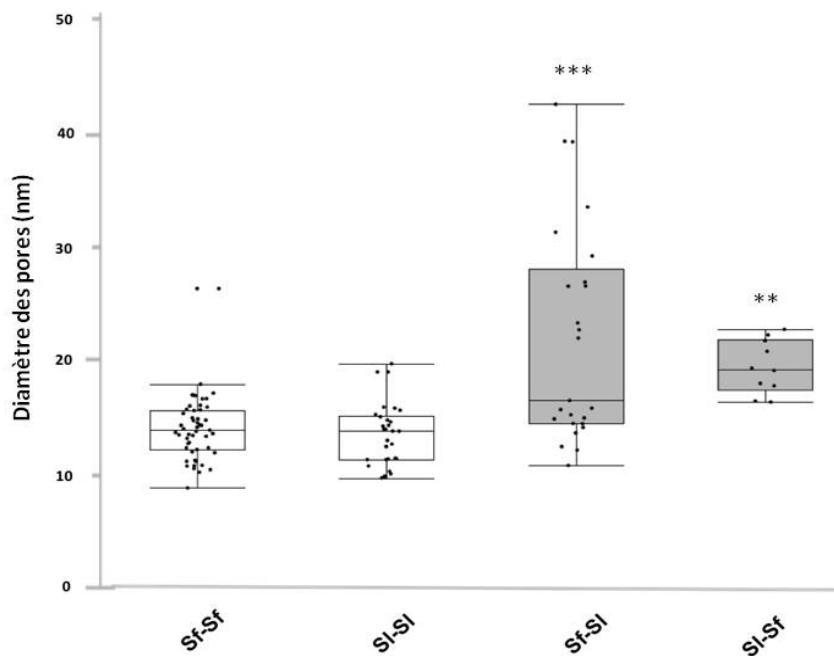


Figure 26 : L'hôte influence sur la spécificité de l'interaction du virus avec la MP.

Mesure du diamètre des pores avec l'outil d'imagerie Fiji software. Les MP ont été isolées puis traitées à pH7 pendant 30 min : Sf-Sf correspond à des MP de chenilles *S. frugiperda* incubées avec du broyat de *S. frugiperda* infectée avec JcDV, Sf-SI des MP de *S. frugiperda* incubées avec du broyat de *S. littoralis* infectée, SI-SI des MP de *S. littoralis* incubées avec du broyat de *S. littoralis* infectée, SI-Sf correspond à des MP de *S. littoralis* incubées avec du broyat de *S. frugiperda* infectée. Le test Tukey-Kramer a été utilisé pour déterminer les valeurs statistiques. Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives (**, $p < 0,01$ ***, $p < 0,001$). Les significativités sont indiquées par comparaison au contrôle correspondant (Sf-Sf versus Sf-SI et SI-SI versus SI-Sf).

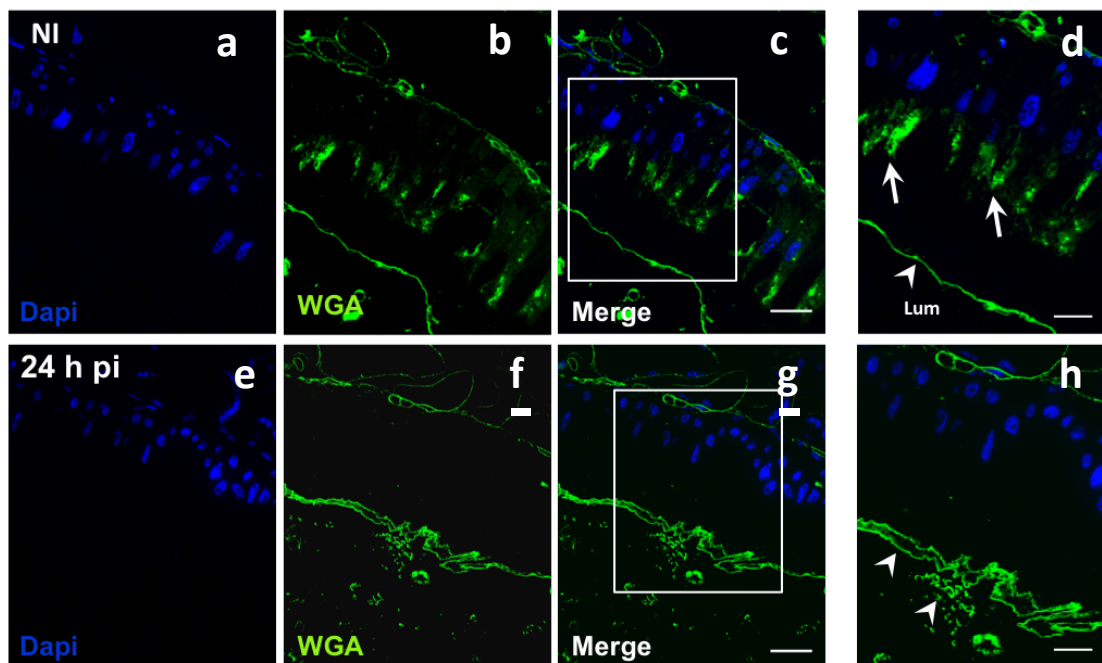


Figure 27 : Désorganisation de la MP et inhibition de la synthèse de GlcNAc après infection par JcDv per os.

Les chenilles ont été infectées *per os* avec JcDV ou nourries avec du PBS en tant que contrôle (NI, chenilles non infectées). À 24 h pi, des coupes transversales semi-minces (1 μ m) ont été préparées et traitées par immunomarquage, cf M&M. WGA-FITC a été utilisée pour visualiser la synthèse de la chitine et la structure des particules (en vert). Les noyaux sont en bleu (Dapi). Les flèches montrent la sécrétion de GlcNAc par les microvillosités et la tête de flèche de la MP. Barre d'échelle, 20 μ m.

la virulence spécifique des infections « croisées » seraient alors expliquées par le fait que les étapes de purification pourraient avoir exclu d'éventuelles particules « activées ».

5. L'infection par JcDV induit l'arrêt de la synthèse et/ou du trafic du GlcNAc

La matrice péritrophique, au même titre que le mucus chez les vertébrés, est en renouvellement permanent (Cornick *et al.*, 2015). Il était donc important de vérifier que la destruction de la matrice péritrophique par les particules virales est pérenne. Pour cela, nous avons réalisé une cinétique du devenir de la matrice péritrophique et de son composant principal, le GlcNAc.

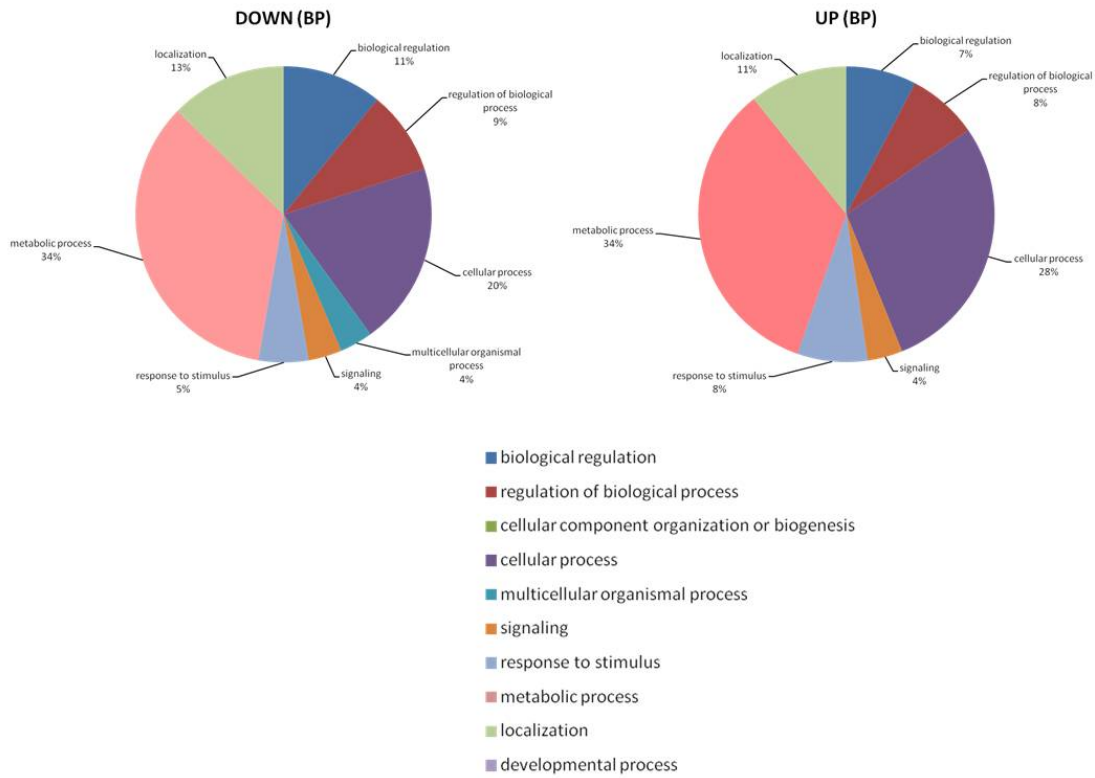
Pour cela, j'ai utilisé une lectine WGA fluorescente (FITC-conjuguée) pour marquer le GlcNAc sur des coupes semi-fines d'intestin moyen de chenilles infectées oralement 24 h (après le début de la réplication virale) avec du virus JcDV (**Figure 27**). Sur les coupes de chenilles non infectées (**Figure 27 ligne 1**), nous observons un marquage intense de la matrice péritrophique, mais également un marquage sous forme d'agrégats à l'apex des cellules columnaires, révélant la sécrétion de GlcNAc par les microvillosités (**Figure 27b,c,d**) (Merzendorfer and Zimoch, 2003). En revanche, à 24 h post-infection, la visualisation de la WGA-FITC montre une organisation multi-couches et discontinue de la matrice péritrophique (**Figure 27e,f,g**), qui évoque le maillage désorganisé de la matrice péritrophique de chenilles nourries avec de la WGA (Harper *et al.*, 1998). De plus, le marquage du GlcNAc dans les microvillosités n'est plus observé (**Figure 27e,f,g**). Cette dernière observation suggère un arrêt de la synthèse et/ou du trafic de GlcNAc par les cellules columnaires et donc un arrêt probable de la formation de la chitine. Cette disparition du GlcNAc cellulaire pourrait participer au démantèlement de la matrice péritrophique observée à 24 h p.i.

6. L'infection par JcDV induit des modifications de l'expression des gènes dans l'intestin

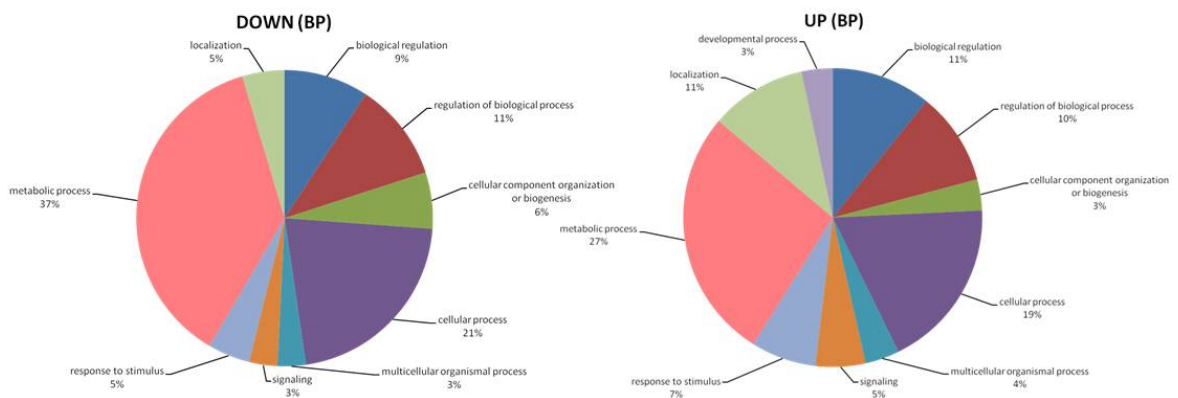
Les résultats ci-dessus ont montré un arrêt de la synthèse et/ou du trafic du GlcNAc par les cellules intestinales 2 h et 24 h post-infection. Pour avoir un aperçu plus global de l'impact de l'infection par JcDV sur l'expression des gènes dans les entérocytes de chenilles infectées versus non infectées, nous avons effectué une analyse complète du transcriptome de l'intestin moyen à 24 h (au début de la réplication virale) et 72 h post-infection (au cours de la réplication virale), en utilisant l'Expression Génique Digitale (Digital Gene Expression, DGE) (Velculescu *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 2006; de Lorgeril *et al.*, 2011). Quatre bibliothèques DGE ont été construites à partir d'ARNm extraits de pools d'intestins moyens disséqués à partir de chenilles non infectées et infectées à 24 h (jour 1, D1) et 72 h

A

DAY 1 (Processus biologiques)



DAY 3 (Processus biologiques)

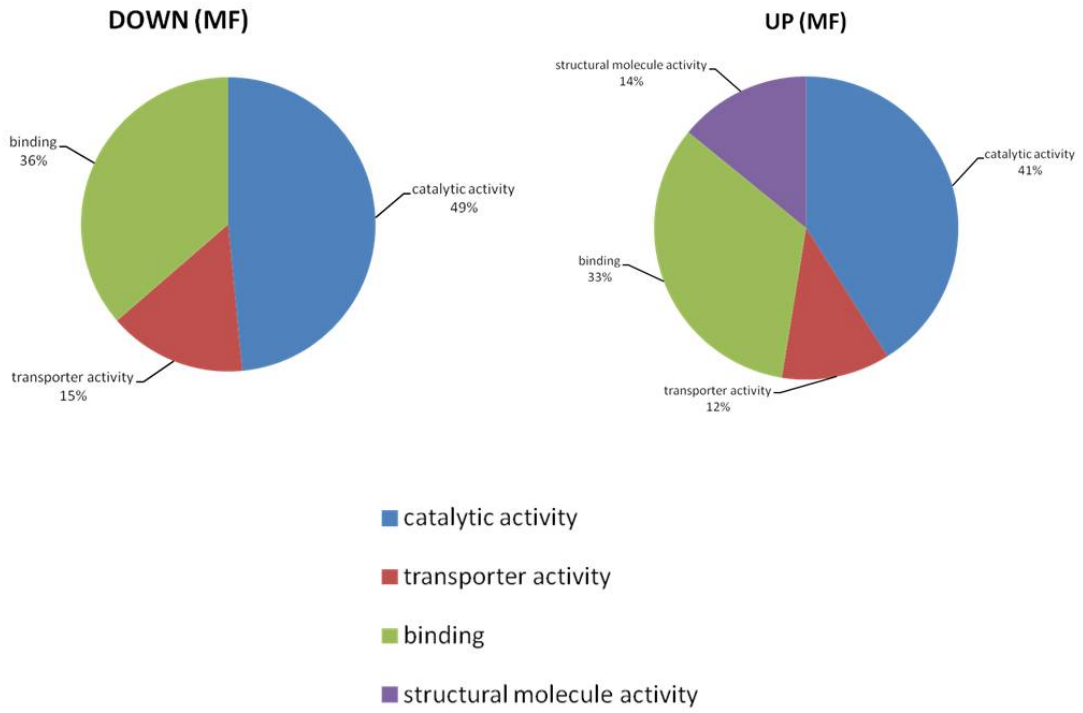


(jour 3, D3) p.i. Le séquençage des bibliothèques a donné lieu à un nombre de tags variant de 605 378 à 1 753 522 selon les conditions (Table 1 Annexe 1). Selon la p-value < 0,001 et l'occurrence des tags (incidence de chaque tag) dans les bibliothèques DGE, 8 586 et 63 17 tags uniques ont été identifiées à partir des bibliothèques D1 et D3, respectivement. La comparaison des occurrences des tags entre les bibliothèques « non infectées » et « infectées » a révélé que 190 tags uniques sont différentiellement représentés entre les bibliothèques D1 et 196 tags uniques entre les bibliothèques D3 (fold change ≥ 5) (Tableau 2 Annexe 1). Les tags uniques de DGE ont été assignés en utilisant le transcriptome de référence de *S. frugiperda* (Legeai et al., 2014). Puisque JcDV traverse l'épithélium de l'intestin moyen par transcytose sans réplication, les tags DGE ont également été alignés sur le génome de JcDV, comme contrôle, et aucune correspondance n'a été trouvée ce qui confirme qu'à aucun moment le virus ne s'exprime dans l'intestin lors du passage de la barrière intestinale (données non présentées). Les tags uniques DGE qui ont été attribués avec succès ont été assignés dans des groupes fonctionnels basés sur l'ontologie génique (GO). Les fonctions attribuées aux gènes et présentant une expression différentielle minimale de 5 fois par rapport aux conditions d'infection ou non, sont représentées par des secteurs ou « camemberts » (Processus Biologiques et Fonctions Moléculaires, niveau 2, (**Figure 28A et B**). A 24 h et 72 h p.i., les distributions des catégories GO se ressemblent avec quelques caractéristiques : d'une manière globale, concernant les processus biologiques, de nombreuses catégories sont mises en évidence dans toutes les conditions, notamment les "Processus cellulaires et métaboliques", les catégories "Régulation des processus biologiques", "Réponses au stimulus", et "Signalisation" (**Figure 28A**). Ceci pourrait être interprété comme une réaction globale du tissu à l'infection (Marques and Imler, 2016). Plus spécifiquement, une catégorie associée aux "Processus des organismes multicellulaires" apparaît parmi les termes GO sous-exprimés à 24h p.i. (**Figure 28A**), et une catégorie "Processus développementaux" parmi fonctions sur-exprimés à 72 h p.i. A 72 h p.i., les fonctions sont un peu plus dispersées avec une catégorie "Organisation des composants cellulaires" qui apparaît parmi celles qui sont à la fois sous-exprimées et sur-exprimées. Concernant les fonctions moléculaires, une seule caractéristique est visible, les gènes dont les fonctions sont liées à « l'activité des molécules de structure » apparaissent, sur-exprimés à 24 h p.i. (**Figure 28B**). Nous avons détecté un enrichissement significatif entre les GO de référence et les GO obtenus après analyse, uniquement pour les gènes sur-exprimés à 24 h p.i. (**Figure 28C**). Les catégories de gènes dont les fonctions sont liées au métabolisme, notamment la traduction, sont enrichies à 24 h p.i. Il semble donc que seule l'infection précoce induise une réponse du tissu intestinal de manière spécifique.

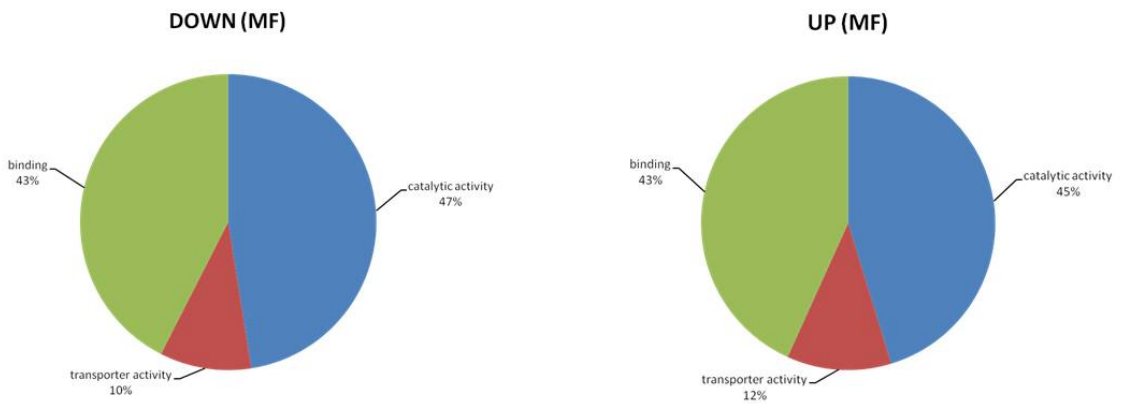
Fait intéressant, parmi les gènes possiblement impliqués dans la formation de la matrice péritrophique, un transporteur de tréhalose Tret1-like à 24 h (**Annexe 1 Tableau S2B**) ainsi qu'une mucine intestinale à 72 h (**Annexe 1 Tableau S2D**) post-infection ont été sous-exprimés dans la condition infectée, alors qu'une probable chitinase 3 est surexprimée à 72 h post-infection (**Annexe 1 Tableau S2C**). Étonnamment, aucune modification de l'expression du gène de la chitine synthase n'a été notée. De plus, nous ne trouvons pas de modifications de l'expression de gènes des enzymes qui

B

DAY 1 (Molecular function)



DAY 3 (Molecular function)



permettent la synthèse de GlcNAc. Il est également possible que ces gènes ne soient tout simplement pas tous annotés dans le génome de référence.

En conclusion de cette première partie, nous avons montré que JcDV interagissait non seulement avec les glycanes de la matrice péritrophique mais également que cette interaction était importante et nécessaire pour la pathogénèse virale (*in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*). L'interaction virus/matrice péritrophique induit la destruction de cette dernière. Cette destruction est favorisée par la présence d'un potentiel co-facteur et/ou d'une modification induit(e) ou activé(e) par l'infection, qui pourrait potentiellement être une lectine de type C établissant un pont entre la chitine et une éventuelle décoration glucidique du virus. Enfin, l'infection induit à 24 h un arrêt de la synthèse de GlcNAc et une dérégulation de l'expression d'une partie des gènes impliqués dans la formation de la matrice péritrophique. Ces effets délétères précoces et tardifs de l'infection sur la matrice péritrophique pourraient favoriser le passage du virus au travers de la matrice pour lui permettre de rejoindre l'épithélium intestinal et le compartiment intérieur de l'insecte.

C

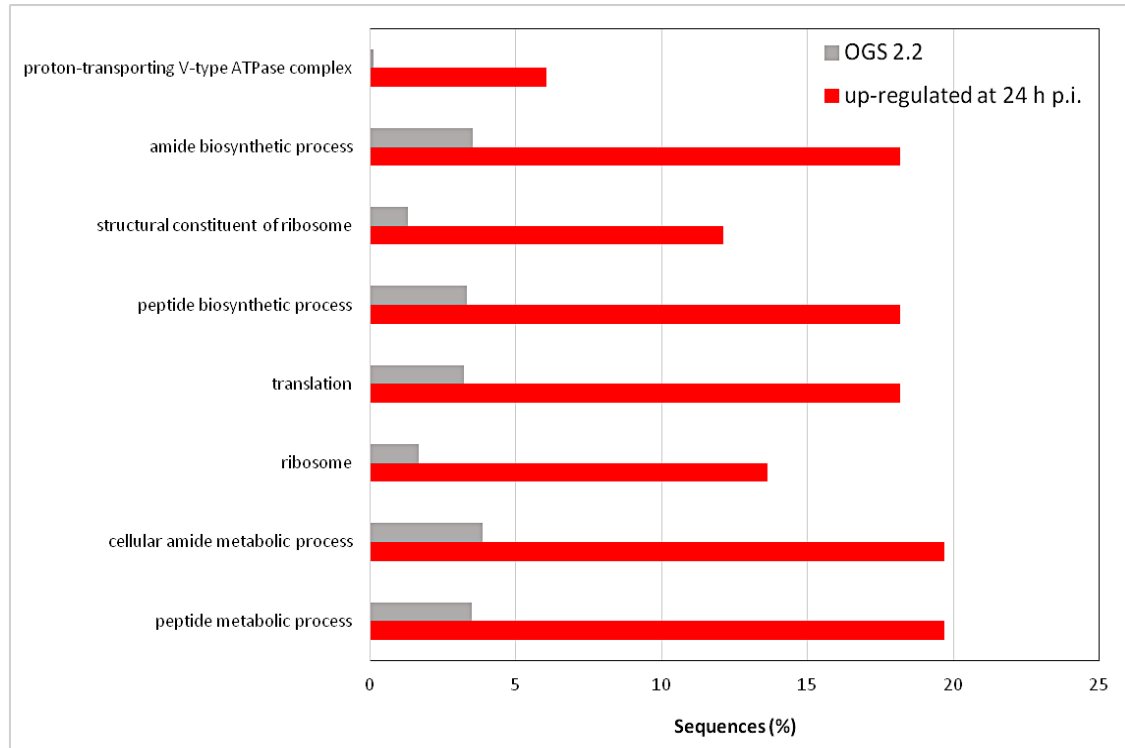


Figure 28 : Expression des gènes à 24 h et 72 h p.i.

Les gènes dont l'expression est dérégulée au cours de l'infection (fold change>5) ont été assignés selon les termes de l'ontologie génique (GO) en utilisant le logiciel Blast2Go (Conesa *et al.*, 2005). (A et B) La distribution des termes GO des gènes assignés est représentée par des « camemberts » pour les catégories « Processus Biologiques » et « Fonctions moléculaires » de niveau 2. (C) Enrichissement des catégories GO par rapport à la référence (OGS2.2, en gris) pour les gènes sous-exprimés à 24 h p.i. (en rouge) (FRD<0,01).

II. JcDV interagit avec la seconde barrière de l'intestin moyen : l'épithélium intestinal

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que le virus JcDV devait franchir la première barrière intestinale, la matrice péritrophique, ici nous nous intéresserons au franchissement de la seconde barrière qui est l'épithélium intestinal. Nous nous focaliserons ici sur les résultats qui concernent l'interaction du virus avec les microvillosités intestinales. L'épithélium a plusieurs rôles dont celui de protéger l'insecte des pathogènes (Huang *et al.*, 2015). Cependant, les pathogènes acquis par voie orale ont sélectionné au cours de l'évolution différents mécanismes afin de détourner cette protection et d'utiliser l'épithélium comme porte d'entrée de l'organisme. Ces agents infectieux se servent notamment du glycocalyx recouvrant les microvillosités comme point d'ancrage afin d'interagir ensuite spécifiquement avec leur(s) récepteur(s) (Ferreira *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2018).

Nous avons mis en évidence que le virus JcDV possède une affinité pour les glycannes de la matrice péritrophique, mais qu'en est-il de l'interaction de JcDV avec la surface de l'épithélium et donc avec les microvillosités des entérocytes ?

1. JcDV interagit avec les bordures en brosse de l'épithélium intestinal

Nous savons que JcDV se retrouve rapidement après l'ingestion (15 minutes environ) dans l'espace ectopéritrophique (entre la matrice péritrophique et les bordures en brosse) puis au niveau des microvillosités intestinales (Wang *et al.*, 2013). De nombreux récepteurs de microorganismes sont concentrés au sein des radeaux lipidiques (Rosenberger *et al.*, 2000; Alonso and Millán, 2001; Zhuang *et al.*, 2002; Bayyareddy *et al.*, 2012).

Concernant JcDV, il a été montré par l'équipe que le virus entré dans l'intestin moyen de *S. frugiperda* par une endocytose dépendante de la dynamine et colocalisait avec la cavéoline-1 (Wang *et al.*, 2013). En culture cellulaire, l'équipe a montré que l'entrée de JcDV est dépendante de la dynamine et de la clathrine (Vendeville *et al.*, 2009). Dans les deux cas, ces processus d'endocytose impliquent classiquement un récepteur, comme cela a été montré pour d'autres microorganismes (Nabi and Le, 2003; Le Roy and Wrana, 2005; Polo and Di Fiore, 2006; Wang *et al.*, 2013b). La colocalisation du virus avec la cavéoline nous a fait penser que celui-ci pouvait entrer dans l'épithélium à partir des radeaux lipidiques et pouvait donc interagir initialement avec un récepteur présent dans ces microdomaines. J'ai donc exploré cette hypothèse.

1.1. JcDV interagit avec les radeaux lipidiques des microvillosités *ex vivo*

Pour aborder la problématique des interactions virus/radeaux lipidiques, nous avons incubé *ex vivo* le virus JcDV WT, ou le mutant 8m (Multeau *et al.*, 2012), avec des intestins moyens préalablement disséqués. Ceux-ci ont ensuite été broyés pour la préparation des vésicules membranaires de bordures

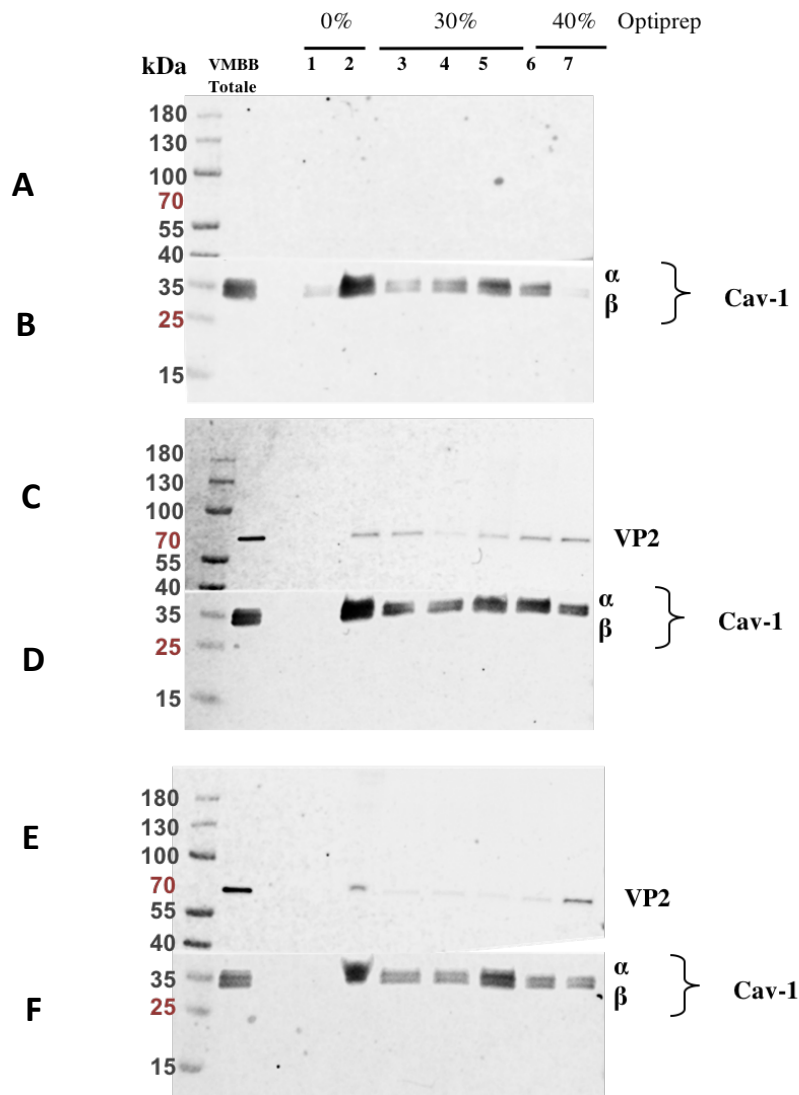


Figure 29 : Association de JcDV, mais pas du mutant 8M, avec les radeaux lipidiques de l'intestin moyen de *S. frugiperda*.

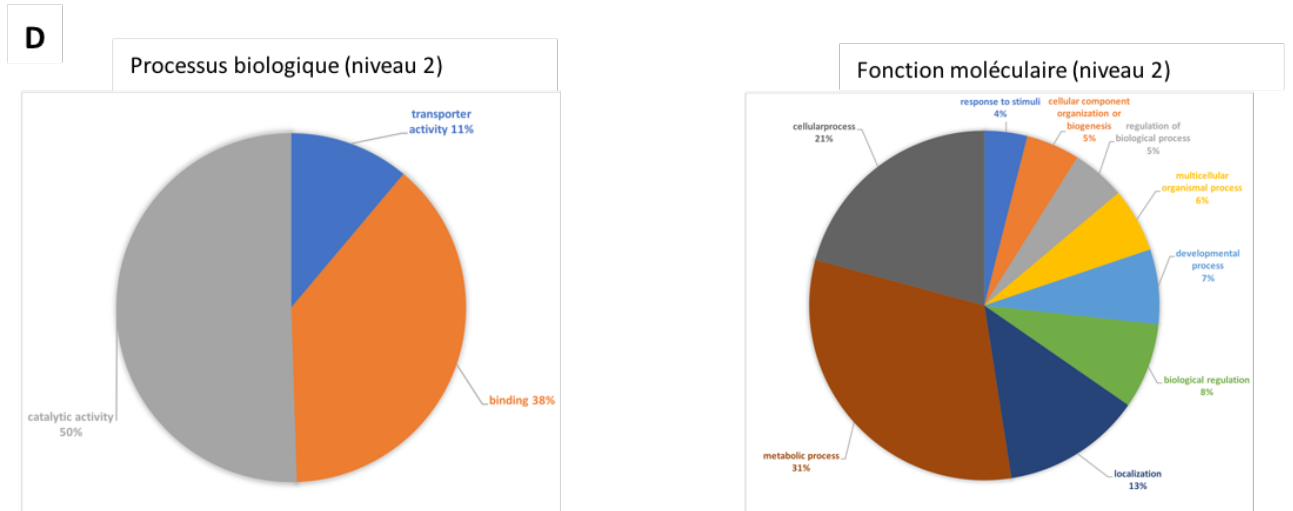
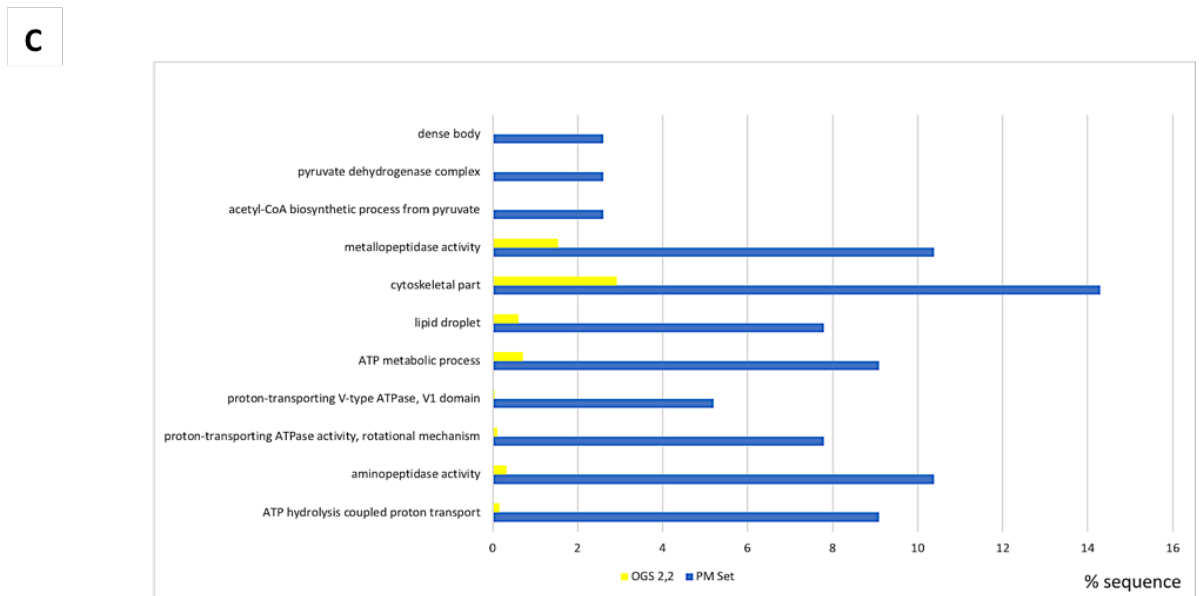
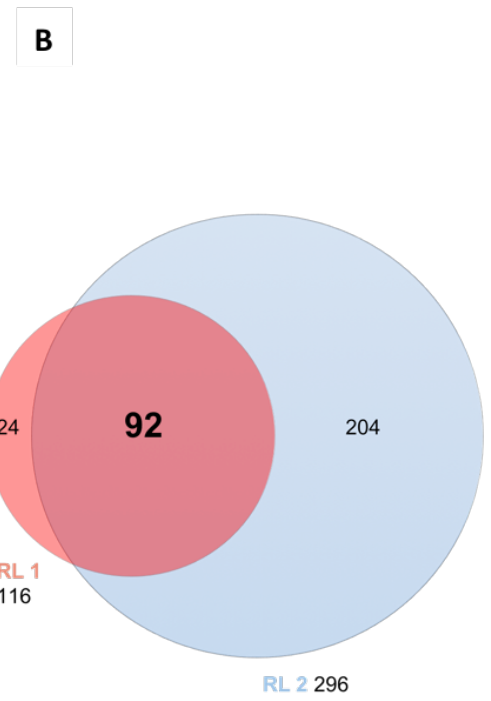
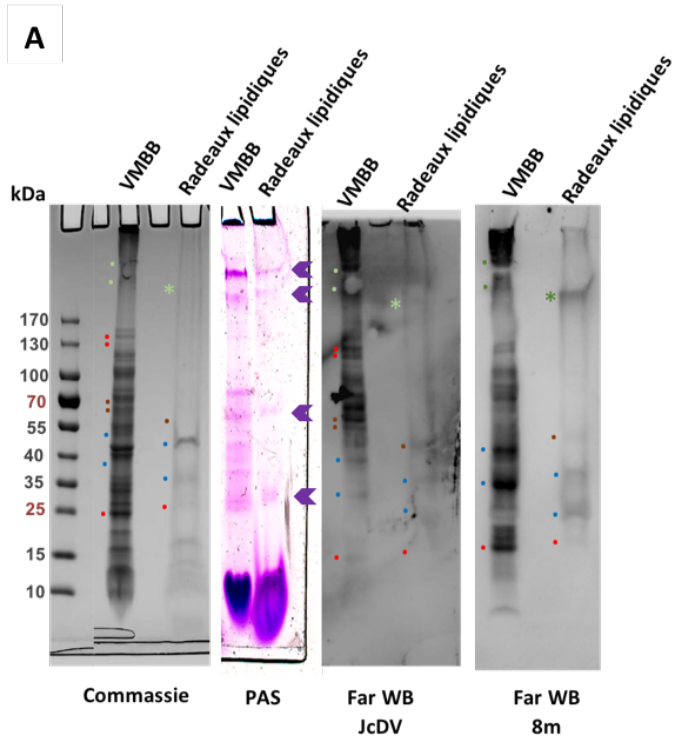
Les VMBB correspondent aux protéines extraites totales des vésicules membranaires des bordures en brosse de l'intestin moyen. Les fractions 1 à 7 correspondent aux fractions obtenues après purification des radeaux lipidiques par gradient de flottaison. La fraction 2 correspond aux membranes résistantes au détergent (MRD, fraction radeaux lipidique). Les fractions 6 et 7 sont les fractions solubles. Les protéines de chacune des fractions ont été précipitées et analysées par SDS-PAGE et Western Blot en utilisant un anticorps anti-cavéoline-1 (**B, D, F**) ou un anticorps polyclonal dirigé contre les protéines de capsid de JcDV (**A, C, E**) (*cf* Matériels et Méthodes). (**A**) et (**B**) Western blot sur les fractions d'un gradient de flottaison d'intestins non-infectés (**C**) et (**D**) Western blot sur les fractions d'un gradient de flottaison de d'intestins infectées avec le virus WT JcDV. (**E**) et (**F**) Western blot sur les fractions d'un gradient de flottaison d'intestins infectés avec le virus mutant 8m. La protéine de capsid principalement détectée par l'anticorps anti-capsid est la VP2 (58 kDa). Un profil de distribution de la cavéoline-1 similaire est observé dans les deux types d'infection (comparer **B, D** et **E**).

en brosse (VMBBs) et les radeaux lipidiques ont été extraits à partir des VMBBs infectées ou non (Mock) sur gradient de flottaison. Nous avons obtenu 7 fractions dont la fraction "flottante" (en général la fraction 2) contient les MRDs (**Figure 29**). Nous avons ensuite révélé les co-localisations virus/radeaux lipidiques des microvillosités de l'épithélium intestinal par western-blot.

Afin de confirmer que la fraction 2 correspond bien aux MRD, nous avons révélé la présence d'un des marqueurs des radeaux lipidiques : la cavéoline (**Figure 29B, D, F**). Le monomère de la cavéoline-1 chez l'insecte a une chaîne d'acides aminés plus longue que celle des mammifères, c'est pourquoi lors de sa migration son poids moléculaire apparent est de 26 kDa contre 21 kDa chez les mammifères (Avisar, 2005). Nous notons sa présence essentiellement dans la fraction 2, ce qui nous indique que nous avons bien enrichi notre matériel en radeaux lipidiques. La présence du virus est confirmée par la présence de la protéine de capsid VP2 aux environs de 70 kDa majoritairement dans les fractions 2-3 (insolubles) et 6-7 (solubles) tandis que le virus mutant 8m est majoritairement présent dans la fraction 7 (**Figure 29A, C, E**). Cela confirme que les virus WT et 8m emprunteraient deux voies différentes d'entrée et donc interagiraient potentiellement avec deux récepteurs différents (Wang et al., 2013). Les mutations générées sur la capsid du virus 8m, outre le fait qu'elles affectent la capacité de transcytose du mutant (Multeau *et al.*, 2012), affecteraient ainsi aussi sa capacité à emprunter les radeaux lipidiques pour infecter l'entérocyte *in vivo*.

Nous avons également provoqué la désorganisation des MRDs et en avons évalué le possible impact sur l'interaction du virus avec les radeaux lipidiques et donc potentiellement le passage de l'épithélium intestinal. Pour cela, nous avons traité les intestins moyens avec de la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui supprime le cholestérol des MRDs. La molécule de M β CD a grossièrement une structure en forme de cône dont l'intérieur est hydrophobe et l'extérieur hydrophile, ce qui permet de capter des molécules hydrophobes et de les isoler, comme le cholestérol par exemple, qui sera détaché de la membrane cellulaire (de Oliveira Andrade, 2016). Nous n'avons pas constaté d'impact sur la répartition de la cavéoline ni sur celle du virus au sein des radeaux lipidiques et cela suggère que la M β CD n'a pas ou peu d'effet chez l'insecte (données non montrées). Les insectes étant auxotrophes pour les stérols, le cholestérol est donc considérablement moins abondant que chez les vertébrés (Marheineke *et al.*, 1998; Terra *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2010; Bayyareddy *et al.*, 2012). Il a toutefois été montré que des cellules Sf9, issues d'ovaires de *S. frugiperda*, une fois traitées par la M β CD, étaient plus enrichies en cholestérol que les cellules contrôles (Zidovetzki and Levitan, 2007) ; ce qui est l'effet inverse de celui attendu pour la M β CD. Nous pourrions donc penser que chez l'insecte *S. frugiperda*, le rôle de la M β CD ne serait pas le même que chez les vertébrés, et au contraire, augmenterait son niveau de cholestérol. Ceci est corrélé avec les résultats de la publication de Wang et al., 2013, dans laquelle lors du traitement par la M β CD des intestins moyens de *S. frugiperda* en chambre de Ussing, la transcytose virale est augmentée.

Les membranes plasmiques de certains insectes seraient donc enrichies en cholestérol comme nous le suggère la publication de 2002 de (Zhuang *et al.*, 2002) selon laquelle le cholestérol aurait un rôle important pour la structure des radeaux lipidiques chez les lépidoptères *H. virescens* et *M. sexta*.



Dans ce travail, les auteurs ont ajouté la M β CD sur les VMBBs et non pas sur les intestins. Comme cité dans la publication de (Zidovetzki and Levitan, 2007), le taux de séquestration du cholestérol dépend de la concentration en M β CD, de sa durée d'incubation, de la température et du type cellulaire. De ce fait, il est possible que si on ajoute la M β CD sur les VMBBs de *S. frugiperda* et non sur les intestins, le traitement soit plus efficace. Il faudrait également tester un autre traitement, tel que celui utilisant la saponine qui déstabilise aussi les radeaux lipidiques (Zidovetzki and Levitan, 2007), pour confirmer l'importance de ceux-ci pour l'entrée et la transcytose virales.

1.2. JcDV interagit avec les protéines des radeaux lipidiques des microvillosités *in vitro*

Il semblerait que JcDV interagisse avec les radeaux lipidiques *ex vivo*, de ce fait nous avons cherché à identifier quels étaient les interactants protéiques, et donc potentiellement les récepteurs spécifiques, avec lequel(s) le virus s'associe. Pour ce faire, nous avons extrait les protéines des VMBBs ainsi que celles des radeaux lipidiques non infectés pour réaliser cette fois-ci un Far Western-Blot avec les virus sauvage et mutant. Tout d'abord, les protéines totales ont été colorées avec du bleu de Coomassie, et les protéines glycosylées à l'aide du réactif de Schiff comme dans la partie I.3. Les résultats de la **Figure 30A** révèlent la présence d'un grand nombre de protéines pour les VMBBs et beaucoup moins pour les radeaux lipidiques (7 bandes) avec la coloration au Coomassie, ce qui est attendu étant donné que les radeaux lipidiques sont enrichis seulement en certains types de protéines. Avec la coloration de Schiff, nous visualisons la présence de protéines hautement glycosylées pour les VMBBs (au moins 10 bandes de protéines glycosylées dont 3-4 bandes de protéines hautement glycosylées) et les radeaux lipidiques (deux bandes protéiques hautement glycosylées et une glycosylée à 70 kDa) que nous n'observons pas lors de la coloration des protéines totales.

Afin d'identifier les protéines qui interagissent avec les virus sauvage ou mutant, nous avons ensuite réalisé un Far Western-Blot comme en I.3. Nous avons identifié une interaction du virus avec, au moins, 4 bandes de protéines glycosylées isolées des VMBBs dont deux de haut poids moléculaires (PM>250 kDa) et une seule pour les protéines extraites des radeaux lipidiques, celle-ci est de haut PM également (> 250kDa). Ces protéines de hauts poids moléculaires pour les radeaux lipidiques et VMBB migrent apparemment au même endroit que les protéines glycosylées trouvées lors de l'interaction du virus avec la matrice péritrophique visualisée en I.3. S'il s'agit des mêmes interactants, car une bande révélée contient probablement plusieurs protéines différentes, le virus pourrait se servir de ces protéines glycosylées comme point d'ancrage pour interagir avec son ou ses récepteur(s) au niveau des radeaux lipidiques et ainsi pénétrer dans la cellule intestinale. Nous pouvons noter que JcDV interagit également en Far western blot avec plusieurs autres protéines des VMBBs et 3-4 bandes protéiques des radeaux lipidiques qui sont peu ou pas glycosylées. Ces constats sont valables aussi bien pour le virus WT que pour le mutant 8m, hormis qu'il semblerait que le virus WT interagisse avec les protéines de plus haut PM pour les VMBBs, mais pas pour les radeaux lipidiques. Au contraire, le virus 8m interagit avec les protéines de plus petits PM dont 3 qui sont glycosylées (pour les VMBBs et radeaux lipidiques). Ceci

Figure 30 : Identifications des protéines de l'épithélium intestinal interagissant avec le virus JcDV WT et le mutant 8m.

(A) Les protéines ont été extraites des VMBB puis des radeaux lipidiques (RL) puis séparées par SDS-PAGE comme décrit dans le M&M. Les protéines ont ensuite été colorées au bleu de Coomassie ou à l'acide périodique Schiff (PAS, rose) afin de visualiser les protéines totales ou glycosylées, respectivement, puis transférées sur des membranes de nitrocellulose et incubées avec le JcDV ou le mutant 8m. Les protéines interagissant avec les capsides de JcDV ont finalement été révélées à l'aide de l'anticorps anti-capside du JcDV par Western blot. Les flèches violettes indiquent la position de quatre protéines glycosylées des radeaux lipidiques dans le gel coloré au PAS. L'étoile verte correspond aux protéines hautement O-glycosylées dans les radeaux lipidiques, les points verts correspondent aux protéines hautement O-glycosylées dans les VMBB, les protéines en points rouge correspondent des protéines de hauts poids moléculaires hautement glycosylées, les points en bleu et rouge correspondent à des protéines de petits poids moléculaires, interagissant avec le virus. **(B)** Diagramme de Venn des deux répliques de protéomique réalisés à partir des bandes sélectionnées en VOPBA contenant potentiellement des protéines interagissant avec JcDV. Nous constatons que nous avons 92 protéines communes aux deux répliques, dont 77 sont annotées. **(C)** Les protéines identifiées avec au moins 2 peptides uniques ont été annotées selon les termes de l'ontologie génique (GO) avec un FRD < 0,01, classées en utilisant le logiciel Blast2Go (<https://www.blast2go.com/> (Conesa *et al.*, 2005). L'enrichissement par rapport à la référence (OGS2.2_proteins_20151204.fasta) a été représenté par des histogrammes, montrant les fonctions de ces protéines. **(D)** Distribution des catégories de fonctions GO des protéines annotées sous forme de « camemberts » pour les catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire » (niveau 2).

nous conforte dans notre hypothèse que le virus mutant n'interagirait pas avec le même système récepteur que le virus sauvage, au moins *in vitro*.

1.3. L'interaction *in vitro* de JcDV avec les radeaux lipidiques révèle des protéines susceptibles de servir de récepteurs

L'analyse protéomique réalisée sur les 5 bandes protéiques, en utilisant comme référence les séquences protéiques prédites à partir du génome de référence de *S. frugiperda* (OGS 2.2), a permis d'identifier 116 protéines pour le replica 1 et 296 pour le replica 2 dont 92 protéines communes aux deux replicas (**Figure 31B**). Parmi les 92 protéines, 77 sont annotées, parmi lesquelles nous trouvons des APNs, ALPs, ainsi que d'autres protéines membranaires (**Annexe2 Tableau S3**). L'annotation de ces protéines selon l'ontologie génique (GO) révèle un enrichissement en activités membranaires, ce qui est attendu pour ce type d'échantillon (**Figure 31C**). L'annotation de ces protéines révèle surtout que le virus interagirait avec des APN (bande 3, 50 kDa ; bandes 1 à 3, 200, 55 et 50 kDa ; bandes 1 à 5), et une phosphatase alcaline (bande 2, 190 kDa). Les bandes de petits poids moléculaires sont probablement des protéines dégradées. Ainsi, notre virus interagirait avec des aminopeptidases de type N. Les aminopeptidases (Gómez *et al.*, 2018) et les phosphatases alcalines (Guo *et al.*, 2015) (Tanaka *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2017) sont connus pour être des récepteurs/ligands de la toxine Cry de la bactérie *Bacillus thuringiensis*. Ces récepteurs sont également identifiés comme récepteur de virus, tels que les coronavirus pour les APN (Delmas *et al.*, 1993) chez les vertébrés. Des APN, mal caractérisées, pourraient participer au passage de la barrière intestinale des moustiques par les arbovirus (Kuno and Chang, 2005). Ces protéines sont donc de bons candidats récepteurs de JcDV, pistes qu'il s'agira d'explorer ultérieurement.

Enfin, nous avons comparé les 155 protéines communes aux 3 replicas de la matrice péritrophique avec les 92 protéines communes aux 2 replicas des radeaux lipidiques et réalisé un troisième diagramme de Venn (**Figure 31A**). Nous observons qu'il y a 32 protéines communes entre la matrice péritrophique et les radeaux lipidiques, dont 29 sont annotées (**Annexe 3 Tableau S4**). Ces protéines correspondent à une activité métabolique de l'intestin et plus particulièrement à des enzymes contenues dans l'espace ectopéritrophique, entre les microvillosités de l'épithélium intestinal et la matrice péritrophique, ce qui paraît donc cohérent (**Figure 31B, D**). Étonnamment, nous ne retrouvons pas de péritrophines, qui sont pourtant abondantes dans cet espace et sur la face apicale des entérocytes (Dias *et al.*, 2018), il est possible que toutes ces péritrophines ne soient pas encore annotées dans le génome de *S. frugiperda*.

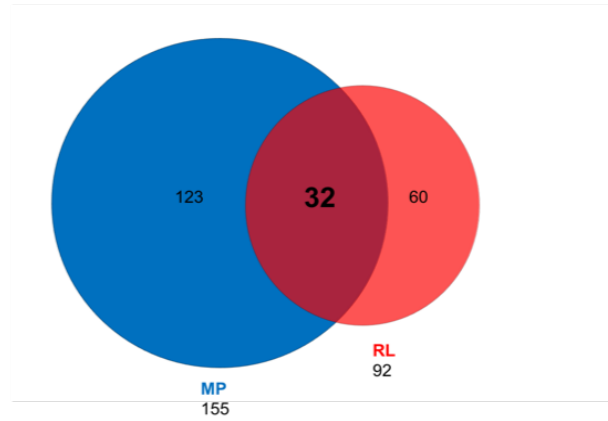
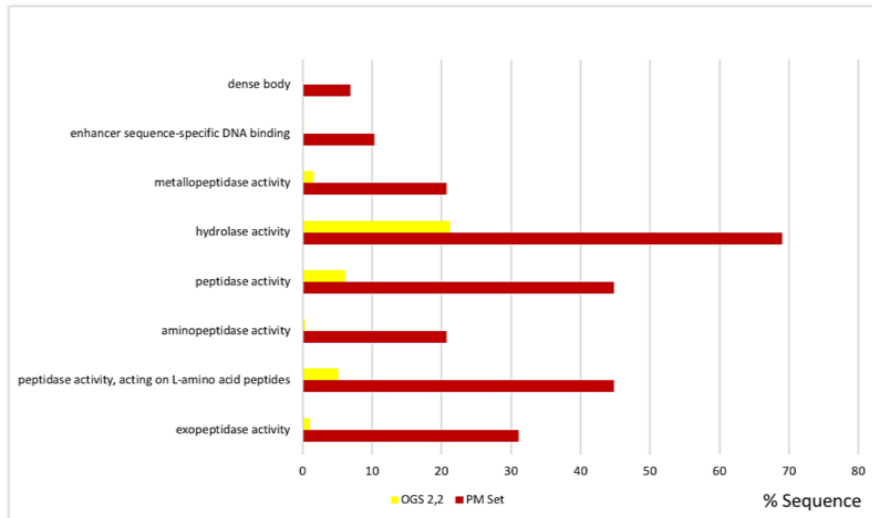
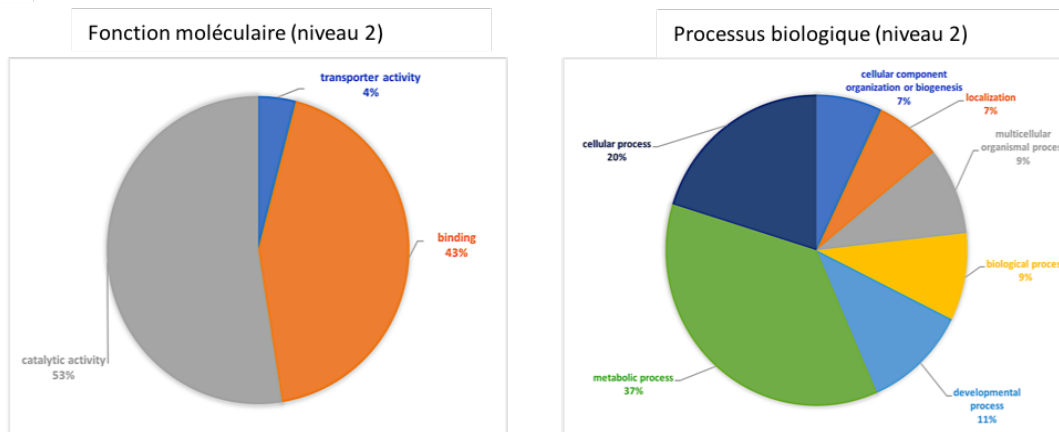
A**B****C**

Figure 31 : Identification des protéines communes entre la MP et les RL.

(A) Diagramme de Venn des protéines communes aux trois répliques de protéomique des MP (avec 155 protéines) et aux deux répliques de protéomique des RL (92 protéines). Nous constatons que nous avons 32 protéines communes aux deux répliques dont 27 protéines sont annotées (B) Les protéines identifiées avec au moins 2 peptides uniques ont été annotées selon les termes de l'ontologie génique (GO) avec un $FRD < 0,01$, classées en utilisant le logiciel Blast2Go (<https://www.blast2go.com/>) (Conesa *et al.*, 2005). L'enrichissement par rapport à la référence (OGS2.2_proteins_20151204.fasta) a été représenté par un diagramme, montrant les fonctions de ces protéines. (C) Les protéines annotées ont été classées en catégorie de fonctions GO, dont la distribution est représentée sous forme de « camemberts » pour les catégories « Processus Biologique » et « Fonction moléculaire » (niveau 2).

En conclusion de cette deuxième partie, j'ai mis en évidence que JcDV (mais pas le virus mutant 8m) interagissait avec les radeaux lipidiques des bordures en brosse de l'épithélium intestinal. L'analyse protéomique des protéines extraites de ces microdomaines membranaires et qui interagissent avec JcDV en VOPBA nous a permis d'identifier plusieurs candidats, parmi lesquels certains sont intéressants car il s'agit des aminopeptidases de type N et de phosphatase alcaline, connus pour être des récepteurs de pathogènes chez l'insecte et qui sont glycosylés.

Discussion générale et Perspectives

Durant mes trois années de thèse, j'ai cherché à comprendre le mécanisme d'entrée du virus JcDV au niveau de la barrière intestinale de l'intestin moyen chez le Lépidoptère ravageur de culture *Spodoptera frugiperda*. Je voulais savoir, dans un premier temps, avec quelles molécules JcDV interagissait au niveau de la matrice péritrophique, quelles étaient les dérégulations intestinales liées à ces interactions, quel était le mécanisme mis en place par le virus pour contourner cette barrière ; puis, dans un deuxième temps, je voulais savoir avec quels ligand(s)/récepteur(s) le virus interagissait au niveau des bordures en brosse apicales de l'épithélium intestinal, lui permettant de réaliser ensuite la transcytose (Wang *et al.*, 2013).

Pour tenter de répondre à ces questions, j'ai utilisé diverses approches : *in silico* (prédiction de site potentiel de N et O-Glycosylation du virus), *in vitro* (protéomique et transcriptomique), *ex vivo* et *in vivo* avec différentes techniques (western-blot, isolement de la MP, immunofluorescence, MEB, bioassay).

JcDV interagit avec les glycanes de la matrice péritrophique

J'ai ainsi pu montrer que JcDV avait une affinité pour les glycanes de la matrice péritrophique en réalisant des tests de compétition *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* avec les glycanes GlcNAc, GalNAc, Fucose et Mannose. Ceci nous a amené à penser que JcDV avait une possible activité lectine-like lui permettant de se lier à la chitine et/ou aux péritrophines de la matrice en reconnaissant la décoration glucidique de ces protéines. Pour étayer cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse protéomique à partir des péritrophines isolées de la MP, puis réalisé une expérience d'interaction du virus avec ces péritrophines, *in vitro*, par far-Western blot. Nous avons constaté que JcDV interagissait avec des péritrophines glycosylées, de type mucines (haut poids moléculaire) et non mucines, ce qui a été confirmé par une coloration de Schiff pour révéler les protéines glycosylées de la MP. Une analyse des glycanes présents sur les péritrophines de la MP est actuellement en cours afin de les caractériser, puis à terme d'identifier ceux qui interagissent avec le virus. Cette analyse est réalisée en collaboration avec Yann Guerardel, responsable de la plateforme de glycomique à l'université de Lille²³.

L'interaction de JcDV avec la matrice péritrophique induit la désorganisation de son ultrastructure

La microscopie électronique à balayage nous a permis de mettre en évidence que le JcDV semi-purifié était capable d'endommager l'ultrastructure de la MP, en particulier celle de la face endopéritrophique (côté bol alimentaire). Le pouvoir destructurant du virus évoque celui de la lectine WGA (lectine qui a une affinité pour le GlcNAc) (Harper *et al.*, 1998), mais n'est vraisemblablement pas le même. En effet, la MP était plus endommagée par le virus que par la WGA, ce qui a été confirmé

²³ <http://plateforme-pages.univ-lille1.fr>

par le diamètre des pores significativement plus grand pour les MP infectées que pour celles traitées avec la WGA. La déstructuration semble impliquer l'interaction de JcDV avec du GlcNAc puisque les tests de compétition utilisant ce glycanne inhibent l'effet du virus. Étonnamment, la face ectopéritrophique (coté microvillosités des entérocytes) ne semble pas être endommagée, ce qui suggère que nous n'avons pas le même profil d'organisation et/ou un accès différent aux composants de la MP de la face endopéritrophique. Cette dernière étant une face plus sollicitée par son environnement que la face ectopéritrophique, il est possible qu'elle acquière plus de composants ou redistribue ses composants originaux.

Un facteur de l'hôte pourrait potentialiser l'effet de JcDV sur la matrice péritrophique

Par ailleurs, lorsque cette expérience a été réalisée avec du virus purifié (P_JcDV), nous n'avons obtenu que le même niveau de déstructuration que pour la WGA. La simple fixation de particules virales sur la MP ne semble donc pas suffire à expliquer l'ampleur de la déstructuration observée avec le virus semi-purifié. Une hypothèse doit alors être explorée : le virus JcDV semi-purifié ne serait-il pas associé à un co-facteur qui potentialiserait sa liaison à la MP et/ou sa capacité à induire des pores plus nombreux et plus larges dans la matrice ? Ce co-facteur pourrait être une lectine binaire (*C-type lectin*), pontant la particule virale avec les glycanes de la matrice péritrophique.

Leila Gasmi et ses collaborateurs ont récemment caractérisé deux groupes de lectines de type C chez *S. exigua* et étudié leur expression dans différents tissus suite à l'infection orale par JcDV (Gasmi *et al.*, 2018). Trois des 10 lectines étudiées étaient régulées de manière différentielle au cours de l'infection, les lectines Se-BLL2 et Se-BLL6 étant significativement sous-exprimées dans les hémocytes, et la lectine Se-BLL4 sur-exprimée dans l'intestin moyen. Certaines d'entre elle (Gasmi *et al.*, 2018), et d'autres (Gasmi *et al.*, 2016), ont été montrées comme étant impliquées dans la réponse antivirale de l'hôte lépidoptère. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de ces lectines sur le franchissement de la matrice péritrophique par JcDV, mais également d'identifier les lectines de type C qui seraient spécifiquement régulées par l'infection chez *S. frugiperda* et *S. littoralis*, et qui pourraient potentiellement favoriser ou inhiber le passage de JcDV au travers de la matrice péritrophique.

Notre hypothèse (un co-facteur de type lectine pontant la particule virale avec les glycanes de la MP) est envisageable si la capsid de JcDV est glycosylée. Nous avons donc exploré au préalable la glycosylation éventuelle du virus et, effectivement, les protéines structurales semblent être glycosylées (coloration de Schiff), bien que ceci doive être confirmé par d'autres techniques plus sensibles (Murray *et al.*, 2006; Mitchell, 2008). En effet, pour le parvovirus AAV-2, 8 motifs de séquences potentiellement N- ou O-glycosylées ont été trouvés *in silico*. Cependant la cartographie peptidique et l'analyse structurale par spectrométrie de masse n'ont pas permis d'identifier de sites effectivement glycosylés sur les VP (Murray *et al.*, 2006). Afin de confirmer la potentielle glycosylation de JcDV, nous réaliserons, dans un premier temps, un Western-blot sur les particules virales à l'aide de deux lectines couplées à la HRP (*Horseradish peroxidase*), qui ont une affinité soit pour la GlcNAc (WGA-HRP),

soit pour la GalNAc (SBA-HRP ; *soybean agglutinin*). Seulement alors, nous chercherons à identifier les sites de glycosylation par analyse glycomique en utilisant la spectrométrie de masse. Pour cette étude, l'utilisation de VLP à base de chacune des quatre VP serait intéressante, mais actuellement, seules les VLP-VP4 sont disponibles dans notre laboratoire.

Par ailleurs, l'adjonction d'extrait de chenille non infectée au virus purifié ne permet pas de retrouver des effets aussi spectaculaires sur la destruction de la MP qu'avec le virus semi-purifié seul. Ce dernier point nous a conduits à envisager que : (i) le co-facteur potentiel est induit par l'infection (et donc présent dans le virus semi-purifié à partir de chenilles infectées, associé ou non aux particules virales) ; (ii) le co-facteur a pu être perdu lors de la purification sur gradient de JcDV, limitant ainsi la capacité du virus purifié à traverser la MP.

Effet direct de la capsidе densovirale sur la destruction de la matrice pérіtrophique

Il est enfin possible qu'il n'existe pas de co-facteur, mais que ce soit une version modifiée des particules virales qui permette le passage efficace du virus au travers de la MP. Cette modification (post-traductionnelle par exemple, notamment des glycosylations) pourrait être effectuée sur une partie des virus au cours de leur production. Dans les gradients de densité, ces virus ainsi modifiés ne sédimenteraient pas au même endroit que les virus non modifiés, ceux là même que nous cherchons à purifier en fonction de leur densité apparente, ce qui expliquerait la perte des virus modifiés au cours de la purification. Ceci nous amène à reposer des questions de base et à explorer l'activité de chacune des fractions du gradient de purification.

Quoiqu'il en soit, JcDV est capable d'augmenter la perméabilité de la MP, ce qui favorise son passage au travers de cette barrière et l'accès à l'épithélium sous-jacent. Mais nous n'avons pas encore élucidé les mécanismes qui permettent au virus de déstructurer la MP. Nous ne pouvons pas exclure une activité enzymatique associée aux capsides (activité protéasique et/ou glycosidasique), bien que la taille de la particule et l'absence de séquence révélatrice d'un domaine actif connu rendent l'hypothèse peu probable. Toutefois, l'activité PLA₂, découverte associée à la protéine VP1 (Zádori *et al.*, 2001), nous poussera à réexaminer la structure primaire de chacune des protéines structurales et leurs potentielles activités enzymatiques. Les activités protéasique et glycosidasique pourront être testées par fluorimétrie à l'aide de substrats protéiques ou de saccharides, respectivement, couplés à des molécules fluorescentes commerciales (par exemple le 4-methylumbelliferyl) (Hoppe, 2002; Arnosti, 2011). En parallèle, suite à l'incubation de la matrice pérіtrophique avec JcDV, le matériel libéré pourra être analysé par glycomique dans le but d'identifier les activités potentielles exo- et/ou endo-glycosidase du virus.

Il n'est pas impossible, compte tenu de la grande quantité de virions qui se lient à la MP, que le virus exerce plutôt une contrainte mécanique sur la structure, entraînant sa destruction. Une telle possibilité pourrait être examinée par les outils d'étude de la topologie, microscopie à balayage couplée à l'utilisation d'anticorps (*stimulated-emission-depletion* ou déplétion par émission stimulée, (Hell and Wichmann, 1994)) ou microscopie à force atomique (Delguste *et al.*, 2018).

Il serait extrêmement intéressant de tester l'effet des VLP-VP4, car si la présence de la protéine VP4 seule suffit à induire les dégâts observés sur la MP, il sera plus sûr d'utiliser ces VLP, non infectieuses car dépourvues de génome, plutôt que les virions, dans le cadre du bio-contrôle.

L'infection précoce induit un arrêt de la synthèse de GlcNAc dans les cellules columnaires

Nous avons constaté également que, 24 h p.i., l'infection provoquait directement ou indirectement un arrêt de la synthèse de GlcNAc dans les cellules columnaires, ce qui pérennise probablement la destruction de la MP (observation d'une organisation discontinue et multicouche) et annihile ainsi l'effet barrière de cette structure. Il a été décrit que la synthèse de la chitine pouvait être inhibée lorsque les microtubules étaient déstructurés par des traitement médicamenteux (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2013). Le virus JcDV pourrait avoir le même effet sur les microtubules des cellules columnaires, empêchant ainsi la synthèse de GlcNAc et intrinsèquement la synthèse de la chitine. Il serait intéressant d'utiliser des VLP-VP4 afin de mimer l'effet de JcDV. En effet, si la protéine VP4 seule suffit à réguler négativement la sécrétion de chitine, nous pourrions plus aisément en explorer les ligands *in cellulo*.

JcDV interagit avec des récepteurs présents dans les radeaux lipidiques de la bordure en brosse intestinale

Dans la seconde partie de ma thèse, j'ai mis en évidence que JcDV interagissait avec les radeaux lipidiques des bordures en brosse de l'épithélium intestinal. Afin d'identifier le(s) récepteur(s) intestinal(aux) de JcDV, nous avons extrait les protéines de ces microdomaines membranaires et analysé par far western celles qui interagissent avec le virus. Les analyses protéomiques ont identifié de nombreux candidats, parmi lesquels certains sont plus intéressants car glycosylés. Il s'agit d'aminopeptidases de type N et de phosphatase alcaline, qui sont d'ailleurs connus pour être des récepteurs putatifs chez l'insecte (Kuno and Chang, 2005; Linz *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017).

Dans notre laboratoire, il a été montré que la modification de quatre acides aminés de la protéine VP4 empêchait le virus de traverser efficacement l'épithélium intestinal et entraînait une mortalité des chenilles retardée par rapport au JcDV sauvage (Multeau *et al.*, 2012). Ces acides aminés présents à la surface de la particule, autour de l'axe de symétrie 5, seraient potentiellement impliqués dans la reconnaissance du récepteur viral de JcDV sur les cellules columnaires. J'ai mis en évidence que les virus portant ces mutations (virus 8m) ne s'associaient pas avec les radeaux lipidiques, suggérant un récepteur et un mécanisme d'entrée de ces virus dans l'épithélium différents de ceux du virus sauvage. Ce mutant sera donc utile pour nous permettre de faire le tri dans la liste des candidats récepteurs de JcDV identifiés par protéomique et d'identifier celui qui permet au virus de franchir spécifiquement et efficacement l'épithélium par transcytose. Il sera important de tester la spécificité des interactants en

réalisant des expériences contrôles, à l'aide de densovirus qui n'infectent pas *S. frugiperda*, par exemple le densovirus de puceron *Myzus persicae* densovirus (van Munster *et al.*, 2003).

Pour affirmer que nos candidats sont des récepteurs de JcDV, il faudra pouvoir co-immunoprécipiter ces glycoprotéines avec le virus à l'aide d'anticorps anti-capside. Il faudra analyser la localisation tissulaire et cellulaire de ces candidats (à l'aide d'anticorps commerciaux, obtenus par nos collaborations ou d'anticorps produits par nos soins selon que les protéines sont, ou non, conservées chez notre insecte modèle *S. frugiperda*) et réaliser des analyses fonctionnelles de ces protéines. Les candidats devront être validés *in vivo*, en inactivant leur expression à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques (s'il en existe), ou en éteignant leur expression par la technique CRISPR-Cas9 ou par ARNi, et en testant ensuite l'effet de l'inactivation/extinction sur l'interaction, l'entrée dans l'épithélium et la transcytose de JcDV au travers du tissu intestinal.

Dans une récente étude, il a été montré que la protéine VP4-GFP recombinante se fixe, *ex vivo* en chambre de Ussing, à des protéines glycosylées de haut poids moléculaire de l'épithélium intestinal de *S. frugiperda* (Kemmerer and Bonning, 2018). Ces protéines glycosylées pourraient être des mucines au même titre que celles que nous avons identifiées sur la MP (p74 des Résultats). Afin de le confirmer, il nous faudrait isoler et cloner le gène ou l'ARNm permettant la traduction de ces protéines, pour comparer leurs séquences.

À ce jour, pour les densovirus, un seul récepteur putatif a été identifié. Il s'agit de la protéine membranaire de type mucine NSD1, identifiée chez le ver à soie *Bombyx mori* et récepteur du *Bombyx mori* densovirus (BmDV) qui ne se réplique que dans les cellules columnaires de l'intestin (Ito *et al.*, 2018). D'après la prédiction de structure de NSD1 (Ito *et al.*, 2018), cette protéine posséderait des sites putatifs de O-Glycosylation (*mucin-like domain*) dans la partie extracellulaire de la protéine, la partie exposée aux pathogènes. La substitution d'un seul acide aminé, une Arginine en Glycine en position 118, confère à *Bombyx mori* une résistance à l'infection par le densovirus BmDV. L'Arginine 118 est donc importante pour la détermination de la spécificité du virus pour son récepteur chez *B. mori* (Ito *et al.*, 2018). Un autre récepteur putatif de virus entomopathogène a été identifié et décrit pour le BmBDV, un virus reclassé dans les *Bidnaviridae* (Ito *et al.*, 2008, 2016). Des récepteurs/récepteurs putatifs de virus chez l'insecte, arbovirus de vertébrés et arthropodes ont été décrits dans la littérature (Ludwig *et al.*, 1996; Brault *et al.*, 2010; Kuadkitkan *et al.*, 2010; Londono-Renteria *et al.*, 2015; Dietzgen *et al.*, 2016; Deshoux *et al.*, 2018; Mulot *et al.*, 2018)

L'importance des interactions virus/glycannes dans la pathogenèse virale

L'importance des glycannes dans les interactions virus/récepteurs et leur implication dans la spécificité d'hôtes sont connus pour les parvovirus de vertébrés

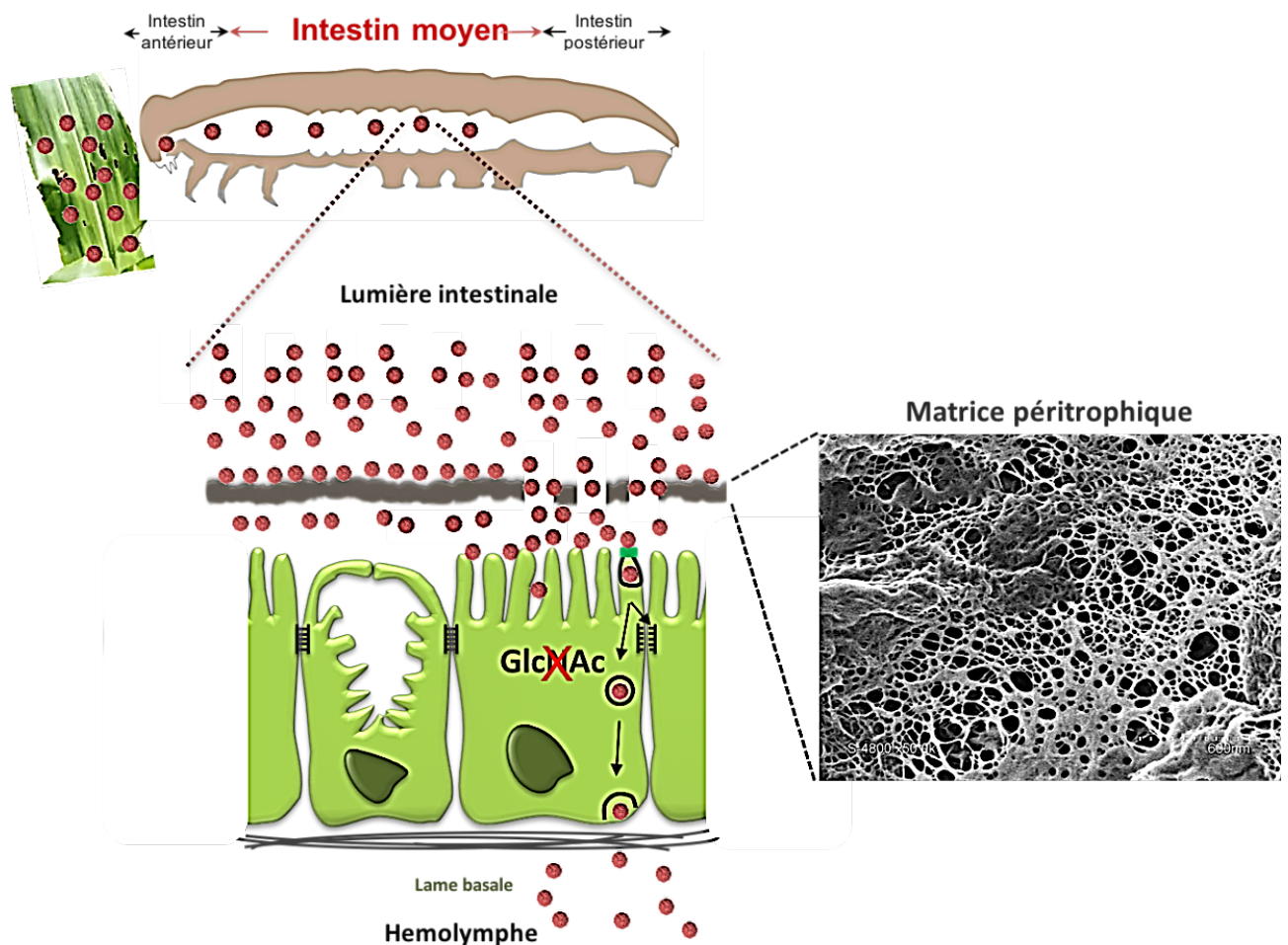


Figure 32 : Schéma récapitulatif des mécanismes permettant au densovirus JcDV de franchir la barrière intestinale de *S. frugiperda*.

Les virus (en rouge) sont ingérés par la chenille et transitent jusqu'à l'intestin moyen où ils se concentrent sur la matrice péritrophique et entraînent sa destruction (Pigeyre *et al.*, in prep). Cette perméabilisation favoriserait le passage des particules virales dans l'espace interpéritrophique. Les virus se fixent ensuite aux radeaux lipidiques des bordures en brosse apicales de l'épithélium intestinal. JcDV entre alors par une endocytose cavéoline-dépendante et traverse les cellules colonnaires par transcytose (Wang *et al.*, 2013b). Lors de son passage, JcDV engendre une désorganisation des jonctions septées (Wang *et al.*, 2013b), ainsi qu'un arrêt de la synthèse de GlcNAc et/ou de son transport aux microvillosités (croix rouge) qui participerait à la désorganisation de la matrice péritrophique (Pigeyre *et al.*, soumis). Enfin, les virus sortent de la cellule par exocytose et rejoignent les tissus cibles *via* l'hémolymphe pour se répliquer (Mutuel *et al.*, 2010; Gosselin Grenet *et al.*, 2015).

(Walters *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2014b), mais rien n'était établi pour les densovirus au début de ma thèse en 2015. Que ce soit au niveau de la MP ou de la surface apicale de l'épithélium, j'ai pu mettre en évidence l'interaction de JcDV avec des protéines glycosylées et l'importance des glycannes dans l'initiation de la pathogenèse virale et dans la spécificité d'hôte. Les capsides des densovirus sont simples (T=1), avec une protéine de capsidie majeure qui constitue la surface et 1 à 3 protéines mineures qui participent à l'architecture icosaédrique globale. Les protéines de capsidie de JcDV présentent toutes un domaine structural typique en "jelly roll" (huit brins β arrangés en deux feuillettes de quatre brins antiparallèles), qui est la structure la plus répandue dans les protéines de capsides virales (Krupovic and Koonin, 2017). De façon intéressante, cette structure est aussi partagée par des protéines cellulaires, notamment des lectines et des protéines impliquées dans des activités enzymatiques de type glycosidase (Krupovic and Koonin, 2017). Etant donné la parenté structurale des VP de tous les parvovirus, nos résultats semblent confirmer une possible activité lectine-like ancestrale des capsides de parvovirus.

Enfin, il ne faut pas négliger le rôle des glycannes du microbiote dans la pathogenèse virale. Il a en effet été mis en évidence chez la souris que certains virus, notamment les virus nus, tels que le poliovirus, interagissaient avec les sucres (les lipopolysaccharides, LPS) de la paroi des bactéries du microbiote intestinal et que ces interactions favorisaient l'infectiosité des particules virales et la pathogenèse (Kuss *et al.*, 2011). De même, alors que l'infection de *Drosophila melanogaster* ou les moustiques par la bactérie symbiotique *Wolbachia* limiterait l'infection du diptère par le virus C de la drosophile, le virus *Floch House* et le Nora virus (Teixeira *et al.*, 2008) ou les arbovirus (Johnson, 2015), d'autres virus d'arthropodes, comme le *Himetobi P virus* (HiPV) de la petite cicadelle brune (SBPH) facilite l'accumulation du virus « vectorisé » « *Rice stripe virus* » (RSV) (Li *et al.*, 2015). Il en est de même de beaucoup d'infections qui, selon le cas, renforcent ou affaiblissent la résistance de l'hôte à des sur-infections (revue dans (Moore and Jaykus, 2018). Ainsi, il serait donc important de tester l'implication du microbiote dans notre modèle d'interaction densovirus/insecte.

La publication de Wang *et al.*, 2013 avait soulevé certaines questions auxquelles nous avons voulu répondre, à savoir comment JcDV interagit et traverse la MP qui est fortement glycosylée, quels sont les molécules et/ou récepteurs potentiel(le)s permettant à la capsidie de traverser l'épithélium intestinal ensuite et, enfin, quelles sont les molécules virales et cellulaires participant à la perturbation de la barrière intestinale (activité enzymatique ou mécanique de la capsidie, activation de molécules liée à l'infection). Mes travaux de thèse ont donc permis d'avancer sur la compréhension des mécanismes qui permettent au densovirus JcDV d'interagir avec- et de franchir la barrière intestinale du lépidoptère ravageur *S. frugiperda*. Cette étape clé de la pathogenèse virale initie l'invasion de l'hôte et détermine la réussite de l'infection. Un schéma récapitulant les connaissances acquises à ce jour sur le franchissement de la barrière intestinale par JcDV est présenté en **Figure 32**.

Les densovirus, outils de bio-contrôle des insectes nuisibles et vecteurs de gènes

Etudier les interactions virus/intestin apporte des connaissances fondamentales sur la physiologie intestinale, qui peuvent être exploitées pour améliorer les méthodes actuelles de contrôle des insectes nuisibles.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse et la poursuite de mes travaux de recherches sont importants pour évaluer le potentiel des densovirus dans le cadre de leur utilisation en bio-contrôle contre les insectes ravageurs. Même si l'utilisation de JcDV en tant que tel est difficilement envisageable à l'heure actuelle, car c'est un virus généraliste et non un spécialiste, la capacité de ce virus à perturber la fonction barrière de l'intestin de l'insecte, *via* la destruction de la matrice péritrophique ainsi que la perméabilisation de l'épithélium intestinal (ouverture des jonctions septées) sont des propriétés extrêmement intéressantes dans le cadre du contrôle des insectes nuisibles. En effet, l'intestin est un tissu primordial pour la physiologie de l'insecte et sa résistance face aux pathogènes. Cibler ce tissu clé peut permettre de maximiser l'effet toxique des molécules insecticides en favorisant leur passage dans le compartiment intérieur tout en perturbant la fonction digestive de l'insecte, ce qui réduit sa survie et surtout diminue les prélèvements sur les productions agricoles.

Les densovirus pourraient être utilisés seuls, ou en synergie avec d'autres molécules insecticides, tels que les pesticides de synthèse, afin de diminuer leur quantité dans l'environnement (Musser *et al.*, 2006; Ruiu, 2015), ou avec d'autres microorganismes. Il existe actuellement des combinaisons Bt/insecticides (Morris, 1972; Seleena *et al.*, 1999; Marrone, 2010), mais aussi une formulation dont l'efficacité est augmentée en combinant la bactérie Bt et un baculovirus doté d'une chitinase (Shternshis *et al.*, 2002). Si une activité enzymatique non canonique était identifiée sur la capsid de JcDV, elle pourrait être isolée et exploitée pour détruire la matrice péritrophique et favoriser l'accès des insecticides à l'épithélium intestinal. L'identification du récepteur impliqué dans la reconnaissance de JcDV sur les cellules columnaires de l'épithélium intestinal, quant à elle, permettrait de potentialiser l'interaction densovirus/intestin pour favoriser l'entomopathogénicité du virus ou pour éviter/ralentir une éventuelle résistance de l'insecte à ce virus.

L'utilisation de VLP-VP, dont les acides aminés de surface pourraient être choisis en fonction de la spécificité désirée, est une alternative souhaitable à l'utilisation de virus entier qui est étudiée au laboratoire (G. Cambray, biologie synthétique). En effet, les VLP apportent un énorme avantage qui est l'absence de génome dans les particules virales et donc aucune répllication possible du virus dans la nature. Leur utilisation éviterait la possible propagation du virus sauvage chez des insectes non-nuisibles et non-cibles. Elles pourraient être utilisées en tant que telles s'il s'avère qu'une ou plusieurs protéines de capsides possèdent une activité impliquée dans la désorganisation de la barrière intestinale, ou bien elles pourraient servir de vecteur pour délivrer des molécules toxiques dans le compartiment intérieur de l'insecte cible.

Enfin, les densovirus présentent des caractéristiques intéressantes de par leur utilisation en tant que vecteur d'expression pour l'introduction et l'expression de gènes étrangers dans les cellules eucaryotes comme c'est le cas pour les baculovirus (Ghosh *et al.*, 2002; Kost *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2017). A l'instar des AAV qui sont utilisés en thérapie génique, comme vecteur de transfert de gènes chez l'Homme (Naso *et al.*, 2017), les densovirus, dont JcDV (Royer *et al.*, 2001; Thomas, 2003) ou le densovirus de moustique *Aedes aegypti*, AeDV, ont également un potentiel vecteur (Giraud *et al.*, 1992; Afanasiev *et al.*, 1994; Kolliopoulou *et al.*, 2017) pour transférer des gènes chez l'insecte (Carlson *et al.*, 2006). Ce principe de transférer des gènes *via* un densovirus a été déjà été validé chez les moustiques (Ren and Rasgon, 2010). Dans le cadre du bio-contrôle, les gènes transférés peuvent être des gènes toxiques pour l'insecte, ou des ARNi qui cibleraient précisément des gènes impliqués dans la physiologie de l'insecte, afin de le faire mourir plus rapidement. En effet, comme cité dans le préambule, l'utilisation du ARNi est un bon moyen de lutte biologique, mais qui ne fonctionne pas bien chez les Lépidoptères par voie orale, car ces insectes possèdent, entre autres, des nucléases inactivant l'effet des ARNi (Arimatsu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2018). L'utilisation des densovirus comme vecteur d'ARNi serait une alternative à mettre en oeuvre.

Il a été montré, par ailleurs, que JcDV présente des similitudes avec les AAV: une structure génomique terminale en épingle à cheveux et des activités de ses protéines virales similaires à celles des AAV, ce qui permet son intégration dans le génome des cellules d'insectes, sous forme de « Densovirus-like sequences » ou DLS (Bossin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011a; François *et al.*, 2016), tout comme les AAV ou d'autres *Parvovirinae* dans les cellules eucaryotes (Kapoor *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011a). Ce phénomène est appelé endogénéisation, et peut permettre l'expression de gènes sur le long terme. Récemment, il a été montré que le densovirus *Myzus persicae* densovirus était intégré dans le génome du puceron vert du pêcher (*Myzuz persica*) et transcrit (Clavijo *et al.*, 2016) mais également il a été montré dans notre laboratoire qu'une séquence linéaire dérivée de JcDV possédant au moins un signal ITR et des signaux poly-A permettait son intégration aléatoire dans le génome des cellules Sf9 autorisant l'expression de la GFP ainsi vectorisée (Rizk *et al.*, 2018). Malgré cela, cette endogénéisation peut être un désavantage car la présence de séquences « étrangères » du génome peut entraîner des régulations d'expression susceptibles d'interférer avec une infection ultérieure et d'engendrer des résistances aux densovirus chez les insectes nuisibles cibles.

Les densovirus sont une famille de virus qui a de grands potentiels en termes d'applications. Suite à mes travaux de thèse, des questions restent encore en suspens et de nouvelles ont été soulevées. Il serait utile de poursuivre les recherches académiques (dites aussi « amont ») sur ces virus, comme celles faites dans notre laboratoire et d'autres, notamment celles qui visent à mieux comprendre l'initiation de l'infection de l'hôte, à maîtriser la spécificité d'hôte de ces virus et à prédire leur évolution. Ces recherches permettront d'exploiter pleinement les propriétés des densovirus et de limiter les risques potentiels liés à leur utilisation.

Références bibliographiques

Abd-Alla, A., Jousset, F.-X., Li, Y., Fédière, G., Cousserans, F., and Bergoin, M. (2004). NS-3 protein of the *Junonia coenia* densovirus is essential for viral DNA replication in an Ld 652 cell line and *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Virol.* 78, 790–797.

Abe H, Harada T, Kanehara M, Shimada T, Ohbayashi F, Oshiki T. Genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, *nsd-1*, in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet. Syst.* 1998; 73: 237–242.

Abe, H., Sugasaki, T., Kanehara, M., Shimada, T., Gomi, S.J., Ohbayashi, F., and Oshiki, T. (2000). Identification and genetic mapping of RAPD markers linked to the denonucleosis refractoriness gene, *nsd-2*, in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes Genet. Syst.* 75, 93–96.

Adelman ZN, Myles KM. The C-Type Lectin Domain Gene Family in *Aedes aegypti* and Their Role in Arbovirus Infection. *Viruses* 2018.

Afanasiev BN, Kozlov YV, Carlson JO, Beaty BJ. Densovirus of *Aedes aegypti* as an expression vector in mosquito cells. *Exp. Parasitol.* 1994; 79: 322–339.

Agbandje-McKenna MCM. Correlating structure with function in the viral capsid. In : Kerr JR, Cotmorre S, Bloom M, Linden M, Parrish C, eds. *Parvoviruses*. London : Hodder Arnold, p. 125-39. 2006.

Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., and Carstens, E.B. (2014). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2014). *Arch Virol* 159, 2831–2841.

Airenne, K., Hu, Y.-C., Kost, T., Smith, R., Kotin, R., Ono, C., Matsuura, Y., Wang, S., and Ylä-Herttuala, S. (2013). Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Molecular Therapy* 21, 739–749.

Alavandi, S.V., and Poornima, M. (2012). Viral Metagenomics: A Tool for Virus Discovery and Diversity in Aquaculture. *Indian J Virol* 23, 88–98.

Allen ML, Walker WB. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded ribonucleic acids. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 391–396.

de Almeida Melo, A. L., Soccol, V.T., and Soccol, C.R. (2014). *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 1–10.

Alonso, M.A., and Millán, J. (2001). The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *Journal of Cell Science* 114, 3957–3965.

Aoki K, Porterfield M, Lee SS, Dong B, Nguyen K, McGlamry KH, et al. The diversity of O-linked glycans expressed during *Drosophila melanogaster* development reflects stage- and tissue-specific requirements for cell signaling. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 30385–30400.

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, et al. The *Tribolium* chitin synthase genes *TcCHS1* and *TcCHS2* are specialized for synthesis of epidermal cuticle and

midgut peritrophic matrix. *Insect Mol. Biol.* 2005; 14: 453–463.

Arimatsu Y, Kotani E, Sugimura Y, Furusawa T. Molecular characterization of a cDNA encoding extracellular dsRNase and its expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2007; 37: 176–183.

Arrese EL, Soulages JL. insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu Rev Entomol* 2010; 55: 207–225.

Attoui, H., Mohd Jaafar, F., Belhouchet, M., Biagini, P., Cantaloube, J.-F., de Micco, P., and de Lamballerie, X. (2005). Expansion of family Reoviridae to include nine-segmented dsRNA viruses: isolation and characterization of a new virus designated *Aedes pseudoscutellaris* reovirus assigned to a proposed genus (*Dinovernavirus*). *Virology* 343, 212–223.

Auguste, A.J., Kaelber, J.T., Fokam, E.B., Guzman, H., Carrington, C.V.F., Erasmus, J.H., Kamgang, B., Popov, V.L., Jakana, J., Liu, X., et al. (2014). A Newly Isolated Reovirus Has the Simplest Genomic and Structural Organization of Any Reovirus. *J Virol* 89, 676–687.

Aukema, J.E., Leung, B., Kovacs, K., Chivers, C., Britton, K.O., Englin, J., Frankel, S.J., Haight, R.G., Holmes, T.P., Liebhold, A.M., et al. (2011). Economic Impacts of Non-Native Forest Insects in the Continental United States. *PLoS One* 6.

Avisar, D. (2005). Cell-cycle-dependent resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin in Sf9 cells. *Journal of Cell Science* 118, 3163–3171.

Banerjee, R., Hasler, J., Meagher, R., Nagoshi, R., Hietala, L., Huang, F., Narva, K., and Jurat-Fuentes, J.L. (2017). Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Scientific Reports* 7, 10877.

V. Barbehenn R, M. Martin M. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *Journal of Insect Physiology - J INSECT PHYSIOL* 1995; 41: 303–311.

Barbehenn RV. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Archives of insect biochemistry and physiology* 2001; 47: 86–99.

Barondes SH. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* 1984; 223: 1259–1264.

Barwise, A.H., and Walker, I.O. (1970). Studies on the DNA of a virus from *Galleria mellonella*. *FEBS Lett.* 6, 13–16.

Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1322–1326.

Bayyareddy, K., Zhu, X., Orlando, R., and Adang, M.J. (2012). Proteome Analysis of Cry4Ba Toxin-Interacting *Aedes aegypti* Lipid Rafts using geLC-MS/MS. *J Proteome Res* 11, 5843–5855.

Bella J, Kolatkar PR, Marlor CW, Greve JM, Rossmann MG. The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests how it functions as a rhinovirus receptor and as an LFA-1 integrin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 4140–4145.

Benelli, G., Jeffries, C., and Walker, T. (2016). Biological Control of Mosquito Vectors: Past, Present, and Future. *Insects* 7, 52.

- Bergoin, M., Devauchelle, G., and Vago, C. (1969). Electron microscopy study of the pox-like virus of *Melolontha melolontha* L (Coleoptera, Scarabeidae). *Archiv F Virusforschung* 28, 285–302.
- Berini F, Katz C, Gruzdev N, Casartelli M, Tettamanti G, Marinelli F. Microbial and viral chitinases: Attractive biopesticides for integrated pest management. *Biotechnology Advances* 2018.
- Bermejo-Jambrina, M., Eder, J., Helgers, L.C., Hertoghs, N., Nijmeijer, B.M., Stunnenberg, M., and Geijtenbeek, T.B.H. (2018). C-Type Lectin Receptors in Antiviral Immunity and Viral Escape. *Front Immunol* 9.
- Bhella D. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry [Internet]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2015; 370
- Bird, F.T., Sanders, C.J., and Burke, J.M. (1971). A newly discovered virus disease of the spruce budworm, *Choristoneura biennis*, (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 18, 159–161.
- Bishop JR, Gagneux P. Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes? *Glycobiology* 2007; 17: 23R-34R.
- Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, et al. Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion. *J. Virol.* 2004; 78: 6567–6584.
- Bolognesi, R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., and Ferreira, C. (2001). The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 62–75.
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, et al. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* 2012; 7: e47534.
- Bomsel, M., and Alfsen, A. (2003). Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 57–68.
- Bossin, H., Fournier, P., Royer, C., Barry, P., Cérutti, P., Gimenez, S., Couble, P., and Bergoin, M. (2003). *Junonia coenia* Densovirus-Based Vectors for Stable Transgene Expression in Sf9 Cells: Influence of the Densovirus Sequences on Genomic Integration. *J Virol* 77, 11060–11071.
- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 2010; 333: 524–538.
- Bravo, A., and Soberón, M. (2008). How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends in Biotechnology* 26, 573–579.
- Bravo, A., Gill, S.S., and Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435.
- Bruemmer, A., Scholari, F., Lopez-Ferber, M., Conway, J.F., and Hewat, E.A. (2005). Structure of an Insect Parvovirus (*Junonia coenia* Densovirus) Determined by Cryo-electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology* 347, 791–801.
- Buchkovich, N.J., Yu, Y., Zampieri, C.A., and Alwine, J.C. (2008). The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K–Akt–mTOR signalling pathway. *Nature Reviews Microbiology* 6, 266–275.

Caccia, S., Di Lelio, I., La Stora, A., Marinelli, A., Varricchio, P., Franzetti, E., Banyuls, N., Tettamanti, G., Casartelli, M., Giordana, B., et al. (2016). Midgut microbiota and host immunocompetence underlie *Bacillus thuringiensis* killing mechanism. *PNAS*.

Caldeira W, Dias AB, Terra WR, Ribeiro AF. Digestive enzyme compartmentalization and recycling and sites of absorption and secretion along the midgut of *Dermestes maculatus* (Coleoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2007; 64: 1–18.

Campbell PM, Cao AT, Hines ER, East PD, Gordon KHJ. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the gut of the caterpillar, *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2008; 38: 950–958.

Carlson J, Suchman E, Buchatsky L. Densoviruses for Control and Genetic Manipulation of Mosquitoes. In: *Advances in Virus Research*. Elsevier; 2006. p. 361–392.

Carrillo-Tripp, J., Krueger, E.N., Harrison, R.L., Toth, A.L., Miller, W.A., and Bonning, B.C. (2014). *Lymantria dispar* iflavivirus 1 (LdIV1), a new model to study iflaviral persistence in lepidopterans. *J. Gen. Virol.* 95, 2285–2296.

Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J.L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G.D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., et al. (2010). Survival strategies of a sterol auxotroph. *Development* 137, 3675–3685.

L. Capinera J, O. Crist T, B. Heppner J, E. Tzanakakis M, F. Gayubo S, Tartar A, et al. *Encyclopedia of Entomology*. 2008. p. 1893–1893.

Caspar, D.L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.

Cecioni S, Imberty A, Vidal S. Glycomimetics versus multivalent glycoconjugates for the design of high affinity lectin ligands. *Chem. Rev.* 2015; 115: 525–561.

Chang, J.H., Choi, J.Y., Jin, B.R., Roh, J.Y., Olszewski, J.A., Seo, S.J., O'Reilly, D.R., and Je, Y.H. (2003). An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *Journal of Invertebrate Pathology* 84, 30–37.

Chemani C, Imberty A, Bentzmann S de, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-Induced Lung Injury and Effect of Carbohydrate Ligands. *Infection and Immunity* 2009; 77: 2065–2075.

Chen L, Li F. Structural analysis of the evolutionary origins of influenza virus hemagglutinin and other viral lectins. *J. Virol.* 2013; 87: 4118–4120.

Chen, A.Y., and Qiu, J. (2010). Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest. *Future Virol* 5, 731–743.

Chen, J., Sun, J., Atanasov, I., Ryazantsev, S., and Zhou, Z.H. (2011). Electron Tomography Reveals Polyhedrin Binding and Existence of both Empty and Full Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Particles inside Infectious Polyhedra. *J. Virol* 85, 6077–6081.

Chen L, Li F. Structural analysis of the evolutionary origins of influenza virus hemagglutinin and other viral lectins. *J. Virol.* 2013; 87: 4118–4120.

- Cheng G, Cox J, Wang P, Krishnan MN, Dai J, Qian F, et al. A C-type lectin collaborates with a CD45 phosphatase homolog to facilitate West Nile virus infection of mosquitoes. *Cell* 2010; 142: 714–725.
- Chitnis, N.S., D’Costa, S.M., Paul, E.R., and Bilimoria, S.L. (2008). Modulation of iridovirus-induced apoptosis by endocytosis, early expression, JNK, and apical caspase. *Virology* 370, 333–342.
- Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R.D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Olieric, V., Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., et al. (2015). Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3973–3978.
- Christiaens O, Swevers L, Smagghe G. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 2014; 53: 307–314.
- Clavijo G, van Munster M, Monsion B, Bochet N, Brault V. Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. *J. Gen. Virol.* 2016; 97: 1000–1009.
- Cock, M.J.W., Beseh, P.K., Buddie, A.G., Cafá, G., and Crozier, J. (2017). Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. *Scientific Reports* 7, 4103.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676.
- Cook SC, Davidson DW. Nutritional and functional biology of exudate-feeding ants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2006; 118: 1–10.
- Cornick, S., Tawiah, A., and Chadee, K. (2015). Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers* 3.
- Cory, J.S. (2015). Insect virus transmission: different routes to persistence. *Current Opinion in Insect Science* 8, 130–135.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., et al. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology* 159, 1239–1247.
- Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P.W., Schulze-Briese, C., Mori, H., and Metcalf, P. (2007). The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* 446, 97–101.
- Cousserans F, Boublik Y, Salasc F, Cerutti M et Dupressoir T. 2013. Enjeux fondamentaux et biotechnologiques de la culture des cellules d'arthropode. In « Cultures de cellules animales », 3e édition, G. Barlovatz-Meimon et X.Ronot (coord.), Lavoisier, Paris, France.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372.
- Crava, C.M., Bel, Y., Jakubowska, A.K., Ferré, J., and Escriche, B. (2013). Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 924–935.
- Cristofolletti PT, Ribeiro AF, Deraison C, Rahbé Y, Terra WR. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 2003; 49:

11–24.

Cruz, I., Figueiredo, M. de L.C., Silva, R.B. da, Silva, I.F. da, Paula, C. deSouza, and Foster, J.E. (2012). Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* [Smith] [Lepidoptera: Noctuidae]) larvae in maize. *International Journal of Pest Management* 58, 83–90.

Cummings, R.D., and McEver, R.P. (2009). C-type Lectins. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Day CJ, Paton AW, Harvey RM, Hartley-Tassell LE, Seib KL, Tiralongo J, et al. Lectin activity of the pneumococcal pilin proteins. *Sci Rep* 2017; 7: 17784.

Delguste M, Koehler M, Alsteens D. Probing Single Virus Binding Sites on Living Mammalian Cells Using AFM. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1814: 483–514.

De Santa Barbara, P., Van Den Brink, G.R., and Roberts, D.J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 60, 1322–1332.

Delmas, B., Gelfi, J., Sjöström, H., Noren, O., and Laude, H. (1993). Further characterization of aminopeptidase-N as a receptor for coronaviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 293–298.

Deravel, J., Krier, F., and Jacques, P. (2014). Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13.

Deshoux M, Monsion B, Uzest M. Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Current Opinion in Virology* 2018; 33: 137–143.

Devauchelle, G., Bergoin, M., and Vago, C. (1971). Etude ultrastructurale du cycle de replication d'un entomopoxvirus dans les hémocytes de son hôte. *Journal of Ultrastructure Research* 37, 301–321.

Di, X., Sun, Y.K., McCrae, M.A., and Rossmann, M.G. (1991). X-ray powder pattern analysis of cytoplasmic polyhedrosis virus inclusion bodies. *Virology* 180, 153–158.

Diallo, B. (1978). Etude de l'infection à densovirus chez le lépidoptère *Spodoptera littoralis* Boisduval. Thèse de doctorat.

Dias, R.O., Cardoso, C., Pimentel, A.C., Damasceno, T.F., Ferreira, C., and Terra, W.R. (2018). The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin domains in the insect midgut: Insect mucus-forming mucins. *Insect Molecular Biology* 27, 46–60.

Dietzgen RG, Mann KS, Johnson KN. Plant Virus-Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses* 2016; 8

Ding, C., Urabe, M., Bergoin, M., and Kotin, R.M. (2002). Biochemical characterization of *Junonia coenia* densovirus nonstructural protein NS-1. *J. Virol.* 76, 338–345.

Ding W, Zhang LN, Yeaman C, Engelhardt JF. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol. Ther.* 2006; 13: 671–682.

van Dop, W.A., and van den Brink, G.R. (2012). Chapter 10 - Hedgehog Signaling in Gastrointestinal Morphogenesis and Morphostasis. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)*, L.R.

Johnson, F.K. Ghishan, J.D. Kaunitz, J.L. Merchant, H.M. Said, and J.D. Wood, eds. (Boston: Academic Press), pp. 303–327.

Dow null. pH gradients in Lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* 1992; 172: 355–375.

Dumas, B., Jourdan, M., Pascaud, A.M., and Bergoin, M. (1992). Complete nucleotide sequence of the cloned infectious genome of *Junonia coenia* densovirus reveals an organization unique among parvoviruses. *Virology* 191.

Dumas, P., Legeai, F., Lemaitre, C., Scaon, E., Orsucci, M., Labadie, K., Gimenez, S., Clamens, A.-L., Henri, H., Vavre, F., et al. (2015). *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? *Genetica* 143, 305–316.

Dutilh, B.E., Reyes, A., Hall, R.J., and Whiteson, K.L. (2017). Editorial: Virus Discovery by Metagenomics: The (Im)possibilities. *Front Microbiol* 8.

Edmondson, D.G., and Dent, S.Y. (2001). Identification of protein interactions by far western analysis. *Current Protocols in Protein Science Chapter 19*, Unit 19 7.

Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *Journal of Insect Physiology* 2000; 46: 1313–1320.

Eisenlord, M.E., Groner, M.L., Yoshioka, R.M., Elliott, J., Maynard, J., Fradkin, S., Turner, M., Pyne, K., Rivlin, N., van Hooonk, R., et al. (2016). Ochre star mortality during the 2014 wasting disease epizootic: role of population size structure and temperature. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 371.

El Far, M. et al., *Virus Research*, Volume 99, Issue 1, January 2004, Pages 17-24)

Engel, P., and Moran, N.A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* 37, 699–735.

Engelhard EK, Kam-Morgan LN, Washburn JO, Volkman LE. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 3224–3227.

Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C., and Omoto, C. (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Crop Protection* 64, 150–158.

Farquhar MG. The Glomerular Basement Membrane A Selective Macromolecular Filter. In: Hay ED, editor(s). *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*. Boston, MA: Springer US; 1991. p. 365–418.

Fédière, G. (2000). Epidemiology and Pathology of Densovirinae. In *Contributions to Microbiology*, pp. 1–11.

Ferreira C, N. Capella A, Sitnik R, Terra W. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 1994; 107: 631–640.

- Ferreira, A.H., Cristofolletti, P.T., Lorenzini, D.M., Guerra, L.O., Paiva, P.B., Briones, M.R., Terra, W.R., and Ferreira, C. (2007). Identification of midgut microvillar proteins from *Tenebrio molitor* and *Spodoptera frugiperda* by cDNA library screenings with antibodies. *Journal of Insect Physiology* *53*, 1112–1124.
- Ferrelli, M.L., Pidre, M.L., Ghiringhelli, P.D., Torres, S., Fabre, M.L., Masson, T., Cédola, M.T., Sciocco-Cap, A., and Romanowski, V. (2018). Genomic analysis of an Argentinean isolate of *Spodoptera frugiperda* granulovirus reveals that various baculoviruses code for Lef-7 proteins with three F-box domains. *PLOS ONE* *13*, e0202598.
- Ferrero, D.S., Buxaderas, M., Rodríguez, J.F., and Verdaguer, N. (2015). The Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase of a Permutotetravirus Suggests a Link between Primer-Dependent and Primer-Independent Polymerases. *PLOS Pathogens* *11*, e1005265.
- Figueiredo, M. L. C., Penteado-Dias, A. M. & Cruz, I. Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na produção de matéria seca e nos rendimentos de grãos, na cultura do milho. (Comunicado Técnico, 130). Embrapa/CNPMS, Sete Lagoas, Brazil, 6 pp. 2005.
- Finch, J., Crowther, R., Hendry, D., and Struthers, J. (1974). The Structure of Nudaurelia capensis fl Virus: the First Example of a Capsid with Icosahedral Surface Symmetry T 4. *J.gen.Virol* 191–200.
- Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991; 113: 503–514.
- François, S., Mutuel, D., Duncan, A., Rodrigues, L., Danzelle, C., Santos, I., Frayssinet, M., Filloux, D., Fernandez, D., Roumagnac, P., et al. (In prep). Metagenomic analysis of the viral communities associated with the two-spotted mite *Tetranychus urticae*. A new densovirus discovered in Acari. In Prep.
- François, S., Filloux, D., Roumagnac, P., Bigot, D., Gayral, P., Martin, D.P., Froissart, R., and Ogliastro, M. (2016). Discovery of parvovirus-related sequences in an unexpected broad range of animals. *Scientific Reports* *6*, 30880.
- Franz, J. (1998). Highlights in the development of the international organization for biological control of noxious animals and plants.
- Franzetti, E., Romanelli, D., and Tettamanti, G. (2014). Chapter 22 - The Key Role of Autophagy and its Relationship with Apoptosis in Lepidopteran Larval Midgut Remodeling. In *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, M.A. Hayat, ed. (Amsterdam: Academic Press), pp. 333–349.
- Franzetti, E., Casartelli, M., D'Antona, P., Montali, A., Romanelli, D., Cappelozza, S., Caccia, S., Grimaldi, A., de Eguileor, M., and Tettamanti, G. (2016). Midgut epithelium in molting silkworm: A fine balance among cell growth, differentiation, and survival. *Arthropod Struct Dev* *45*, 368–379.
- Gabius HJ. Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* 1997; 243: 543–576.
- Gammon DB, Mello CC. RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr Opin Insect Sci* 2015; 8: 111–120.
- Garbutt JS. RNA interference in insects: persistence and uptake of double-stranded RNA and activation of RNAi genes 2011.
- Gasmi L, Jakubowska AK, Ferre J, Ogliastro M, Herrero S. Characterization of two groups of

Spodoptera exigua Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) C-type lectins and insights into their role in defense against the densovirus JcDV. Archives of insect biochemistry and physiology 2018.

Gasmi L, Jakubowska AK, Herrero S. Gasmin (BV2-5), a polydnviral-acquired gene in Spodoptera exigua. Trade-off in the defense against bacterial and viral infections. Dev. Comp. Immunol. 2016; 56: 37–45.

Gaunitz S, Jin C, Nilsson A, Liu J, Karlsson NG, Holgersson J. Mucin-type proteins produced in the Trichoplusia ni and Spodoptera frugiperda insect cell lines carry novel O-glycans with phosphocholine and sulfate substitutions. Glycobiology 2013; 23: 778–796.

Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, Sarin SK, Hasnain SE. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. Mol. Ther. 2002; 6: 5–11.

Giraud C, Devauchelle G, Bergoin M. The densovirus of Junonia coenia (Jc DNV) as an insect cell expression vector. Virology 1992; 186: 207–218.

Goergen, G., Kumar, P.L., Sankung, S.B., Togola, A., and Tamò, M. (2016). 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.

Goldstein, I.J., and Hayes, C.E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv Carbohydr Chem Biochem 35, 127–340.

Gómez, I., Rodríguez-Chamorro, D.E., Flores-Ramírez, G., Grande, R., Zúñiga, F., Portugal, F.J., Sánchez, J., Pacheco, S., Bravo, A., and Soberón, M. (2018). Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) Aminopeptidase N1 Is a Functional Receptor of the Bacillus thuringiensis Cry1Ca Toxin. Appl. Environ. Microbiol. 84.

Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and McCawley, P. (1978). Gypsy moth cell lines divergent in viral susceptibility. I. Culture and identification. In Vitro 14, 485–494.

Gordon, K.H.J., and Hanzlik, T.N. (1998). Tetraviruses. In The Insect Viruses, L.K. Miller, and L.A. Ball, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 269–299.

Gosselin Grenet, A.-S., Salasc, F., François, S., Mutuel, D., Dupressoir, T., Multeau, C., Perrin, A., and Ogliastro, M. (2015). Les densovirus : une « massive attaque » chez les arthropodes. Virologie 19, 19–31.

Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., Hilliou, F., Durand, N., Montagné, N., Darboux, I., et al. (2017). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (Spodoptera frugiperda, Noctuidae) with different host-plant ranges. Scientific Reports 7.

Granados, R.R. (1973). Entry of an insect poxvirus by fusion of the virus envelope with the host cell membrane. Virology 52, 305–309.

Gringorten JL, Crawford DN, Harvey WR. High pH in the ectoperitrophic space of the larval lepidopteran midgut. J. Exp. Biol. 1993; 183: 353–359.

Guan R-B, Li H-C, Fan Y-J, Hu S-R, Christiaens O, Smagghe G, et al. A nuclease specific to lepidopteran insects suppresses RNAi. J. Biol. Chem. 2018; 293: 6011–6021.

Guardado-Calvo P, Muñoz EM, Llamas-Saiz AL, Fox GC, Kahn R, Curiel DT, et al. Crystallographic structure of porcine adenovirus type 4 fiber head and galectin domains. J. Virol. 2010; 84: 10558–10568.

- Guo, C.-J., Wu, Y.-Y., Yang, L.-S., Yang, X.-B., He, J., Mi, S., Jia, K.-T., Weng, S.-P., Yu, X.-Q., and He, J.-G. (2012). Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (a Fish Iridovirus) Enters Mandarin Fish Fry Cells via Caveola-Dependent Endocytosis. *Journal of Virology* 86, 2621–2631.
- Guo, Z., Kang, S., Chen, D., Wu, Q., Wang, S., Xie, W., Zhu, X., Baxter, S.W., Zhou, X., Jurat-Fuentes, J.L., et al. (2015). MAPK Signaling Pathway Alters Expression of Midgut ALP and ABCC Genes and Causes Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin in Diamondback Moth. *PLoS Genet* 11.
- Gupta, T., Kadono-Okuda, K., Ito, K., Trivedy, K., and Ponnuvel, K.. (2015). Densovirus infection in silkworm *Bombyx mori* and genes associated with disease resistance. *Invertebrate Survival Journal* 118–128.
- Van Haaren PMA, VanBavel E, Vink H, Spaan JAE. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 285: H2848-2856.
- Haas-Stapleton, E.J., Washburn, J.O., and Volkman, L.E. (2004). P74 Mediates Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *Journal of Virology* 78, 6786–6791.
- Harada, T., Takeda, M., Kojima, S., and Tomiyama, N. (2016). Toxicity and Carcinogenicity of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicol Res* 32, 21–33.
- Harbison, C.E., Chiorini, J.A., and Parrish, C.R. (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* 16, 208–214.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L., and Czaplá, T.H. (1998a). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue Cell* 30, 166–176.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L., and Czaplá, T.H. (1998b). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue Cell* 30, 166–176.
- Harrison, R.L., Herniou, E.A., Jehle, J.A., Theilmann, D.A., Burand, J.P., Becnel, J.J., Krell, P.J., van Oers, M.M., Mowery, J.D., Bauchan, G.R., et al. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. *Journal of General Virology* 99, 1185–1186.
- Hart GW, Akimoto Y. The O-GlcNAc Modification [Internet]. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editor(s). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Hart GW, West CM. Nucleocytoplasmic Glycosylation [Internet]. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editor(s). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Hatt S, Uytendroek R, Lopes T, Mouchon P, Osawa N, Piqueray J, et al. Identification of flower functional traits affecting abundance of generalist predators in perennial multiple species wildflower strips. *Arthropod-Plant Interactions* 2018.
- He B, Chu Y, Yin M, Müllen K, An C, Shen J. Fluorescent nanoparticle delivered dsRNA toward genetic

- control of insect pests. *Adv. Mater. Weinheim* 2013; 25: 4580–4584.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., and Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* 54, 285–302.
- Heierson, A., Sidén, I., Kivaisi, A., and Boman, H.G. (1986). Bacteriophage-resistant mutants of *Bacillus thuringiensis* with decreased virulence in pupae of *Hyalophora cecropia*. *J Bacteriol* 167, 18–24.
- Hell SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 1994; 19: 780–782.
- Henderson CW, Johnson CL, Lodhi SA, Bilimoria SL. Replication of Chilo iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay. *Arch. Virol.* 2001; 146: 767–775.
- Herth, W. (1980). Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterioochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *The Journal of Cell Biology* 87, 442–450.
- Hewson, I., Button, J.B., Gudenkauf, B.M., Miner, B., Newton, A.L., Gaydos, J.K., Wynne, J., Groves, C.L., Hendler, G., Murray, M., et al. (2014). Densovirus associated with sea-star wasting disease and mass mortality. *PNAS* 111, 17278–17283.
- Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 2000; 32: 1069–1077.
- Himeno M, Onodera K, Tanami Y. Properties of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1974; 23: 164–171.
- Huang, J.-H., Jing, X., and Douglas, A.E. (2015). The Multi-Tasking Gut Epithelium of Insects. *Insect Biochem Mol Biol* 67, 15–20.
- Huang, L.Y., Halder, S., and Agbandje-McKenna, M. (2014). Parvovirus glycan interactions. *Current Opinion in Virology* 7, 108–118.
- Huger, A.M. (2005). The *Oryctes* virus: Its detection, identification, and implementation in biological control of the coconut palm rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 89, 78–84.
- Huger, A., and Krieg, A. (1991). Non-occluded baculoviruses. In *Atlas of Invertebrate Viruses*, pp. 287–319.
- Hurpin, B. (1968). The influence of temperature and larval stage on certain diseases of *Melolontha melolontha*. *Journal of Invertebrate Pathology* 10, 252–262.
- Ito, K., Kidokoro, K., Sezutsu, H., Nohata, J., Yamamoto, K., Kobayashi, I., Uchino, K., Kalyebi, A., Eguchi, R., Hara, W., et al. (2008). Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7523–7527.

- Ito, K., Kidokoro, K., Shimura, S., Katsuma, S., and Kadono-Okuda, K. (2013). Detailed investigation of the sequential pathological changes in silkworm larvae infected with *Bombyx densovirus* type 1. *Journal of Invertebrate Pathology* *112*, 213–218.
- Ito, K., Shimura, S., Katsuma, S., Tsuda, Y., Kobayashi, J., Tabunoki, H., Yokoyama, T., Shimada, T., and Kadono-Okuda, K. (2016). Gene expression and localization analysis of *Bombyx mori* bidensovirus and its putative receptor in *B. mori* midgut. *Journal of Invertebrate Pathology* *136*, 50–56.
- Ito, K., Kidokoro, K., Katsuma, S., Sezutsu, H., Uchino, K., Kobayashi, I., Tamura, T., Yamamoto, K., Mita, K., Shimada, T., et al. (2018). A single amino acid substitution in the *Bombyx* -specific mucin-like membrane protein causes resistance to *Bombyx mori* densovirus. *Scientific Reports* *8*, 7430.
- Izumi Y, Furuse M. Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014; 36: 186–193.
- Izumi Y, Motoishi M, Furuse K, Furuse M. A tetraspanin regulates septate junction formation in *Drosophila* midgut. *J. Cell. Sci.* 2016; 129: 1155–1164.
- Izumi Y, Yanagihashi Y, Furuse M. A novel protein complex, Mesh-Ssk, is required for septate junction formation in the *Drosophila* midgut. *J. Cell. Sci.* 2012; 125: 4923–4933.
- Jackson, T.A. (2009). The Use of *Oryctes* Virus for Control of Rhinoceros Beetle in the Pacific Islands. In *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods*, A.E. Hajek, T.R. Glare, and M. O’Callaghan, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 133–140.
- Jackson, T.A., Crawford, A.M., and Glare, T.R. (2005). *Oryctes* virus—Time for a new look at a useful biocontrol agent. *Journal of Invertebrate Pathology* *89*, 91–94.
- Jakob, N.J., Darai, G., and Williams, T. (2001). Iridovirus. In *The Springer Index of Viruses*, C.A. Tidona, G. Darai, and C. Büchen-Osmond, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 475–480.
- Jakob NJ, Kleespies RG, Tidona CA, Müller K, Gelderblom HR, Darai G. Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: *Chilo* iridescent virus and a cricket iridovirus isolate. *Journal of General Virology* 2002; 83: 463–470.
- Jakubowska AK, Murillo R, Carballo A, Williams T, van Lent JWM, Caballero P, et al. Iflavirus increases its infectivity and physical stability in association with baculovirus. *PeerJ* 2016.
- Jang M-K, Kong B-G, Jeong Y-I, Lee CH, Nah J-W. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2004; 42: 3423–3432.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, J.-C., Miret, J.A.J., Navarro, M.N., et al. (2018a). Pest risk assessment of *Spodoptera frugiperda* for the European Union. *EFSA Journal* *16*, e05351.

- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Grégoire, J.-C., Miret, J.A.J., Navarro, M.N., et al. (2018b). Pest risk assessment of *Spodoptera frugiperda* for the European Union. *EFSA Journal* 16, e05351.
- Jehle, J.A., Lange, M., Wang, H., Hu, Z., Wang, Y., and Hauschild, R. (2006a). Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* 346, 180–193.
- Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Thiem, S.M., and Vlak, J.M. (2006b). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* 151, 1257–1266.
- Jiang H, Zhang JM, Wang JP, Yang B, Liu CF, Lu J, et al. Genetic engineering of *Periplaneta fuliginosa* densovirus as an improved biopesticide. *Arch. Virol.* 2007; 152: 383–394.
- Jiang H, Zhou L, Zhang J-M, Dong H-F, Hu Y-Y, Jiang M-S. Potential of *Periplaneta fuliginosa* densovirus as a biocontrol agent for smoky-brown cockroach, *P. fuliginosa*. *Biological Control* 2008; 46: 94–100.
- Jiang, H., Vilcinskas, A., and Kanost, M.R. (2010). Immunity in lepidopteran insects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 181–204.
- Joga MR, Zotti MJ, Smaghe G, Christiaens O. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol* 2016; 7.
- Johnson, S.J. (1987). Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. *International Journal of Tropical Insect Science* 8, 543–549.
- Johnson K. The Impact of *Wolbachia* on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 2015; 7: 5705–5717.
- Jourdan, M., Jousset, F.X., Gervais, M., Skory, S., Bergoin, M., and Dumas, B. (1990). Cloning of the genome of a densovirus and rescue of infectious virions from recombinant plasmid in the insect host *Spodoptera littoralis*. *Virology* 179, 403–409.
- Jurat-Fuentes JL, Karumbaiah L, Jakka SRK, Ning C, Liu C, Wu K, et al. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* 2011.
- Kato N, Mueller CR, Fuchs JF, Mcelroy K, Wessely V, Higgs S, et al. Evaluation of the Function of a Type I Peritrophic Matrix as a Physical Barrier for Midgut Epithelium Invasion by Mosquito-Borne Pathogens in *Aedes aegypti*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8: 701–712.
- Kapoor A, Simmonds P, Lipkin WI. Discovery and characterization of mammalian endogenous parvoviruses. *J. Virol.* 2010; 84: 12628–12635.
- Kawakita H, Miyamoto K, Wada S, Mitsuhashi W. Analysis of the ultrastructure and formation pattern of the peritrophic membrane in the cupreous chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl Entomol Zool* 2016; 51: 133–142.
- Kemenesi, G., Földes, F., Zana, B., Kurucz, K., Estók, P., Boldogh, S., Görföl, T., Bányai, K., Oldal, M., and Jakab, F. (2016). Genetic Characterization of Providence Virus Isolated from Bat Guano in Hungary. *Genome Announc.* 4, e00403-16.

- Kemmerer, M., and Bonning, B. (2018). Transcytosis of Junonia coenia densovirus VP4 across the gut epithelium of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*.
- Kim SY, Zhao J, Liu X, Fraser K, Lin L, Zhang X, et al. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. *Biochemistry* 2017; 56: 1151–1162.
- Kimble B, Nieto GR, Perez DR. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. *Virol J* 2010; 7: 365.
- Kobayashi Y, Kawagishi H. Fungal lectins: a growing family. *Methods Mol. Biol.* 2014; 1200: 15–38.
- Kolliopoulou A, Taning CNT, Smagghe G, Swevers L. Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Front Physiol* 2017.
- Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 631–664.
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 567–575.
- Krenn, H.W. (2010). Feeding Mechanisms of Adult Lepidoptera: Structure, Function, and Evolution of the Mouthparts. *Annu Rev Entomol* 55, 307–327.
- Kristensen, N., Scoble, M., and Karsholt, O. (2007). Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa* 699–747.
- Kuadkitkan A, Wikan N, Fongsaran C, Smith DR. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* 2010; 406: 149–161.
- Kubota, Y., Fujioka, K., and Takekawa, M. (2017). WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins. *PLoS One* 12.
- Kuno G, Chang G-JJ. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18: 608–637.
- Kuss SK, Best GT, Etheredge CA, Pruijssers AJ, Frierson JM, Hooper LV, et al. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science* 2011; 334: 249–52.
- Lacey, L.A. (2007). *Bacillus Thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 133–163.
- Lacey LA, Shapiro-Ilan DI. The potential role for microbial control of orchard insect pests in sustainable agriculture. 2003
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., and Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132, 1–41.
- Latham, J.R., Love, M., and Hilbeck, A. (2017a). The distinct properties of natural and GM cry insecticidal proteins. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 33, 62–96.
- Latham, J.R., Love, M., and Hilbeck, A. (2017b). The distinct properties of natural and GM cry insecticidal proteins. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 33, 62–96.

- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 112–126.
- Lecoq, H. (2001). [Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?]. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie* 324, 929–933.
- Lee HS, Qi Y, Im W. Effects of N-glycosylation on protein conformation and dynamics: Protein Data Bank analysis and molecular dynamics simulation study. *Sci Rep* 2015.
- Lee E, Lobigs M. E protein domain III determinants of yellow fever virus 17D vaccine strain enhance binding to glycosaminoglycans, impede virus spread, and attenuate virulence. *J. Virol.* 2008; 82: 6024–6033.
- Lee, S., Park, K.-H., Nam, S.-H., Kwak, K.-W., and Choi, J.-Y. (2015). First Report of *Oryctes rhinoceros nudivirus* (Coleoptera: Scarabaeidae) Causing Severe Disease in *Allomyrina dichotoma* in Korea. *J Insect Sci* 15.
- Legeai, F., Gimenez, S., Duvic, B., Escoubas, J.M., Gosselin Grenet, A.S., Blanc, F., Cousserans, F., Seninet, I., Bretaudeau, A., Mutuel, D., et al. (2014). Establishment and analysis of a reference transcriptome for *Spodoptera frugiperda*. *BMC Genomics* 15, 704.
- Lehane MJ. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* 1997; 42: 525–550.
- Lemaitre B, Miguel-Aliaga I. The digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of genetics* 2013; 47: 377–404.
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., and Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology* 10, 19864–19873.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., and Chaufaux, J. (1995). Overproduction of Encapsulated Insecticidal Crystal Proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA Mutant. *Bio/Technology* 13, 67.
- Levy, S., Falleiros, A.M., Moscardi, F., Gregorio, E., and Toledo, L. (2004). Morphological Study of the Hindgut in Larvae of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology* 427–432.
- Li, Y., Jousset, F.X., Giraud, C., Rolling, F., Quiot, J.M., and Bergoin, M. (1996). A titration procedure of the *Junonia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines. *Journal of Virological Methods* 57, 47–60.
- Li Y, Jousset FX, Giraud C, Rolling F, Quiot JM, Bergoin M. A titration procedure of the *Junonia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines. *Journal of virological methods* 1996b; 57: 47–60.
- Li H, Chougule NP, Bonning BC. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *J. Invertebr. Pathol.* 2011; 107: 69–78.
- Li S, Ge S, Wang X, Sun L, Liu Z, Zhou Y. Facilitation of rice stripe virus accumulation in the insect vector by Himetobi P virus VP1. *Viruses* 2015; 7: 1492–1504.

- Lima, M.S., Silva, P.S.L., Oliveira, O.F., Silva, K.M.B., and Freitas, F.C.L. (2010). Corn yield response to weed and fall armyworm controls. *Planta Daninha* 28, 103–111.
- Linz LB, Liu S, Chougule NP, Bonning BC. In Vitro Evidence Supports Membrane Alanine Aminopeptidase N as a Receptor for a Plant Virus in the Pea Aphid Vector. *Journal of Virology* 2015; 89: 11203–11212.
- Liu, K., Li, Y., Jousset, F.-X., Zadori, Z., Szelei, J., Yu, Q., Pham, H.T., Lépine, F., Bergoin, M., and Tijssen, P. (2011). The *Acheta domesticus* Densovirus, Isolated from the European House Cricket, Has Evolved an Expression Strategy Unique among Parvoviruses. *J Virol* 85, 10069–10078.
- Liu H, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, et al. Widespread endogenization of densoviruses and parvoviruses in animal and human genomes. *J. Virol.* 2011; 85: 9863–9876.
- Liu J, Swevers L, Iatrou K, Huvenne H, Smagghe G. *Bombyx mori* DNA/RNA non-specific nuclease: expression of isoforms in insect culture cells, subcellular localization and functional assays. *J. Insect Physiol.* 2012; 58: 1166–1176.
- Liu Y, Zhang F, Liu J, Xiao X, Zhang S, Qin C, et al. Transmission-blocking antibodies against mosquito C-type lectins for dengue prevention. *PLoS Pathog.* 2014; 10: e1003931.
- Liu K, Qian Y, Jung Y-S, Zhou B, Cao R, Shen T, et al. mosGCTL-7, a C-Type Lectin Protein, Mediates Japanese Encephalitis Virus Infection in Mosquitoes. *J. Virol.* 2017; 91
- Liu L, Qu M, Yang J, Yang Q. The physiological differentiation along the midgut of *Bombyx mori* – inspirations from proteomics and gene expression patterns of the secreted proteins in the ectoperitrophic space. *Insect Molecular Biology* 2018; 27: 247–259.
- Loiseau V, Giraud I, Federici B, Bigot Y, Cordaux R, Gilbert C. Iridovirus IIV31 : un pathogène d'isopodes terrestres remarquable. *Virologie* 2017; 21: 147–149.
- Londono-Renteria B, Troupin A, Conway MJ, Vesely D, Ledizet M, Roundy CM, et al. Dengue Virus Infection of *Aedes aegypti* Requires a Putative Cysteine Rich Venom Protein. *PLoS Pathog* 2015; 11.
- Longworth, J.F. Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.* 23, 103–157. 1978.
- de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachere, E. (2011a). Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PloS One* 6, e23142.
- de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachere, E. (2011b). Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PloS One* 6, e23142.
- Lucena, W.A., Pelegrini, P.B., Martins-de-Sa, D., Fonseca, F.C.A., Gomes, J.E., de Macedo, L.L.P., da Silva, M.C.M., Oliveira, R.S., and Grossi-de-Sa, M.F. (2014). Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. *Toxins (Basel)* 6, 2393–2423.
- Ludwig GV, Kondig JP, Smith JF. A putative receptor for Venezuelan equine encephalitis virus from mosquito cells. *J. Virol.* 1996; 70: 5592–5599.

- Luo, Y., Kleiboeker, S., Deng, X., and Qiu, J. (2013). Human parvovirus B19 infection causes cell cycle arrest of human erythroid progenitors at late S phase that favors viral DNA replication. *J. Virol.* 87, 12766–12775.
- Lykken, E.A., Shyng, C., Edwards, R.J., Rozenberg, A., and Gray, S.J. (2018). Recent progress and considerations for AAV gene therapies targeting the central nervous system. *J Neurodev Disord* 10, 16.
- Mamta B, Rajam MV. RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiol Mol Biol Plants* 2017; 23: 487–501.
- Manié, S.N., de Breyne, S., Debreyne, S., Vincent, S., and Gerlier, D. (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J. Virol.* 74, 305–311.
- Mao J, Zeng F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Res.* 2014; 23: 145–152.
- Mao Y-B, Cai W-J, Wang J-W, Hong G-J, Tao X-Y, Wang L-J, et al. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1307–1313.
- Marchal I, Jarvis DL, Cacan R, Verbert A. Glycoproteins from Insect Cells: Sialylated or Not? *Biol Chem* 2001; 382: 151–159.
- Marheineke, K., Grünewald, S., Christie, W., and Reiländer, H. (1998). Lipid composition of *Spodoptera frugiperda* (Sf9) and *Trichoplusia ni* (Tn) insect cells used for baculovirus infection. *FEBS Lett.* 441, 49–52.
- Marques, J.T., and Imler, J.-L. (2016). The diversity of insect antiviral immunity: insights from viruses. *Curr Opin Microbiol* 32, 71–76.
- Marulappa, S. Y., and Kapil, S. (2009). Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 127–131.
- Marzban, R., He, Q., Zhang, Q., and Liu, X.X. (2014). Histopathology of cotton bollworm midgut infected with *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Braz J Microbiol* 44, 1231–1236.
- Matrosovich M, Herrler G, Klenk HD. Sialic Acid Receptors of Viruses. In: Gerardy-Schahn R, Delannoy P, von Itzstein M, editor(s). *SialoGlyco Chemistry and Biology II*. Cham: Springer International Publishing; 2013. p. 1–28.
- Marrone P. Barriers to adoption of biological control agents and biological pesticides. *Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2010; 2.
- McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3, 201–213.
- Mendoza-Cano, F., Enríquez-Espinoza, T., Valenzuela, A., EG, T., and Sánchez-Paz, A. (2016). High Occurrence of the Decapod Penstylidensovirus (PstDV1) Detected in Postlarvae of *Penaeus vannamei* Produced in Commercial Hatcheries of Mexico. *EcoHealth* 13, 1–7.
- Merzendorfer H. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2006; 176: 1–15.

- Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science* 20, 121–138.
- Merzendorfer, H., and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206, 4393–4412.
- Mesnage, R., and Seralini, G.-E. (2018). Editorial: Toxicity of Pesticides on Health and Environment. *Front Public Health* 6, 268.
- Mietzsch M, Broecker F, Reinhardt A, Seeberger PH, Heilbronn R. Differential Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Interaction Patterns with Synthetic Heparins and Other Glycans. *J Virol* 2014; 88: 2991–3003.
- Mitchell, D.A. (2008). Methods for Epitope Characterization of Adeno-Associated Virus Type-2 Through Antibody Neutralization Escape Mutants.
- Mitchell, E.R., McNeil, J.N., Westbrook, J.K., Silvain, J.F., Lalanne-Cassou, B., Chalfant, R., Pair, S., Waddill, V., Sotomayor-Rios, A., and Proshold, F.. (1991). Seasonal Periodicity of Fall Armyworm, (Lepidoptera: Noctuidae) in the Caribbean Basin and Northward to Canada. *J. Entomol. Sci.* 39–50.
- Mitsuhashi, W., and Miyamoto, K. (2003). Disintegration of the peritrophic membrane of silkworm larvae due to spindles of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.* 82, 34–40.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., and Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *Journal of Virology* 81, 4235–4243.
- Moore MD, Jaykus L-A. Virus–Bacteria Interactions: Implications and Potential for the Applied and Agricultural Sciences. *Viruses* 2018; 10.
- Morris on. Susceptibility of some forest insects to mixtures of commercial bacillus thuringiensis and chemical insecticides, and sensitivity of the pathogen to the insecticides. *The Canadian Entomologist* 1972; 104: 1419–1425.
- Mosimann, A.L.P., Bordignon, J., Mazzarotto, G.C.A., Motta, M.C.M., Hoffmann, F., and Santos, C.N.D.D. (2011). Genetic and biological characterization of a densovirus isolate that affects dengue virus infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106, 285–292.
- Mulot M, Monsion B, Boissinot S, Rastegar M, Meyer S, Bochet N, et al. Transmission of Turnip yellows virus by Myzus persicae Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9.
- Multeau, C., Froissart, R., Perrin, A., Castelli, I., Casartelli, M., and Ogliastro, M. (2012). Four amino acids of an insect densovirus capsid determine midgut tropism and virulence. *Journal of Virology* 86, 5937–5941.
- van Munster M, Dullemans AM, Verbeek M, van den Heuvel JFJM, Reinbold C, Brault V, et al. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid Myzus persicae. *J. Invertebr. Pathol.* 2003; 84: 6–14.

Murray, S., Nilsson, C.L., Hare, J.T., Emmett, M.R., Korostelev, A., Ongley, H., Marshall, A.G., and Chapman, M.S. (2006). Characterization of the Capsid Protein Glycosylation of Adeno-Associated Virus Type 2 by High-Resolution Mass Spectrometry. *J Virol* *80*, 6171–6176.

Musser FR, Nyrop JP, Shelton AM. Integrating biological and chemical controls in decision making: European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) control in sweet corn as an example. *J. Econ. Entomol.* 2006; 99: 1538–1549.

Mutuel, D., Ravallec, M., Chabi, B., Multeau, C., Salmon, J.M., Fournier, P., and Ogliastro, M. (2010). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of infection that leads to hypoxia. *Virology* *403*, 137–144.

Nabi, I.R., and Le, P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* *161*, 673–677.

Nagoshi, R.N., Goergen, G., Tounou, K.A., Agboka, K., Koffi, D., and Meagher, R.L. (2018). Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. *Scientific Reports* *8*, 3710.

Nakhleh, J., El Moussawi, L., and Osta, M.A. (2017). Chapter Three - The Melanization Response in Insect Immunity. In *Advances in Insect Physiology*, P. Ligoxygakis, ed. (Academic Press), pp. 83–109.

Nardi JB, Bee CM. Regenerative cells and the architecture of beetle midgut epithelia. *J. Morphol.* 2012; 273: 1010–1020.

Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* *31*, 317–334.

Nepomuceno DB, Santos VC, Araújo RN, Pereira MH, Sant’Anna MR, Moreira LA, et al. pH control in the midgut of *Aedes aegypti* under different nutritional conditions. *Journal of Experimental Biology* 2017; 220: 3355–3362.

Ng R, Govindasamy L, Gurda BL, McKenna R, Kozyreva OG, Samulski RJ, et al. Structural characterization of the dual glycan binding adeno-associated virus serotype 6. *J. Virol.* 2010; 84: 12945–12957.

Nielsen, K.L., Hogh, A.L., and Emmersen, J. (2006a). DeepSAGE--digital transcriptomics with high sensitivity, simple experimental protocol and multiplexing of samples. *Nucleic Acids Research* *34*, e133.

Ohkawa, T., Washburn, J.O., Sitapara, R., Sid, E., and Volkman, L.E. (2005). Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Midgut Cells of *Heliothis virescens* Larvae Is Mediated by Products of *pif* Genes *Ac119* and *Ac022* but Not by *Ac115*. *Journal of Virology* *79*, 15258–15264.

Ohkawa, T., Volkman, L.E., and Welch, M.D. (2010). Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *The Journal of Cell Biology* *190*, 187–195.

de Oliveira Andrade, L. (2016). Understanding the role of cholesterol in cellular biomechanics and regulation of vesicular trafficking: The power of imaging. *Biomedical Spectroscopy and Imaging* *5*, S101–S117.

Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., and Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell Proteomics* *4*, 2010–2021.

- Owens, L. (2013). Bioinformatical analysis of nuclear localisation sequences in penaeid densovirus. *Mar Genomics* 12, 9–15.
- Palli SR. RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Curr Opin Insect Sci* 2014; 6: 1–8.
- Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* 2013; 37: 3–22.
- Pashley, D.P. (1986). Host-associated Genetic Differentiation in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a Sibling Species Complex? *Annals of the Entomological Society of America* 79, 898–904.
- Pashley, D.P., Johnson, S.J., and Sparks, A.N. (1985). Genetic Population Structure of Migratory Moths: the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann Entomol Soc Am* 78, 756–762.
- Pham, H.T., Huynh, O.T.H., Jousset, F.-X., Bergoin, M., and Tijssen, P. (2013). *Junonia coenia* Densovirus (JcDNV) Genome Structure. *Genome Announc* 1.
- Peters W. Peritrophic Membranes [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992.
- Pillay S, Zou W, Cheng F, Puschnik AS, Meyer NL, Ganaie SS, et al. AAV serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular receptor AAVR. *J. Virol.* 2017
- Pogue, M. (2002). A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). *Memoirs of the American Entomological Society*.
- Poitout, S., Bues, R., and Rumeur, C.L. (1972). Élevage Sur Milieu Artificiel Simple De Deux Noctuelles Parasites Du Coton *Earias Insulana* Et *Spodoptera Littoralis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 15, 341–350.
- Polo, S., and Di Fiore, P.P. (2006). Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 124, 897–900.
- Ponchel null, Irache null. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; 34: 191–219.
- Pringle, F.M., Johnson, K.N., Goodman, C.L., McIntosh, A.H., and Ball, L.A. (2003). Providence virus: a new member of the tetraviridae that infects cultured insect cells. *Virology* 306, 359–370.
- Qin F, Liu W, Wu N, Zhang L, Zhang Z, Zhou X, et al. Invasion of midgut epithelial cells by a persistently transmitted virus is mediated by sugar transporter 6 in its insect vector. *PLOS Pathogens* 2018; 14: e1007201.
- Quan GX, Kanda T, Tamura T. Induction of the white egg 3 mutant phenotype by injection of the double-stranded RNA of the silkworm white gene. *Insect Mol. Biol.* 2002; 11: 217–222.
- Raman R, Tharakaraman K, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Glycan-Protein Interactions in Viral Pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol* 2016; 40: 153–162.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N. (2010). *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends in Microbiology* 189–193.
- Rees, J.S., Jarrett, P., and Ellar, D.J. (2009). Peritrophic membrane contribution to Bt Cry delta-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 139–146.

- Ren X, Hoiczky E, Rasgon J. Viral Paratransgenesis in the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. PLoS pathogens 2008; 4: e1000135.
- Ren X, Rasgon JL. Potential for the *Anopheles gambiae* densovirus to act as an ‘evolution-proof’ biopesticide. Journal of virology 2010; 84: 7726–9.
- Rendić, D., and Wilson, I. (2008). The Glycosylation Capacity of Insect Cells. Croatica Chemica Acta (CCA@chem.pmf.hr); Vol.81 No.1.
- Ribeiro C, Brehélin M. Insect haemocytes: what type of cell is that? J. Insect Physiol. 2006; 52: 417–429.
- Rivière M, Olivier V, Blanchard P. Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other? J. Invertebr. Pathol. 2010; 103 Suppl 1: S120-131.
- Rizk F, Laverdure S, d’Alençon E, Bossin H, Dupressoir T. Linear Lepidopteran ambidensovirus 1 sequences drive random integration of a reporter gene in transfected *Spodoptera frugiperda* cells. PeerJ 2018; 6: e4860.
- Rivera-Ciprian JP, Aceituno-Medina M, Guillen K, Hernández E, Toledo J. Midgut Protease Activity During Larval Development of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) Fed With Natural and Artificial Diet. J Insect Sci 2017.
- Rivers, C.F., and Longworth, J.F. (1972). A nonoccluded virus of *Junonia coenia* (Nymphalidae: Lepidoptera). Journal of Invertebrate Pathology 20, 369–370.
- Rodríguez-Cabrera L, Trujillo-Bacallao D, Borrás-Hidalgo O, Wright DJ, Ayra-Pardo C. RNAi-mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. Environ. Microbiol. 2010; 12: 2894–2903.
- Rohrmann, G.F. (2013). Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions (National Center for Biotechnology Information (US)).
- Roehring S, Smith DR. Induction of apoptosis in densovirus infected *Aedes aegypti* mosquitoes. Journal of Invertebrate Pathology 2010; 104: 239–241.
- Rolling F. Vecteurs dérivés du densovirus de *Junonia coenia* (JcDNV) exprimant sous forme épisomale ou intégrée des gènes étrangers dans des cellules d’insectes *episomal or integrated vectors derived from the Junonia coenia densovirus (JcDNV) expressing foreign genes in insect cells* PhD thesis, University of Aix-Marseille II, Marseille, France. 1992.
- Rosario, K., and Breitbart, M. (2011). Exploring the viral world through metagenomics. Curr Opin Virol 1, 289–297.
- Rosenberger, C.M., Brumell, J.H., and Finlay, B.B. (2000). Microbial pathogenesis: lipid rafts as pathogen portals. Curr. Biol. 10, R823-825.
- Royer C, Bossin H, Romane C, Bergoin M, Couble P. High amplification of a densovirus-derived vector in larval and adult tissues of *Drosophila*. Insect Mol. Biol. 2001; 10: 275–280.
- Ruiu L. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. Insects 2015; 6: 352–367.

- Russo, A.G., Eden, J.-S., Enosi Tuipulotu, D., Shi, M., Selechnik, D., Shine, R., Rollins, L.A., Holmes, E.C., and White, P.A. (2018). Viral Discovery in the Invasive Australian Cane Toad (*Rhinella marina*) Using Metatranscriptomic and Genomic Approaches. *J. Virol.* 92.
- Salasc, F., Mutuel, D., Debaisieux, S., Perrin, A., Dupressoir, T., Grenet, A.S., and Ogliastro, M. (2016). Role of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/target of rapamycin pathway during ambidensovirus infection of insect cells. *The Journal of General Virology* 97, 233–245.
- Sanlioglu, S., Benson, P.K., Yang, J., Atkinson, E.M., Reynolds, T., and Engelhardt, J.F. (2000). Endocytosis and Nuclear Trafficking of Adeno-Associated Virus Type 2 Are Controlled by Rac1 and Phosphatidylinositol-3 Kinase Activation. *J Virol* 74, 9184–9196.
- Sarauer BL, Gillott C, Hegedus D. Characterization of an intestinal mucin from the peritrophic matrix of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol.* 2003; 12: 333–343.
- Schiller, B., Hykollari, A., Yan, S., Paschinger, K., and Wilson, I.B.H. (2012). Complicated N-linked glycans in simple organisms. *Biol Chem* 393, 661–673.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 775–806.
- Shternshis M, Ovchinnikova L, Duzhak A, Tomilova O. The Efficiency of Viral and Bacterial Entomopathogens Formulated with Chitinase for Biocontrol of Lepidopteran Cabbage Pests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2002; 35: 161–169.
- Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM. Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. *ISRN Microbiol* 2014; 2014.
- Seleena P, Lee HL, Chiang YF. Compatibility of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis and chemical insecticides for the control of *Aedes* mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 1999; 24: 216–223.
- Sharon, N. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53R–62R.
- Shi, X., Chamankhah, M., Visal-Shah, S., Hemmingsen, S.M., Erlandson, M., Braun, L., Alting-Mees, M., Khachatourians, G.G., O’Grady, M., and Hegedus, D.D. (2004). Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1101–1115.
- Shirk, P.D., Bossin, H., Furlong, R.B., and Gillett, J.L. (2007). Regulation of *Junonia coenia* densovirus P9 promoter expression. *Insect Mol. Biol.* 16, 623–633.
- Short, J.R., Nakayinga, R., Hughes, G.E., Walter, C.T., and Dorrington, R.A. (2013). Providence virus (family: Carmotetraviridae) replicates vRNA in association with the Golgi apparatus and secretory vesicles. *Journal of General Virology* 94, 1073–1078.
- Shrestha, S., Parks, C.G., Goldner, W.S., Kamel, F., Umbach, D.M., Ward, M.H., Lerro, C.C., Koutros, S., Hofmann, J.N., Beane Freeman, L.E., et al. (2018). Pesticide Use and Incident Hypothyroidism in Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives* 126, 097008.
- Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 2018; 27: 135–145.

- Smilanich, A.M., Langus, T.C., Doan, L., Dyer, L.A., Harrison, J.G., Hsueh, J., and Teglas, M.B. (2018). Host plant associated enhancement of immunity and survival in virus infected caterpillars. *Journal of Invertebrate Pathology* 151, 102–112.
- Smith, G.L., Vanderplasschen, A., and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology* 83, 2915–2931.
- Sokurenko EV, Chesnokova V, Doyle RJ, Hasty DL. Diversity of the Escherichia coli Type 1 Fimbrial Lectin differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 17880–17886.
- Sparks, A.N. (1979). A Review of the Biology of the Fall Armyworm. *The Florida Entomologist* 62, 82–87.
- Sparks, A.N. (1986). Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): Potential for Area-Wide Management. *The Florida Entomologist* 69, 603–614.
- Spence, J.R., Lauf, R., and Shroyer, N.F. (2011). Vertebrate Intestinal Endoderm Development. *Dev Dyn* 240, 501–520.
- Sporleder, M., and Lacey, L.A. (2013). Insect pests of potato.
- Stanley P, Schachter H, Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editor(s). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- Staudacher E. Mucin-Type O-Glycosylation in Invertebrates. *Molecules* 2015; 20: 10622–10640.
- Steele KH, Stone BJ, Franklin KM, Zhang X, Jiang H, Webb BA, et al. Improving the Baculovirus Expression Vector System with Vankyrin-Enhanced Technology. *Biotechnol Prog* 2017; 33: 1496–1507.
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.-B.G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., et al. (2013). Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32, 1478–1488.
- Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, Stehle T, Dermody TS. The sweet spot: defining virus–sialic acid interactions. *Nat Rev Microbiol* 2014; 12: 739–749.
- Ströh LJ, Stehle T. Glycan Engagement by Viruses: Receptor Switches and Specificity. *Annu. Rev. Virol.* 2014; 1: 285–306.
- Stork, N.E., McBroom, J., Gely, C., and Hamilton, A.J. (2015). New approaches narrow global species estimates for beetles, insects, and terrestrial arthropods. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 7519–7523.
- Su, L., Xu, C., Cheng, C., Lei, C., and Sun, X. (2017). MTase Domain of Dendrolimus punctatus cytovirus VP3 Mediates Virion Attachment and Interacts with Host ALP Protein. *Viruses* 9.
- Sugiharti, M., Ono, C., Ito, Toshiaki, Asano, S., Sahara, K., Pujiastuti, Y., and Bando, H. (2010). Isolation of the Thoesa asigna virus (TaV) from the epizootic Setothoesa asigna larvae collected in South Sumatra

and a study on its pathogenicity to Limacodidae larvae in Japan. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 117–124.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2003). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316, 267–280.

Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.

Swevers L, Vanden Broeck J, Smagghe G. The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: a hypothesis. *Front Physiol* 2013; 4: 319.

Syed ZA, Hard T, Uv A, van Dijk-Hard IF. A potential role for *Drosophila* mucins in development and physiology. *PloS one* 2008; 3: e3041.

Tabashnik, B.E., Zhang, M., Fabrick, J.A., Wu, Y., Gao, M., Huang, F., Wei, J., Zhang, J., Yelich, A., Unnithan, G.C., et al. (2015). Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Sci Rep* 5.

Takahashi T, Suzuki T. Role of Glycans in Viral Infection. In: Suzuki T, Ohtsubo K, Taniguchi N, editor(s). *Sugar Chains: Decoding the Functions of Glycans*. Tokyo: Springer Japan; 2015. p. 71–93.

Takemoto, Y., Mitsuhashi, W., Murakami, R., Konishi, H., and Miyamoto, K. (2008). The N-Terminal Region of an Entomopoxvirus Fusolin Is Essential for the Enhancement of Peroral Infection, whereas the C-Terminal Region Is Eliminated in Digestive Juice. *J Virol* 82, 12406–12415.

Tan, Y.-R., Sun, J.-C., Lu, X.-Y., Su, D.-M., and Zhang, J.-Q. (2003). Entry of *Bombyx mori* cyovirus 1 into midgut cells in vivo. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52, 485–489.

Tanaka, S., Miyamoto, K., Noda, H., Jurat-Fuentes, J.L., Yoshizawa, Y., Endo, H., and Sato, R. (2013). The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *The FEBS Journal* 1782–1794.

Taning CNT, Christiaens O, Berkvens N, Casteels H, Maes M, Smagghe G. Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: laboratory testing against larval and adult stages. *J Pest Sci* 2016; 89: 803–814.

Taning CNT, Van Eynde B, Yu N, Ma S, Smagghe G. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology* 2017; 98: 245–257.

Tassetto M, Kunitomi M, Andino R. Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*. *Cell* 2017; 169: 314-325.e13.

Teixeira L, Ferreira Á, Ashburner M. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 2008; 6: e1000002.

Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P. Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1999; 29: 87–101.

Tellam, R.L., and Eisemann, C. (2000). Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1189–1201.

Terra WR, Ferreira C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry 1994; 109: 1–62.

Terra, W.R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.

Terra, W.R., Costa, R.H., and Ferreira, C. (2006). Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 78, 255–269.

Terra WR, Ferreira C. 11 - Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In: Gilbert LI, editor(s). *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. San Diego: Academic Press; 2012. p. 365–418.

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: 231–245.

Thomas J. Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues. *J. Insect Sci.* 2003; 3: 17.

Thouvenot, E., Urbach, S., Dantec, C., Poncet, J., Séveno, M., Demette, E., Jouin, P., Touchon, J., Bockaert, J., and Marin, P. (2008). Enhanced detection of CNS cell secretome in plasma protein-depleted cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 7, 4409–4421.

Tian H, Peng H, Yao Q, Chen H, Xie Q, Tang B, et al. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. *PLOS ONE* 2009; 4: e6225.

Tijssen, P., and Bergoin*, M. (1995). Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars in Virology* 6, 347–355.

Tijssen, P., and Kurstak, E. (1981). Biochemical, biophysical, and biological properties of densonucleosis virus (parvovirus). III. common sequences of structural proteins. *J. Virol.* 37, 17.

Tijssen, P., van den Hurk, J., and Kurstak, E. (1976). Biochemical, biophysical, and biological properties of densonucleosis virus. I. Structural proteins. *J. Virol.* 17, 686.

Tijssen, P., Péntzes, J.J., Yu, Q., Pham, H.T., and Bergoin, M. (2016). Diversity of small, single-stranded DNA viruses of invertebrates and their chaotic evolutionary past. *Journal of Invertebrate Pathology* 140, 83–96.

Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj. J.* 2004; 21: 343–360.

Torres-Flores J, Arias C. Tight Junctions Go Viral! *Viruses* 2015; 7: 5145–5154.

Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from *Acta. Physiol. Scand.* 23: 110-127, 1951. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999; 10: 2056–2065.

Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.Y., and Parrish, C.R. (1995). Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology* 211, 123–132.

- Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevielle C, Cot D, Blanc S. The ‘acrostyle’: a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 2010; 39: 221–229.
- Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A Distinct Small RNA Pathway Silences Selfish Genetic Elements in the Germline. *Science* 2006; 313: 320–324.
- Vail PV, Morris TJ, Collier SS. An RNA virus in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus preparations: Gross pathology and infectivity. *Journal of Invertebrate Pathology* 1983; 41: 179–183.
- Vandenborre G, Smagghe G, Ghesquiere B, Menschaert G, Nagender Rao R, Gevaert K, et al. Diversity in protein glycosylation among insect species. *PloS one* 2011; 6: e16682.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017; 27: 3–49.
- Vaughn, J.L., Goodwin, R.H., Tompkins, G.J., and McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro* 13, 213–217.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484–487.
- Vendeville, A., Ravallec, M., Jousset, F.-X., Devise, M., Mutuel, D., López-Ferber, M., Fournier, P., Dupressoir, T., and Ogliastro, M. (2009). Densovirus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J. Virol.* 83, 4678–4689.
- Vijayendran D, Airs PM, Dolezal K, Bonning BC. Arthropod viruses and small RNAs. *J. Invertebr. Pathol.* 2013; 114: 186–195.
- Viswanathan K, Narang S, Betenbaugh MJ. Engineering Sialic Acid Synthesis Ability in Insect Cells. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1321: 171–178.
- Volkman, L.E., and Goldsmith, P.A. (1982). Generalized Immunoassay for *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infectivity In Vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 227–233.
- Walker, A.S. (2013). Diversité et adaptation aux fongicides des populations de *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise.
- Walski T, De Schutter K, Van Damme EJM, Smagghe G. Diversity and functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2017; 83: 21–34.
- Walters RW, Pilewski JM, Chiorini JA, Zabner J. Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 23709–23713.
- Wandall, H.H., Irazoqui, F., Tarp, M.A., Bennett, E.P., Mandel, U., Takeuchi, H., Kato, K., Irimura, T., Suryanarayanan, G., Hollingsworth, M.A., et al. (2007). The lectin domains of polypeptide GalNAc-transferases exhibit carbohydrate-binding specificity for GalNAc: lectin binding to GalNAc-glycopeptide substrates is required for high density GalNAc-O-glycosylation. *Glycobiology* 17, 374–387.
- Wang, P., and Granados, R.R. (1997). Molecular Cloning and Sequencing of a Novel Invertebrate Intestinal Mucin cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 272, 16663–16669.
- Wang, P., and Granados, R.R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 135–143.

- Wang, S., Huang, X., Huang, Y., Hao, X., Xu, H., Cai, M., Wang, H., and Qin, Q. (2014). Entry of a Novel Marine DNA Virus, Singapore Grouper Iridovirus, into Host Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Macropinocytosis in a pH-Dependent Manner. *Journal of Virology* 88, 13047–13063.
- Wang, Y., Abd-Alla, A.M.M., Bossin, H., Li, Y., and Bergoin, M. (2013a). Analysis of the transcription strategy of the *Junonia coenia* densovirus (JcDNV) genome. *Virus Res.* 174, 101–107.
- Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L., Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., et al. (2013b). Densovirus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of Virology* 87, 12380–12391.
- Webster CG, Pichon E, van Munster M, Monsion B, Deshoux M, Gargani D, et al. Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *J Virol* 2018; 92.
- Wijffels, G., Eisemann, C., Riding, G., Pearson, R., Jones, A., Willadsen, P., and Tellam, R. (2001). A Novel Family of Chitin-binding Proteins from Insect Type 2 Peritrophic Matrix: cDNA sequences, chitin binding activity, and cellular localization. *Journal of Biological Chemistry* 276, 15527–15536.
- Williams, T. (1998). *Invertebrate Iridescent Viruses*. (New York: Lois K. Miller and I. Andrew Ball), p.
- Williams, T. (2008). Iridoviruses of Invertebrates. *Encyclopedia of Virology* 3, 161–167.
- Williams, T., Bergoin, M., and van Oers, M.M. (2017). Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 4–22.
- Xia X, You M, Rao X-J, Yu X-Q. Insect C-type lectins in innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 2018; 83: 70–79.
- Yan X, Olson NH, Van Etten JL, Bergoin M, Rossmann MG, Baker TS. Structure and assembly of large lipid-containing dsDNA viruses. *Nature Structural & Molecular Biology* 2000; 7: 101–103.
- Yang Z, Xia J, Pan H, Gong C, Xie W, Guo Z, et al. Genome-Wide Characterization and Expression Profiling of Sugar Transporter Family in the Whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Front Physiol* 2017; 8: 322.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., and Woodlock, J.J. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 30, 148–152.
- Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I.R., and Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* 1, 291–302.
- Zeddám, J.-L., Cruzado, J.A., Rodríguez, J.L., Ravallec, M., and Subilete, E.C. (2003b). A cyovirus from the South American oil-palm pest *Norape argyrrhorea* and its potential as a microbial control agent. *BioControl* 101–112.
- Zeddám, J.-L., Cruzado, J.A., Rodríguez, J.L., and Ravallec, M. (2003a). A new nucleopolyhedrovirus from the oil-palm leaf-eater *Euprosterna elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae): preliminary characterization and field assessment in Peruvian plantation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 96, 69–75.

- Zelazny, B., Lolong, A., and Pattang, B. (1992). *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae) populations suppressed by a baculovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 61–68.
- Zeng Q, Langereis MA, van Vliet ALW, Huizinga EG, de Groot RJ. Structure of coronavirus hemagglutinin-esterase offers insight into corona and influenza virus evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105: 9065–9069.
- Zhang, X., and Guo, W. (2011). Isolation and identification of insect intestinal mucin HaIIM86--the new target for *Helicoverpa armigera* biocontrol. *International Journal of Biological Sciences* 7, 286–296.
- Zhang X, Mysore K, Flannery E, Michel K, Severson DW, Zhu KY, et al. Chitosan/interfering RNA nanoparticle mediated gene silencing in disease vector mosquito larvae. *J Vis Exp* 2015.
- Zhu, K.Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., and Muthukrishnan, S. (2016). Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology* 61, 177–196.
- Zhu, R., Liu, K., Peng, J., Yang, H., and Hong, H. (2007). Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Management Science* 63, 296–300.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., and Gill, S.S. (2002). *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* Lipid Rafts Are Involved in Cry1A Toxin Binding to the Midgut Epithelium and Subsequent Pore Formation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 13863–13872.
- Zidovetzki, R., and Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1311–1324.
- Zotti MJ, Smagghe G. RNAi Technology for Insect Management and Protection of Beneficial Insects from Diseases: Lessons, Challenges and Risk Assessments. *Neotrop. Entomol.* 2015; 44: 197–213.

Annexe 1

The *Junonia coenia* densovirus lectin-like activity mediates oral infection of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*.

Laetitia Pigeyre^{1,2}, Marc Ravallec², Leila Gasmi³, Nicolas Nègre², Cécile Clouet², Martial Seveno⁴, Khadija El Koulali⁴, Mathilde Decourcelle⁴, Yann Guerardel⁵, Didier Cot⁶, Thierry Dupressoir^{1,2}, Anne-Sophie Gosselin-Grenet^{2*} and Mylène Ogliastro^{2*}

¹EPHE, PSL Research University, DGIMI, INRA, Université de Montpellier, Montpellier, France.

²DGIMI, INRA, Université de Montpellier, Montpellier, France.

³ERI-BIOTECMED, Universitat de València, Valencia, Spain.

⁴BioCampus Montpellier, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France.

⁵ Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F- 59000 Lille, France

⁶IEM, Université de Montpellier, CBRS, ENSCM, Montpellier, France.

*Corresponding authors, co-last authors: Mylene Ogliastro (marie-helene.ogliastro@inra.fr) and Anne-Sophie Gosselin-Grenet (anne-sophie.gosselin-grenet@umontpellier.fr)

Key words: Insect, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*, parvovirus, densovirus, peritrophic matrix, chitin, peritrophins, glycans.

ABSTRACT

The success of oral infection by viruses is their capacity to overcome the gut epithelial barriers of their host and particularly to cross over apical, mucuous extracellular matrices. As orally transmitted viruses, densoviruses are also challenged by the complexity of the insect gut barriers, more specifically the chitinous matrix, termed the peritrophic matrix, that lines and protects the midgut epithelium; how capsids stick to and cross these barriers to reach their final cell destination where replication goes has been poorly studied in insects. Here we analyzed the early interaction of the *Junonia coenia* densovirus (JcDV) with the midgut barriers of caterpillars from the pest *Spodoptera frugiperda*. Using combination of approaches including biochemical, *ex vivo* and *in vivo*, we examined more specifically the early interaction of the capsids with the peritrophic matrix and the consequence of early infection on the overall gut function. We showed that following ingestion, JcDV particles rapidly adhered to different, although specific glycans of the peritrophic matrix and that these interactions mediate oral infection. Proteomic analyses of JcDV binding proteins of the PM revealed mucins and non-mucins peritrophins including enzymes already known to receptors for several insect viruses, both pathogenic for or transmitted by insects. Finally, we showed that JcDV early infection results in an arrest of *N*-acetyl Glucosamine synthesis, the constituent of chitin, together with a dys-regulation of midgut genes expression. These dys-regulations probably participate to weaken the structure of the peritrophic matrix and to the overall dys-functioning of the gut barrier in the early steps of the pathogenesis. Altogether these results observed at early steps of JcDV pathogenesis may help building densovirus-based biocontrol strategies against major insect pests.

INTRODUCTION

Parvoviruses are among the smallest animal viruses, encompassing viruses of various pathogenicity for vertebrate and invertebrate phyla (review). Their predominant routes of infection are horizontal, occurring through fecal-oral contamination and inhalation (Allison et al., 2014; Basak and Turner, 1992; Deng et al., 2017). Thus, most parvoviruses primary cellular targets are mucosa (e.g. the gut or the respiratory tract), where they can limit their replication or spread to subepithelial tissues (Pironi et al., 2009; Mutuel et al., 2010).

Mucosa are typically composed of acellular and cellular barriers, constituting two successive lines of defense that limit pathogen access to subepithelial tissues (Nava, 2004; Lambert *et al.*, 2007; Guttman and Finlay, 2009; Torres-Flores and Arias, 2015). Horizontally transmitted pathogens have evolved the capacity to overcome these barriers, and finely tuned interactions with glycans at the surface of the epithelia are often keys to

overcome the mucosal physical defense barrier to gain access to cellular receptors (Airenne et al., 2013; Attoui et al., 2005; Chiu et al., 2015; Ferrero et al., 2015; Haas-Stapleton et al., 2004; Himeno et al., 1974; Jackson, 2009; Loiseau et al., 2017; Mitsuhashi et al., 2007; Short et al., 2013; Sugiharti et al., 2010; Williams et al., 2017; Zeddarn et al., 2003). (Huang et al., 2014)

Parvovirus and cellular determinants have long focused research, due to their interest in human and animal health or in biotechnology and medicine as genes transfer vectors (ref review). A number of cellular receptors mediating their entry have been characterized, mainly corresponding to proteoglycans and glycosylated proteins. Road maps of the amino acids on the capsids involved in receptor recognition are available for most of the parvoviruses for which glycan receptors are known, i.e. vertebrate parvoviruses of health importance (Huang et al., 2014). However, most of our understanding of the mechanisms involved to cross mucosa originates from studies of parvovirus interaction with cultures of epithelial cells, which may only partially reflect the complexity of interactions occurring *in vivo*. Particularly, a key step in virus specificity is how virions control the balance between the necessity to bind mucosal surfaces, where they can remain trapped, and find their way across to reach their cellular receptor(s) are debated issues and animal models are often missing for these studies (Walters et al., 2002).

Parvoviruses belong to the *Parvoviridae* family that gathers together viruses with a 19-25 nm icosahedral capsid and a 4-6 kb linear single stranded (ss) DNA genome (ref). Their host range discriminates two subfamilies: *Parvovirinae* infecting vertebrates and *Densovirinae* infecting invertebrates, mostly arthropods, which more likely reflects a sampling bias than their biological distribution (Francois et al., 2016). Indeed, the 21 densovirus species characterized so far is probably large underestimate of their diversity, if only considering the extreme diversity of insects, and a wealth of densoviruses remain to be discovered (ICTV release 2018; Cotmore et al., 2018). In addition, densoviruses can be pathogenic for insect vectors and pests, they may constitute resources of interest for biocontrol and thus encouraged efforts to understand the determinants of their specificity.

Like their vertebrate counterparts, densoviruses infecting insects are mainly transmitted horizontally by oral contamination and display tissue tropisms that can be either restricted to the gut or spread to multiple tissues, including or not the gut (Gupta et al., 2015; Ito et al., 2013; Kemmerer and Bonning, 2018; Liu et al., 2011; Mutuel et al., 2010a). But the cellular and viral determinants of gut recognition are fairly known all densoviruses combined, so far limited to one potential receptor, i.e. a mucin-like that mediates infection of

silkworms with the *Bombyx mori* densovirus type 1 (BmDV), and to a four-amino acid motif at the surface of JcDV that specifically mediates host gut recognition (Multeau et al.),

In insects, the alimentary tract is typically composed by a mono-layered epithelium, lined by an acellular layer secreted by the underlying gut cells. Although, there is an extreme degree of specialization considering the diversity of food between insects and between larval and adult stages of the same insects.

The insect gut shares many components with vertebrates, although some are specific, ie i) the original composition of the acellular layer, which is made of chitin fibrils interlocked with highly glycosylated proteins termed peritrophins (Terra 2001a) , and ii) a double embryonic origin with specific features that determine gut-virus interactions. Indeed, the anterior and posterior extremities, the foregut and the hindgut respectively, are ectodermic and thus covered by an impermeable cuticle-containing matrix, similar to the outer exoskeleton of arthropods. In between lies the midgut, which is endodermic and lined for most insects by a semi-permeable matrix, composed by a solid, chitin-based structure associated with peritrophins, i.e. mucin and non-mucin proteins, named the peritrophic matrix (PM) that forms a porous, jelly-like material protecting the epithelium from food abrasion and pathogens. The midgut fulfills absorptive and secretion functions, digested molecules passing through the gut and solid undigested material will be filtered by the PM and eliminated with peristalsis. The barrier function of the PM is related to its ultrastructure, which displays an organized meshwork of fibrils that forms pores ranging in size between 7-36 nm in larvae of Lepidoptera (caterpillars); they can be up to 150 nm in larvae of Coleoptera (Bolognesi *et al.*, 2001; Kawakita et al., 2015; Dias *et al.*, 2018). (Barbehenn, 2001; Lehane, 1997; Terra, 2001b; Terra and Ferreira, 1994). As most insect viruses range in size between 20 and 200 nm, most viral particles should remain trapped in the PM (ref) unless they have developed specific mechanisms to overcome peritrophin interactions and diffuse across, like large entomopathogenic viruses (baculovirus, entomopoxvirus) equipped with an enzymatic arsenal to disrupt this network (Franz et al., 2015; Passarelli, 2011; Stavelone and Lionetti, 2017). Although, it has long been thought that densoviruses could pass through the PM structure passively, measures of the pore size in Lepidopteran species and elucidation of its complex network structure suggest that specific mechanisms are probably also involved by small viruses (Terra and Ferreira, 1999; Hegedus et al., 2009).

To study the early interaction of a densovirus with the insect gut, we took advantage of our findings with the ambidensovirus JcDV pathogenic for caterpillars of *Spodoptera frugiperda* (Mutuel et al., 2010). We

have previously shown that JcDV particles rapidly “stick” to the PM of the caterpillar, but the mechanisms allowing to diffuse across and reach the gut epithelium, remain elusive (Wang et al., 2013).

Herein, we developed cellular, biochemical and molecular approaches to analyze *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* JcDV interaction with the . We found that JcDV affinity for glycans of the PM determines oral infection and supports a “gut-specific” entry mechanism. Our results also showed that JcDV early infection results in i) an arrest of *N*-acetyl-Glucosamine (GlcNac) secretion by epithelial cells with a disorganization of the PM structure and ii) in substantial changes in the expression of gut genes, which probably participates to an early gut dysfunction following infection.

RESULTS AND DISCUSSION

The highly glycosylated peritrophic matrix is a barrier to JcDV infection. Earlier studies using scanning electron microscopy (SEM) have estimated that the pore size in the PM of *S. frugiperda* caterpillars was around 8 nm (Terra and Ferreira, 1994), which makes unlikely a passive passage across for 25-nm JcDV capsids. To ascertain that the pore size was not dependent on variability of *S. frugiperda* depending on strains, we analysed the PM from *S. frugiperda* caterpillars from our rearing facility. Six-instar larvae (L6) were sacrificed to isolate the PM that was subsequently prepared for scanning electron microscopy (SEM). We observed a PM structure displaying an exquisite complexity of the fibrils network with a mesh forming pores, similar to what was described previously (Terra et al.,). were pores were assimilated to the darker regions. To estimate the size of the pores, we then used these PM images and measured the surface of scanned electron-dense regions assimilated to pores with the ImageJ software. We took more than one thousand measures of these surfaces per PM, to give an estimate mesh size around 10 nm (10.37 ± 0.51 nm, mean and standard deviation; $n > 3$ PM), which is in agreement with previous estimate made by Terra and Ferreira (Terra and Ferreira, 1994). Hence, the size of the pores in *S. frugiperda* confirmed that the PM should represent a physical barrier against JcDV infection. To test this barrier function, we used an optical brightener (Calcofluor white) that chemically interferes with the PM of insects and known to improve baculovirus infections (Herth, 1980; Merzendorfer, 2013; Wang and Granados, 2000; Zhu et al., 2016, 2007). We thus tested the capacity of the PM to limit densovirus infections *in vivo* by feeding second instar (L2) caterpillars with a sub-lethal dose of Calcofluor white (0,5%) prior JcDV oral infection. Larval mortality was assessed every day post infection (p.i.) to measure the time required to kill 50% of the cohort (LT50) as a

proxy of JcDV virulence. Our results showed that when treated with Calcofluor, infected larvae displayed a significant shorter time to death compared to control untreated infections (7 versus 9 days p.i. for untreated larvae; $p < 0.05$) (Fig. 1B). Removing the PM thus improved JcDV infection, which confirmed its barrier function even against small viruses. Noteworthy, calcofluor induced an increased larval mortality in non-infected caterpillars at late time p.i. (18% at 10 days p.i.) that can be explained by the deleterious interference with chitin synthesis that affects larval development (Merzendorfer, 2013).

JcDV affinity for glycans determines infection. Spreading through the oral route requires JcDV to adhere to the PM surface, which brings viral particles closer to the epithelium portal access and to resist to gut peristaltism and elimination with feces. However, virions might remain trapped there if strong interactions are involved, which would also consequently block virus access to epithelium and internal tissues. To better understand the nature of the interaction of JcDV with glycans of the PM, we tested the ability of capsids to agglutinate erythrocytes as most lectins do, and as also displayed by vertebrate parvoviruses (Tresnan et al., 1995)(Agbandje-Mc Kenna et al., 1998). We realized a typical hemagglutination plaque assay, adding serial dilutions of the virus inoculum to rabbit erythrocytes. After adding JcDV, we observed a green staining in the wells that turned to result from hemolysis and melanization of the erythrocytes under microscope magnification (Fig. 2) (Jiang et al., 2010; Nakhleh et al., 2017). To test whether some caterpillar derived component remaining in the semi-purified inoculum could induce hemolysis, we compared hemagglutination with a gradient-purified fraction of JcDV (P_JcDV). We observed a clear hemagglutination with a purified inoculum, up to the third virus dilution, giving a titer of 1/8, further indicating a rather weak lectin activity for (vertebrate) glycans at the surface of the erythrocytes. It must be pointed that i) an unknown host component, present in JcDV inoculum preparation, induced a strong hemolysis and; this component was removed during the virus purification process ii) hemagglutination was only observed when erythrocytes were treated with trypsin suggesting that glycans recognized by JcDV on erythrocytes were probably not directly accessible.

Lectins are proteins that form reversible electrostatic interactions with mono- or oligosaccharide structures, the strength of the binding increasing with the number of interactions (Goldstein and Hayes, 1978). We used the property of monosaccharides to compete with lectin binding to test their capacity to inhibit JcDV adherence to the PM (Cummings and Etzler, 2009). We used four monomeric glycans as inhibitors, ie *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), D-Fucose and D-Mannose, that are among the

main glycans found in insects, particularly GlcNac that is the constituent of chitin (Walski et al., 2017). Noteworthy, we did not consider sialic acid in these experiments, as the ability of insects cells to synthesize this glycan is still controversial (Marchal et al., 2001; Tran and Ten Hagen, 2013, Walski et al 2017). As shown in Fig. 2, high concentration of GlcNac and GalNac were required to compete with JcDV hemagglutination of erythrocytes, while low concentration of D-Mannose and D-Fucose were required. These results suggest that JcDV capsids have a higher avidity for GlcNac and GalNac containing glycans than for those containing Mannose and Fucose. However, the fact that low concentration of Mannose and Fucose could compete questions about the actual avidity of viral particles for this glycans. We cannot exclude different accessibilities of these glycans and/or different pH requirement for interactions (tested here at pH 7). Interestingly, variability in the carbohydrate affinity has been observed as well for the Canine and Feline parvoviruses, where structural features of the capsids modulate carbohydrate affinity and mediate differential haemagglutination properties (Agbandje-McKenna et al., 1998).

To analyze further how JcDV capsids stick to the PM, we set up competition assays *ex vivo* and *in vivo*. We took advantage of the solid structure of the PM in caterpillars, which allows easy dissection and manipulation *ex vivo*. Competition assays were realized by incubating isolated PM for 30 min with JcDV and a range of monosaccharide concentrations as done above (from μM to mM). The PMs were then fixed and prepared for immunofluorescence with an anti-JcDV antibody; we quantified the relative levels of fluorescence as a proxy of virus binding and inhibition. As shown on Fig. 3A, an intense fluorescent signal was detected when JcDV was added, illustrating adherence of viral particles to the PM. Interestingly, this binding was competed out with the four glycans, within a similar mM range (0.5 mM to 50 mM), with no significant difference observed between ligands ($P > 0,05$, $n=3$). It has to be noted that no inhibition was observed at 5 μM , which might indicate low lectin-like activity. At 50mM a reverse effect was visible that might be due to non-specific “sticking” effects of monosaccharides overdose similar to glucans. These results showed that monosaccharides with different structures can inhibit the binding of JcDV on isolated PM, which further suggests that specificity for glycans might be low, although multivalent interaction might balance the strength of adhesion.

To test whether competing for glycans were relevant *in vivo*, we realized glycans competition feeding caterpillars with JcDV together with each of the four glycans; we determined the time to death of caterpillars for each treatment (LT50), as done above. Based on *ex vivo* competition results, we used 5mM as a competing concentration and 5 μM as a negative control. As shown by Fig. 4A, when treated with 5 mM of inhibitors,

infected larvae displayed a time to death that was significantly delayed compared to 5 μ M treatment and untreated controls (7 and 6 days, $P < 0.05$). This result showed that all glycans interfered with JcDV oral infection and further supports that capsids primary adhesion to glycans of the PM determines the infection process. When we analyzed midgut semi-thin sections for JcDV localization by immunofluorescence, we observed that viral particles were bound to the PM and to components found in the luminal part corresponding to the food bolus, including food, PM residues or bacteria. Interestingly, all these interactions were competed out with monomeric GlcNac and we were very surprisingly no labelling was longer observed (Fig. 4B). Noteworthy, JcDV incubation with any of the glycans did not affect antibody recognition (data not shown). This result suggests that affinity for glycans likely concentrates viral particles on a substrate, which enhance labelling signal detection otherwise too weak due to the small size of the viral particles.

Altogether these results showed that different glycan can potentially mediate capsids binding to the PM, which subsequently determines infection. . Affinity of JcDV for glycans is probably related to the structure of the capsid. Indeed, the capsids of parvoviruses share a simple structure (T=1 symmetry), with one major protein (VP) making the surface and few minor proteins that participate to the overall icosahedric architecture. These capsids have a typical single jelly roll structural domain, which is the most prevalent architecture among virus capsid proteins. Interestingly, this feature is also shared by cellular proteins displaying an affinity for glycans including lectins and proteins involved in carbohydrate enzymatic activities (Krupovic and Koonin, 2017). Although parvovirus VPs are distantly related to cellular proteins, ancestral features might confer such capsids affinity for glycans.

JcDV binding to glycans is specifically required for oral infection. To test the role of glycans in the early infection process, we analysed their role depending on the route of infection.

We have shown previously that when injected in the caterpillar abdominal cavity, JcDV can propagate systemically and with a higher efficiency compared with the oral route, supporting the barrier to infection function of the gut (Multeau et al., 2012; Mutuel et al., 2010)., Infection of internal epithelial organs (trachea, epidermis...) proceeds from basal surfaces, and depends on a different cell entry mechanism (Multeau et al. 2012; ref?). Our results showed that binding glycans of the PM, although with a relatively low specificity, is required for oral infection. Although they differed in structure and composition, basal laminae key constituents

are glycoproteins (i.e. laminin, collagen) and proteoglycans (i.e. perlecan). To test whether glycan recognition is generally required for infection independently of the route of infection, we analyzed their role in systemic infection. JcDV and glycan competitors were injected within the caterpillar abdominal cavity and we measured the time to death (LT50s). We obtained similar survival rates for both glycans treated and untreated infected caterpillars (Fig. 4C; $p > 0.05$), which indicates that none of the monosaccharide can compete with JcDV systemic infection. Hence, this result supports that affinity of the capsids for carbohydrates display some specificity that is determinant for oral infection. Furthermore, this result confirmed that JcDV systemic and oral routes of infection proceed by different mechanisms (Multeau et al.).

JcDV interacts with peritrophins and proteolytic enzymes of the PM. Peritrophins are the major components of the PM (ref?); they encompass a vast array of chitin-binding proteins, which has been poorly characterized in *S. frugiperda* (ref?). To characterize JcDV interacting proteins in the PM, we set up a biochemical approach. Proteins were extracted from isolated PM and separated with SDS-PAGE as described by (Shi et al., 2004). Gels were stained with Coomassie Blue and Periodic Acid Schiff (PAS) to visualize total and glycosylated proteins respectively, or blotted on a nitrocellulose membrane to test interactions with JcDV by a Viral Overlay Protein Binding Assay (VOPBA) (Edmondson and Dent, 2001). High molecular weight proteins (>250kDa) were observed with both Coomassie blue and PAS staining (Fig. 5A), corresponding at least in part to heavily glycosylated peritrophins (mucins and non-mucins), when compare with the porcine mucins that was strongly stained with PAS and not with Coomassie blue. At lower molecular weights, two sets of proteins were found in lower abundance, at 150-200 kDa and 25-60 kDa with high and no glycosylation respectively. Notably, the overall amount of proteins revealed by PAS was low compared to Coomassie blue pattern, suggesting that most proteins of the PM were non-glycosylated. When blotted and analyzed by VOPBA, ten to 13 bands of various intensities were found to interact with JcDV in the three replicates (Fig. 5A). The highest interaction was observed with a set of 150-200 kDa proteins that was also labelled in the PAS gel run in parallel. At high molecular weight (>250 kDa), highly glycosylated peritrophins displayed a weaker interaction with JcDV. Interactions were also detected with the set of 25-60 kDa proteins, likely not glycosylated as they were not detected with the PAS staining. No biochemical interaction was observed between JcDV and the heterologous porcine mucin (Fig. 5A), and no competition with infection was either obtained *in vivo* as caterpillars fed with JcDV and the porcine mucin displayed similar times to death (Fig. 5B). However, we cannot conclude from these results whether JcDV capsids

does not interact with mucins but only with non-mucin peritrophins, or specifically recognize lepidopteran mucins and/or peritrophins.

To identify PM proteins that interact with JcDV, we next carried out a proteomic approach. Gels were run in parallel and further stained with highly resolutive Coomassie blue or treated for VOPBA. Based on three independent replicates, we considered proteins which interaction with JcDV was reproducibly obtained, which represented 155 interacting-proteins, out of which 138 were annotated in the reference genome of *S. frugiperda* (OGS 2.2; (Gouin et al., 2017a) (Fig. 5C). Noteworthy, each band probably revealed different proteins of similar molecular weight. We mostly identified enzymes, serine proteases and aminopeptidases N (APN), and peritrophins including intestinal mucins (Supplementary Table 1). The fact that JcDV was found to interact with intestinal mucins (i.e. O-glycosylated proteins) in this assay, supports recognition of the capsids by mucins, at least from *S. frugiperda* has no interaction was found with porcine mucin, which might also indicate some relative specificity. More experiments with purified mucins from different species are required to test this hypothesis. Mucin peritrophins are core component of the PM barrier and thus interaction with

Gene ontology (GO) annotation confirmed the enrichment in proteolytic activities (particularly serine-type endopeptidases) and in chitin synthesis, which is consistent with the PM and gut composition (ref). Interestingly in the 150-200 kDa set of proteins that displayed the highest affinity for JcDV, we also identified intestinal mucins, an ATP binding cassette A type 5 (ABCA5) transporter and aminopeptidases N (Supplementary Table 1), which are all known as receptors for different viruses (ref). Whether these proteins can be gut receptors for JcDV remains to be addressed thoroughly.

Early infection-induced chitin synthesis arrest and PM structure alteration. To determine how JcDV particles penetrate and cross the PM, we next analysed. Lectins are major components of plants and can have detrimental impact on the PM of phytophagous insects as exemplified with the chitin specific lectin, Wheat Germ Agglutinin (WGA) (Harper et al., 1998). To test whether JcDV binding can affect the PM integrity, we used fluorescent WGA (FITC-WGA) to label the PM at 24h pi as done by Harper et al. (Harper et al., 1998). Third instar caterpillars were fed or not with JcDV and sacrificed 24 hours later for gut dissection and subsequent preparation for sectioning and fluorescence analysis. When larvae were not infected, the WGA-FITC sharply lined the PM (Fig. 6, upper panel A). A specific labelling was also observed at the apex of columnar cells, which corresponds to microvillar secretion

of GlcNAc to form chitin fibers. Following infection (24 hours pi), the WGA-FITC labelled PMs displayed a multi-layered and discontinuous labelling (Fig. 6, lower panel B), reminiscent of the disorganized meshwork observed for caterpillars fed with the WGA lectin (Harper et al., 1998). Intriguingly, labelling was no longer observed at the tip of the microvilli, suggesting that columnar cells stopped GlcNAc secretion at short time following infection, which probably participates to dismantle the PM structure by arresting chitin synthesis. Given the structural role of the chitin, it is clear that the PM will be considerably weakened, which supports the disorganized pattern we observed with WGA labelling. Although, the mechanism involved in GlcNAc secretion arrest remains to be determined, we speculate that JcDV transcytosis across the gut may induce a mechanical stress on the cytoskeletal network which may trigger an arrest of chitin synthesis, in a way similar to specific drugs that disorganize microtubules (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2013).

JcDV early infection affects gut genes expression. To seek for infection-induced dysfunction of the midgut barrier at early time p.i, we realized a comprehensive transcriptomic analysis of the midgut from infected and non-infected caterpillars using Digital Gene Expression (DGE). This method generates short sequences (Tags) specific for mRNA that provides qualitative and quantitative gene expression data (de Lorgeril et al., 2011; Nielsen et al., 2006; Velculescu et al., 1995). We constructed four libraries from RNA extracted from pools of midguts dissected from mock-infected and infected larvae at 24 and 72 hours p.i. (D1 and D3 respectively), i.e. before and after we detected viral replication in target tissues (Mutuel et al., 2010). Characteristics of the four libraries and Tags occurrence were summarized in the Tables 1 and 2, and we used the reference transcriptome for *S. frugiperda* for Tags assignment (58% of assignment) (Gouin et al., 2017b; Legeai et al., 2014) (Supplementary Table 2). When comparing mock and infected conditions, we found a similar occurrence of unique Tags at D1 and D3 (190 and 196 respectively) when considering a fold change ≥ 5 (Table 2). None of the tags were assigned to virus transcripts, which is consistent with JcDV pathogenesis where viral replication excludes midgut cells (Mutuel et al., 2010). The functional annotation of the Tags that were differentially expressed showed that the GO terms distribution was also similar at both times of infection (Fig 7 and Supplementary Table 2), which indicate that the global tissue response to infection did not differ with time p.i., and might be thus independent of the replication in other tissues (Marques and Imler, 2016). However, significant differences in GO terms were noticed, like the up regulation of genes involved in “Structural molecule activity” at day-1 p.i. that was likely reversed at day-3 (14% versus 0% respectively), and corresponding to ribosomal and actin-related genes (Fig. 7 panels A, B, C and Supplementary Table 2). The “catalytic activity”

function displayed a (high) ratio of up and down regulated genes that were observed from day-1, suggesting that JcDV early infection triggered a gut dys-function that increased with time p.i. (Fig 7). We did not find major changes in the expression of genes involved in carbohydrate metabolism and/or coding for mucin-like proteins, with the exception of a trehalose transporter and an intestinal mucin both down-regulated from day 1 p.i. (Supplementary Tables 2). Noticeably, none of the PM proteins interacting with JcDV (enzymes and peritrophins) displayed a transcriptional change in midgut cells and no change was observed either in the expression of chitin synthase genes that could support chitin synthesis arrest. Different (indirect) mechanisms have been shown to stop chitin synthesis, including a mechanical stress on microtubule network (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2013). We can hypothesize that JcDV modification induced by JcDV transcytosis across the gut may induce a mechanical stress on the cytoskeletal network, similar to specific drugs that disorganize microtubules (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2013).

Last, infection did not induce genes involved in gut “inflammation” suggesting that the virus transport across the gut has no effect on the canonical gut immune response.

Interestingly, the dys-regulation of several midgut functions were not associated with obvious pathological effects at one day-p.i., and larvae keep growing until late time p.i. (Mutuel et al., 2010). These parallel observations suggest that early dys-functions of the gut are probably compensated to sustain the high metabolic demand required for virus replication. We hypothesize that the GlcNac synthesis arrest, which is supported by the developmental arrest that occurred at early time p.i. (Mutuel et al., 2010), might also result from “re-routing” gut syntheses towards essential adsorption and enzymatic activities to support metabolism. Deciphering the early gut response to JcDV infection would help to understand midgut function in caterpillars and might help to design densovirus-based strategies to control insect pests.

Altogether these results illustrate in a caterpillar host model that the oral route represents a major challenge for insect viruses, and the complexity of the mechanisms involved to invade or leave their host for transmission, whether they are pathogenic or transmitted by insects. This work highlights how small and naked insect parvoviruses cope with the midgut barrier of their hosts and particularly how they find their way across the peritrophic matrix, a process poorly understood due to the complexity to study these interactions *in vivo*.

Densoviruses can be highly pathogenic for insect pests and vectors, which have long stimulated their interest as biocontrol agents or genes vectors (Kolliopoulou et al., 2017). They are considered today with a renewed interest as solutions to control harmful insects are lacking, which encourages efforts to understand

their pathogenesis and their specificity (Carlson et al., 2006; Fédière, 2000; van Munster et al., 2003; Ren and Rasgon, 2010; Rivers and Longworth, 1972). Altogether the results presented here highlight the finely tuned mechanisms that determine virus specificity.

METHODS

Insect rearing and virus preparation. Caterpillars of *Spodoptera sp* were reared under controlled conditions (25 ± 1°C, 65 to 70% relative humidity [RH], 16-h light, 8-h dark photoperiod) on a wheat germ-based artificial diet. JcDV was amplified by orally infecting *S. littoralis* or *S. frugiperda* caterpillars. At death, larvae were crushed and virus extraction was processed by clarification and filtration on 0.22 µm to constitute a semi-purified virus stock (JcDV). To obtain a purified viral stock (P_JcDV), the semi-purified virus stock was loaded on OptiPrep™ (Sigma) density gradient and dialyzed against Phosphate-buffered saline (PBS) 1X as previously described in (Mutuel et al., 2010). Viral concentrations were estimated by quantitative PCR (qPCR) as described in (Wang et al., 2013b)

Calcofluor, carbohydrates and lectins. Calcofluor white M2R (Calcofluor; F3543), *N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc; A4106), *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc; A2795), D-(+)-Fucose (Fucose; F8150), D-(+)-Mannose (Mannose; M6020), Mucin from porcine stomach (Porcine mucin; M2378). WGA-FITC conjugate (L4895) were all purchased from Sigma-Aldrich (France)

Bioassays in *S. frugiperda* caterpillars. Calcofluor, glycans and lectins were all purchased from Sigma-Aldrich (France), including Calcofluor white M2R (Calcofluor; F3543), *N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc; A4106), *N*-Acetyl-D-galactosamine (GalNAc; A2795), D-(+)-Fucose (Fucose; F8150), D-(+)-Mannose (Mannose; M6020), Mucin from porcine stomach (Porcine mucin; M2378). WGA-FITC conjugate (L4895).

For in vivo bioassays, third-instar (L3) *S. frugiperda* caterpillars were individually infected by feeding with JcDV (10⁹ viral equivalent genomes [veg]/caterpillar) or by injection (10⁸ veg/caterpillar). Each treatment was applied to a cohort of 24 caterpillars and three independent experiments were performed. Calcofluor (0,5%) was concomitantly administrated with the virus. For competition assays, JcDV was incubated with glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose at 5 µM and/or 5 mM; Porcine mucin at 7 mM) for one hour before feeding or injection. In all experiments, control larvae were fed or injected with PBS. Caterpillars mortality was recorded once a day during 10 days and results were presented as survival rates per day. The time to death was assessed

by comparing the survival curves using the Kaplan Meier method (GraphPad Prism software, version 7). The significance between groups were analysed using log-rank (Mantel-cox) tests and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests.

Hemagglutination assay. Rabbit erythrocytes cells were diluted at 3% (v/v) with 150 mM NaCl and treated with 0.5 mg/mL of trypsin (Sigma) for 30 min at 37°C. After 3 washes with 150 mM NaCl, 25 µl serially two-fold dilutions of viral inocula (JcDV or P_JcDV; 10^{11} veg/µl) were mixed with 25 µl of erythrocytes in 96 well microtiter plates for 30 min at 37°C. Positive controls of hemagglutination were performed using 25 µl of WGA (1 mg/ml). For the competition assays, 25 µl serially two-fold dilutions of 25 mM of glycans (GINAc, GalNAc, , Fucose and Mannose) were incubated with 25 µl of P_JcDV for 30 min at RT in 96 well microtiter plates. Fifty µl of erythrocytes were subsequently added to each well for 30 min at 37°C. Hemagglutination were read under a light microscope.

PM isolation and *ex vivo* infection. Sixth-instar (L6) *S. frugiperda* caterpillars were anesthetized on ice and then sacrificed. The PMs were isolated, washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) to remove the food bolus and incubated for 30 min at room temperature (RT) with JcDV (10^9 veg/PM), or with JcDV pre-incubated for 1 h with glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose; 5 µM to 50 mM) before infection. The PMs were then washed with PBS and fixed 1 h with 4% paraformaldehyde (PFA).

PM observation with Scanning Electron Microscopy. Fixed PMs were dehydrated with increasing concentrations of ethanol (50% to 100%) and in 1:1 (100% ethanol and hexamethyldisilazane [HMDS]) for 10 min and finally in 100% HMDS for 20 min. After complete an overnight evaporation, samples were ultimately coated with Platinum and observed with a Scanning Electron Microscope HITACHI S-4800, with an acceleration voltage of 2 kV and a working distance of 5 mm. Pores diameter was measured on SEM images (8 bits) randomly taken on the PM (minimum 3 PMs, representing a total of 1000 measured pores), by counting the pixels whose intensity was under the threshold cut-point of 130 (Fiji software).

Oral infection and semi-thin sections. L3 *S. frugiperda* caterpillars were individually feed as above. Two hours or twenty-four hours later, caterpillars were anesthetized on ice and sacrificed, then fixed in 4% PFA for 30 min at 4°C. After washes in PBS, larvae were dehydrated by incubations in increasing concentrations of ethanol (50% to

100%) before their progressive embedding in 100% Unicryl resin (BB International) as described in (Wang et al., 2013b). Semithin sections (1 µm) were further processed for immunolabeling.

Immunolabelling and microscopy analysis. Immunolabelling of JcDV capsids on isolated PMs and semi-thin sections were performed using a rabbit primary JcDV anti-capsid antibody (1:1,000; Eurogentec) incubated with samples for 2h at RT and an anti-rabbit secondary antibody (Alexa Fluor® 568; 1:500; Invitrogen) incubated for 45 min at RT. Semi-thin sections were incubated 45 min with WGA-FITC (1:300) to label GlcNAc and the PM or with Phalloidin-FITC (1:300; Sigma) to label actin cytoskeleton, and 10 min with Dapi (1 µg/ml; Invitrogen) to label nuclei. Labeled PMs and semi-thin sections were then mounted in Dako (Sigma) on coverslips for observation. For epifluorescence measurements, we worked on a Zeiss AxioImager Z2, equipped with suitable filters for the dyes, using a 40X/1.3 Plan-Apochromat Oil PH3 and a 63X/1.4 Plan-Apochromat Oil PH3 objectives. For structured illumination images, the Zeiss ApoTome-slider was introduced into the field-stop plane of the microscope to improve resolution of images. We used the ZEN software to operate the microscope and all images were taken with a CMOS Orca Flash 4.0 B&W camera. Images were processed with Fiji software. The intensity of fluorescence (arbitrary unit) were measured on epifluorescence images. Statistical analyses were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism software, version 7). Each experiment was repeated at least three times, and each independent experiment gave similar results.

SDS-PAGE, PAS staining and Far Western-Blot. Peritrophins were extracted from pools of five PMs from *S. frugiperda* in 200 µl of Laemmli buffer 2X (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue and 0.125 M Tris HCl, pH 7), then boiled and heated at 95°C for 5 min (Shi, 2004 #282). After centrifugation at 8,000 g for 10 min 4°C, the supernatant was collected and 1/15 was loaded on 4-15 % polyacrylamide Tris-HCl gel (Biorad, Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, Hercules USA) and separated by SDS-PAGE. In parallel, 30 µg of porcine mucins were also loaded on the same gel. Gel was stained with Page blue (Thermo Fisher Scientific) to analyse total proteins or with Periodic Acid-Schiff as described in (Zacharius et al., 1969) to analyse glycosylated proteins. Proteins were also transferred on nitrocellulose membranes (Biorad) for 3 h at 70 V for VOPBA. Briefly, the membrane was saturated with 3% BSA in PBS/Tween 0,1 % (PBST) for 2 h at RT, then incubated OVN at 4°C with JcDV (10⁹ veg diluted in PBST containing 1% BSA). After washes in PBST, the membrane was incubated with the primary anti-capsid antibody (1:1,000; see above), then incubated with an anti-rabbit secondary antibody HRP-conjugated (1:3,000; Biorad), both for 1h at RT. Proteins were revealed by enhanced chemiluminescence (Millipore) using the Odyssey Fc imager (LI-COR Biosciences).

Identification of PM proteins by LC–MS/MS. Protein bands revealed by far western blot were cut in SDS-PAGE gel stained with Page blue (3 replicates, 10 to 13 bands depending on the replicate) and destained with three washes in 50% acetonitrile and 50 mM TEABC. After protein reduction (with 10 mM dithiothreitol in 50mM TEABC at 60 °C for 30 min in the dark) and alkylation (55 mM iodoacetamide TEABC at room temperature for 30 min) proteins were digested in-gel using trypsin (0.5 µg/band, Gold, Promega, Madison USA) as previously described (Thouvenot *et al.*, 2008). Digest products were dehydrated in a vacuum centrifuge and resuspended with 0.05% TFA and 2% ACN. The generated peptides were analysed online by nano-flowHPLC–nanoelectrospray ionization using a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) coupled to an Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were performed on-line on a Pepmap® pre-column (0.3 mm × 10 mm, Dionex). A gradient consisting of 0-25% B for 30 min, 25-40% in 5 min and 90% B for 8 min (A = 0.1% formic acid; B = 0.1 % formic acid in 80% acetonitrile) at 300 nL/min was used to elute peptides from the capillary reverse-phase column (0.075 mm × 150 mm, Acclaim Pepmap 100® C18, Thermo Fisher Scientific) fitted with an uncoated silica PicoTip Emitter (NewObjective, Woburn, USA). Spectra were acquired with the instrument operating in the information-dependent acquisition mode throughout the HPLC gradient. Survey scans were acquired in the Orbitrap system with resolution set at a value of 70,000. Up to twelve of the most intense ions per cycle were fragmented and analyzed using a resolution of 17,500. Peptide fragmentation was performed using nitrogen gas on the most abundant and at least doubly charged ions detected in the initial MS scan and an active exclusion time of 45 sec. For all full scan measurements with the Orbitrap detector a lock-mass ion from ambient air (m/z 445.120024) was used as an internal calibrant as described (Olsen *et al.*, 2005).

Analysis was performed using the MaxQuant software (version 1.5.5.1) (Cox *et al.*, Nat Biotechnol 2008; 26:1367–72). All MS/MS spectra were searched using Andromeda against a decoy database consisting of a combination of *S. frugiperda* databases (Gouin *et al.*, 2017a) and 236 classical contaminants, containing forward and reverse entities. The following settings were applied: spectra were searched with a mass tolerance of 7 ppm (MS) and 0.5 Th (MS/MS). Enzyme specificity was set to trypsin. Up to two missed cleavages were allowed and only peptides with at least seven amino acids in length were considered. Carbamidomethylation was set as fixed cysteine modification and oxidation was set as variable methionine modification for searches. FDR was set at 0.01 for peptides and proteins. Sequences which found homology were annotated according to the gene ontology (GO) terms and classified using Blast2Go software (<https://www.blast2go.com/>; (Conesa *et al.*, 2005)). The

enrichment in GO terms compared to the *S. frugiperda* reference (predicted proteins from the OGS2.2 genome; Gouin et al., 2017) was analyzed with the same software (FDR set at 0.01).

RNA extraction from midgut. Fourth instar *S. frugiperda* caterpillars were orally infected or not with JcDV (10^{12} veg per caterpillar; 20 caterpillars per condition). At 24 h p.i. or 72 h p.i., caterpillars were anesthetized on ice and dissected. The midguts were washed in PBS to eliminate the food bolus and the PMs. Trachea, Malpighi tubes and visceral muscles were removed and the epithelia were incubated with 2.5% trypsin for 30 min to dissociate the tissues. After washes, gut cells were lysed in 800 μ l of TRIzol[®] reagent (Invitrogen) for total RNA extraction according to the manufacturer's instructions. Total RNA amount and purity were checked by using spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) and the integrity of total RNA was analyzed by capillary electrophoresis (2100 Bioanalyzer Instrument, Agilent).

DGE library construction and sequencing. Four DGE libraries were constructed from midgut total RNA extracted from *S. frugiperda* caterpillars infected (or not) for 1 and 3 days. Sequence tag preparation was done with Illumina's Digital Gene Expression Tag Profiling Kit according to the manufacturer's protocol (version 2.1B) as described in (de Lorgeril et al., 2011). For fourth libraries, 10 μ g of total RNA were incubated with oligo-dT beads. First- and second-strand cDNA syntheses were performed using superscript II reverse transcription kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The cDNAs were cleaved using the NlaIII anchoring enzyme. Subsequently, digested cDNAs were ligated with the GEX adapter 1 containing a restriction site of MmeI. The second digestion with MmeI was performed, which cuts 17 bp downstream of the CATG site. At this point, the fragments detach from the beads. The GEX adapter 2 was ligated to the 3' end of the tag. A PCR amplification with 15 cycles using Phusion polymerase (Finnzymes) was performed with primers complementary to the adapter sequences to enrich the samples for the desired fragments. The resulting fragments of 85 bp were purified by excision from a 6% polyacrylamide TBE gel. The DNA was eluted from the gel using Spin-X Cellulose Acetate Filter (0.45 μ m), precipitated, resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) and quantified using Nanodrop 1000 spectrophotometer. Cluster generation was performed after applying 4 pM of each sample to the individual lanes of the Illumina 1G flowcell. After hybridization of the sequencing primer to the single-stranded products, 18 cycles of base incorporation were carried out on the 1G analyzer according to the manufacturer's instructions. Image analysis and base calling were performed using the Illumina Pipeline, where sequence tags were obtained after purity filtering.

Functional annotation of Tags. The sequence files of each DGE library were analyzed with BIOTAG software (Skuld-Tech, Grabels, France). The statistical value of DGE data comparisons, as a function of tag counts, was calculated by assuming that each tag has an equal chance of being detected. Differential expression of the Tag counts of the infected versus mock conditions was performed to obtain a list of up- and down-regulated tags for each condition. Tags for which differential expression was ≥ 5 fold change were assigned using the reference transcriptome for *S. frugiperda* (Gouin et al., 2017b; Legeai et al., 2014)). Sequences which found homology were annotated according to the GO terms and classified using Blast2Go software (<https://www.blast2go.com/>; (Conesa et al., 2005)) and represented at level 2 of Biological process and Molecular function. The enrichment in GO terms compared to the *S. frugiperda* reference (predicted transcripts from the OGS2.2 genome) was analyzed with the same software (FDR set at 0.01).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to C. Gibard and G. Clabot for their great help with insect rearing and the PIQ quarantine platform from Vectopole Sud. We especially acknowledge Elodie Jublanc and Chantal Cazevieuille for their skillful technical assistance and the imaging facility MRI, member of the national France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future»). We warmly thank Philippe Clair from the qPHD Platform (Montpellier GenomiX). Manuella Younes, master student, and David Piquemal are also acknowledged for their support in the SAGE part of this work. Special thanks to Pierre-André Lafon for his help for the statistical analysis. L. Pigeyre was a doctoral fellow of the french Ministry for Higher Education and Research / EPHE.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Calcofluor increases *S. frugiperda* caterpillars susceptibility to densovirus oral infection. (A) SEM image of PM ultrastructure. Endoperitrophic face is shown (bar, 500 nm). (B) *S. frugiperda* caterpillars (n=24) were individually infected by feeding with JcDV concomitantly with 0.5% of Calcofluor or PBS as a control. Caterpillar mortality was recorded once a day during 10 days and results were presented as survival rates per day. Three independent experiments were performed, each independent experiment gave similar results, one is

represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values of less than 0.05 were considered significant (**, *P* < 0.01). PBS refers to control (PBS-treated and non-infected) caterpillars; Calcofluor refers to Calcofluor-treated and non-infected caterpillars; JcDV refers to JcDV-infected caterpillars and JcDV+Calcofluor to Calcofluor-treated and JcDV-infected caterpillars.

Figure 2. Hemagglutination assays with JcDV. Rabbit erythrocytes cells were incubated with serially two-fold dilutions of JcDV or P_JcDV for 30 min at 37°C. Positive control (hemagglutination) was performed using 25 µl of WGA (1 mg/ml) instead of virus dilution. For the competition assays, serially two-fold dilutions of 25 mM of monosaccharides (GlcNAc, GalNAc, Fucose and Mannose) were incubated with P_JcDV before incubation with hemagglutination assays. Semi-purified virus (JcDV) induced a green coloration in the wells, signs of hemolysis and melanization of erythrocytes. The purified virus (P_JcDV) showed a clear haemagglutination for the 3 first dilutions. Inhibition of haemagglutination was obtained with 25 mM of GlcNAc and GalNAc.

Figure 3. Ex vivo interaction of JcDV with the PM involves carbohydrates. Apotome images of PMs *ex vivo* incubated with JcDV alone or with JcDV treated for 1 h with 5 µM to 50 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose) before infection. JcDV labeling is in red. PBS 50 mM refers to control PMs incubated only with 50 mM of glycans. Bars, 50 µm. Each experiment was repeated at least three times, and each independent experiment gave similar results, one is shown here.

Figure 4. The lectin-like activity of JcDV for the PM favors oral infection of *S. frugiperda* caterpillars. (A) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by feeding with JcDV alone or with JcDV incubated for 1 h with 5 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose) before infection. Control caterpillars were fed with PBS. Three independent experiments were performed, each independent experiment gave similar results, one is represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values of less than 0.05 were considered significant (ns, non-significant; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; *** *P* < 0.001). PBS refers to control (PBS-treated and non-infected) caterpillars and JcDV to JcDV-infected caterpillars; JcDV+GlcNAc, JcDV+GalNAc, JcDV+Fucose and JcDV+Mannose refer to caterpillars infected

with JcDV incubated with GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose, respectively, before feeding. (B) Immunolabeling of midgut semithin transversal sections 2 h after ingestion of JcDV alone or JcDV incubated for 1 h with 5 mM of GlcNAc before infection. Control caterpillars (non-infected [NI]) were fed with PBS. The PM is shown by an arrow. Phalloidin-FITC is green, JcDV is red, and nuclei are labeled with Dapi (blue). Bars, 30 μ m. Lum, midgut lumen; HemoL, hemolymphatic compartment. (C) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by injection with JcDV alone or with JcDV incubated for 1 h with 5 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose) before infection. Control caterpillars were injected with PBS. Three independent experiments were performed, each independent experiment gave similar results, one is represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values are less than 0.05 and were considered non-significant (ns). PBS, JcDV, JcDV+GlcNAc, JcDV+GalNAc, JcDV+Fucose and JcDV+Mannose refer as in (A).

Figure 5. JcDV has specific affinity for glycosylated proteins of the PM. (A) VOPBA analysis of PM proteins interacting with JcDV. Proteins were extracted from PMs and separated by SDS-PAGE as described in Methods. Thirty μ g of porcine mucins were also loaded in the gel as a control of highly O-glycosylated proteins. Proteins were then stained with Coomassie Blue or Periodic Acid Schiff (PAS, pink) to visualize total or glycosylated proteins, respectively, and transferred to nitrocellulose membranes for probing with JcDV and anti-JcDV capsid antibody. Proteins interacting with JcDV capsids were finally revealed by enhanced chemiluminescence (black arrowheads). Blue and pink arrowheads show the corresponding position of these proteins in gel stained with Page blue or PAS, respectively. (B) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by feeding with JcDV alone or with JcDV incubated for 1 h with 7 mM of porcine mucin before infection. Control caterpillars (non-infected) were fed with PBS. Three independent experiments were performed, each independent experiment gave similar results, one is represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values of less than 0.05 were considered significant (ns, non-significant). Porcine mucins refer to porcine mucin-fed and non-infected caterpillars; JcDV refers to JcDV-infected caterpillars and JcDV+Porcine mucin to caterpillars infected with JcDV that was incubated with porcine mucin before feeding. (C) Venn diagram of three replicates of proteomic analysis (PM1, PM2, PM3) of PM proteins interacting with JcDV. Protein bands revealed by far western blot were cut in SDS-PAGE gel stained with Page blue and analyzed by LC-MS/MS as described in Methods. Among the 155 proteins common to the three replicates, 138 were annotated in the reference genome of *S. frugiperda* (Gouin et al., 2017). (D) GO terms enrichment for the 138

common annotated PM proteins interacting with JcDV, compared to the reference (predicted proteins from OGS2.2 *S. frugiperda* genome; Gouin et al., 2017) (FDR set at 0.01). The 138 common PM proteins were assigned to the gene ontology (GO) terms using Blast2Go software.

Figure 6. JcDV oral infection induces PM disorganization. Caterpillars were orally (B) infected with JcDV or (A) fed with PBS as a control (PBS, non-infected larvae). At 24 h pi, semi-thin transversal sections (1 μ m) were prepared and processed for immunolabeling as described in Methods. WGA-FITC was used to visualize chitin synthesis and PM structure (in green). Nuclei are in blue (Dapi). Arrows show GlcNAc secretion by microvilli and arrowhead the PM. Bars, 20 μ m.

Figure 7. JcDV oral infection induces midgut gene expression modulation. (A and B) Pie charts representation of GO assignment of 196 and 60 unique transcripts over- and under-represented (≥ 5 fold change) between infected and non-infected midgut DGE libraries, respectively, at day 1 (up panel) and day 3 (lower) p.i. Categorization were based on GO terms assignment from 2nd level of Biological Process (A) and Molecular Function (B) using Blast2GO software. (C) GO terms enrichment for the up-regulated genes at 24 h p.i., compared to the reference, compared to the reference (OGS2.2 *S. frugiperda* genome; Gouin et al., 2017) (FDR set at 0.01).

Supplementary Figure. Relative quantification of JcDV binding on isolated PM and competition assays with monomeric glycans. Intensity of red fluorescence (arbitrary unit [U.A.]) of PMs measured on epifluorescence images. Values are the result of the quantification of at least 10 images from 3 independent experiments. Statistical analyses were determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test. P values of less than 0.05 were considered significant (ns, non-significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; *** P < 0.001). Mock refers to PM infected with a clarified and filtered homogenate of non-infected caterpillars.

Bibliography

Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., and Rossmann, M.G. (1998). Functional

implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* 6, 1369–1381.

Airenne, K., Hu, Y.-C., Kost, T., Smith, R., Kotin, R., Ono, C., Matsuura, Y., Wang, S., and Ylä-Herttuala, S. (2013). Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene Transfer Applications. *Molecular Therapy* 21, 739–749.

Allison, A.B., Kohler, D.J., Ortega, A., Hoover, E.A., Grove, D.M., Holmes, E.C., and Parrish, C.R. (2014). Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLOS Pathogens* 10, e1004475.

Attoui, H., Mohd Jaafar, F., Belhouchet, M., Biagini, P., Cantaloube, J.-F., de Micco, P., and de Lamballerie, X. (2005). Expansion of family Reoviridae to include nine-segmented dsRNA viruses: isolation and characterization of a new virus designated *Aedes pseudoscutellaris* reovirus assigned to a proposed genus (*Dinovernavirus*). *Virology* 343, 212–223.

Barbehenn, R.V. (2001). Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 86–99.

Basak, S., and Turner, H. (1992). Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* 186, 368–376.

Bolognesi, R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., and Ferreira, C. (2001). The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 62–75.

Bossin, H., Fournier, P., Royer, C., Barry, P., Cérutti, P., Gimenez, S., Couble, P., and Bergoin, M. (2003). *Junonia coenia* Densovirus-Based Vectors for Stable Transgene Expression in Sf9 Cells: Influence of the Densovirus Sequences on Genomic Integration. *J Virol* 77, 11060–11071.

Carlson, J., Suchman, E., and Buchatsky, L. (2006). Densoviruses for control and genetic manipulation of mosquitoes. *Advances in Virus Research* 68, 361–392.

Caspar, D.L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.

Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R.D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Olieric, V., Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., et al. (2015). Structural basis for the enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3973–3978.

Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676.

Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., et al. (2014). The family Parvoviridae. *Archives of Virology* 159, 1239–1247.

Cummings, R.D., and Etzler, M.E. (2009). Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press), p.

Deng, X., Zou, W., Xiong, M., Wang, Z., Engelhardt, J.F., Ye, S.Q., Yan, Z., and Qiu, J. (2017). Human Parvovirus Infection of Human Airway Epithelia Induces Pyroptotic Cell Death by Inhibiting Apoptosis. *J Virol* 91.

Dias, R.O., Cardoso, C., Pimentel, A.C., Damasceno, T.F., Ferreira, C., and Terra, W.R. (2018). The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin domains in the insect midgut: Insect mucus-forming mucins. *Insect Molecular Biology* 27, 46–60.

- Edmondson, D.G., and Dent, S.Y. (2001). Identification of protein interactions by far western analysis. *Current Protocols in Protein Science Chapter 19*, Unit 19 7.
- Fédière, G. (2000). Epidemiology and Pathology of Densoviriinae. In *Contributions to Microbiology*, pp. 1–11.
- Ferrero, D.S., Buxaderas, M., Rodríguez, J.F., and Verdaguer, N. (2015). The Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase of a Permutotetravirus Suggests a Link between Primer-Dependent and Primer-Independent Polymerases. *PLOS Pathogens* *11*, e1005265.
- François, S., Filloux, D., Roumagnac, P., Bigot, D., Gayral, P., Martin, D.P., Froissart, R., and Ogliastro, M. (2016). Discovery of parvovirus-related sequences in an unexpected broad range of animals. *Scientific Reports* *6*, 30880.
- Franz, A.W., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., and Clem, R.J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* *7*, 3741–3767.
- Goldstein, I.J., and Hayes, C.E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* *35*, 127–340.
- Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., Hilliou, F., Durand, N., Montagné, N., Darboux, I., et al. (2017a). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports* *7*.
- Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., Hilliou, F., Durand, N., Montagné, N., Darboux, I., et al. (2017b). Two genomes of highly polyphagous lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges. *Scientific Reports* *7*.
- Gupta, T., Kadono-Okuda, K., Ito, K., Trivedy, K., and Ponnuvel, K.. (2015). Densovirus infection in silkworm *Bombyx mori* and genes associated with disease resistance. *Invertebrate Survival Journal* *118–128*.
- Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1788*, 832–841.
- Haas-Stapleton, E.J., Washburn, J.O., and Volkman, L.E. (2004). P74 Mediates Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *Journal of Virology* *78*, 6786–6791.
- Harper, M.S., Hopkins, T.L., and Czaplá, T.H. (1998). Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae. *Tissue Cell* *30*, 166–176.
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., and Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* *54*, 285–302.
- Herth, W. (1980). Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poterioochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *The Journal of Cell Biology* *87*, 442–450.
- Himeno, M., Onodera, K., and Tanami, Y. (1974). Properties of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology* *23*, 164–171.
- Huang, L.Y., Halder, S., and Agbandje-McKenna, M. (2014). Parvovirus glycan interactions. *Current Opinion in Virology* *7*, 108–118.
- Ito, K., Kidokoro, K., Shimura, S., Katsuma, S., and Kadono-Okuda, K. (2013). Detailed investigation of the sequential pathological changes in silkworm larvae infected with *Bombyx densovirus* type 1. *Journal of Invertebrate Pathology* *112*, 213–218.

- Ito, K., Kidokoro, K., Katsuma, S., Sezutsu, H., Uchino, K., Kobayashi, I., Tamura, T., Yamamoto, K., Mita, K., Shimada, T., et al. (2018). A single amino acid substitution in the Bombyx -specific mucin-like membrane protein causes resistance to Bombyx mori densovirus. *Scientific Reports* *8*, 7430.
- Jackson, T.A. (2009). The Use of Oryctes Virus for Control of Rhinoceros Beetle in the Pacific Islands. In *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods*, A.E. Hajek, T.R. Glare, and M. O’Callaghan, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 133–140.
- Kemmerer, M., and Bonning, B. (2018). Transcytosis of Junonia coenia densovirus VP4 across the gut epithelium of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Science*.
- Kolliopoulou, A., Taning, C.N.T., Smagghe, G., and Swevers, L. (2017). Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Front Physiol* *8*.
- Krupovic, M., and Koonin, E.V. (2017). Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *114*, E2401–E2410.
- Lambert, D., O’Neill, C., and Padfield, P. (2007). Methyl- β -Cyclodextrin Increases Permeability of Caco-2 Cell Monolayers by Displacing Specific Claudins from Cholesterol Rich Domains Associated with Tight Junctions. *Cellular Physiology and Biochemistry* *20*, 495–506.
- Legeai, F., Gimenez, S., Duvic, B., Escoubas, J.M., Gosselin Grenet, A.S., Blanc, F., Cousserans, F., Seninet, I., Bretaudeau, A., Mutuel, D., et al. (2014). Establishment and analysis of a reference transcriptome for Spodoptera frugiperda. *BMC Genomics* *15*, 704.
- Lehane, M.J. (1997). PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Entomology* *42*, 525–550.
- Li, Y., Jousset, F.X., Giraud, C., Rolling, F., Quiot, J.M., and Bergoin, M. (1996). A titration procedure of the Junonia coenia densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines. *Journal of Virological Methods* *57*, 47–60.
- Liu, K., Li, Y., Jousset, F.-X., Zadori, Z., Szelei, J., Yu, Q., Pham, H.T., Lépine, F., Bergoin, M., and Tijssen, P. (2011). The Acheta domesticus Densovirus, Isolated from the European House Cricket, Has Evolved an Expression Strategy Unique among Parvoviruses ν . *J Virol* *85*, 10069–10078.
- Loiseau, V., Giraud, I., Federici, B., Bigot, Y., Cordaux, R., and Gilbert, C. (2017). Iridovirus IIV31 : un pathogène d’isopodes terrestres remarquable. *Virologie* *21*, 147–149.
- de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachere, E. (2011). Whole transcriptome profiling of successful immune response to Vibrio infections in the oyster Crassostrea gigas by digital gene expression analysis. *PloS One* *6*, e23142.
- Marques, J.T., and Imler, J.-L. (2016). The diversity of insect antiviral immunity: insights from viruses. *Curr Opin Microbiol* *32*, 71–76.
- Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Science* *20*, 121–138.
- Merzendorfer, H., and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology* *206*, 4393–4412.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., and Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *Journal of Virology* *81*, 4235–4243.
- Multeau, C., Froissart, R., Perrin, A., Castelli, I., Casartelli, M., and Ogliastro, M. (2012). Four amino acids of an insect densovirus capsid determine midgut tropism and virulence. *Journal of Virology* *86*, 5937–5941.

- van Munster, M., Dullemans, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault, V., Clerivet, A., and van der Wilk, F. (2003). Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology* *84*, 6–14.
- Mutuel, D., Ravallec, M., Chabi, B., Multeau, C., Salmon, J.M., Fournier, P., and Ogliastro, M. (2010a). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of infection that leads to hypoxia. *Virology* *403*, 137–144.
- Mutuel, D., Ravallec, M., Chabi, B., Multeau, C., Salmon, J.M., Fournier, P., and Ogliastro, M. (2010b). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of infection that leads to hypoxia. *Virology* *403*, 137–144.
- Nava, P. (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Science* *117*, 5509–5519.
- Nielsen, K.L., Hogh, A.L., and Emmersen, J. (2006). DeepSAGE--digital transcriptomics with high sensitivity, simple experimental protocol and multiplexing of samples. *Nucleic Acids Research* *34*, e133.
- Ohkawa, T., Volkman, L.E., and Welch, M.D. (2010). Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *The Journal of Cell Biology* *190*, 187–195.
- Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., and Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell Proteomics* *4*, 2010–2021.
- Passarelli, A.L. (2011). Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology* *411*, 383–392.
- Pironi, L., Bonvicini, F., Gionchetti, P., D'Errico, A., Rizzello, F., Corsini, C., Foroni, L., and Gallinella, G. (2009). Parvovirus B19 Infection Localized in the Intestinal Mucosa and Associated with Severe Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* *47*, 1591–1595.
- Ren, X., and Rasgon, J.L. (2010). Potential for the *Anopheles gambiae* densovirus to act as an “evolution-proof” biopesticide. *Journal of Virology* *84*, 7726–7729.
- Rivers, C.F., and Longworth, J.F. (1972). A nonoccluded virus of *Junonia coenia* (Nymphalidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* *20*, 369–370.
- Rodgers, F.H., Gendrin, M., Wyer, C.A.S., and Christophides, G.K. (2017). Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathogens* *13*, e1006391.
- Samuelson, J., Banerjee, S., Magneli, P., Cui, J., Kelleher, DJ., Gilmore, R and Robbins, P.W. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of setof glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* *102*(5), 1548-53.
- Shi, X., Chamankhah, M., Visal-Shah, S., Hemmingsen, S.M., Erlandson, M., Braun, L., Alting-Mees, M., Khachatourians, G.G., O'Grady, M., and Hegedus, D.D. (2004). Modeling the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata* intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* *34*, 1101–1115.
- Short, J.R., Nakayinga, R., Hughes, G.E., Walter, C.T., and Dorrington, R.A. (2013). Providence virus (family: Carmotetraviridae) replicates vRNA in association with the Golgi apparatus and secretory vesicles. *Journal of General Virology* *94*, 1073–1078.
- Song, X., Wang, M., Dong, L., Zhu, H., and Wang, J. (2018). PGRP-LD mediates *A. stephensi* vector competency by regulating homeostasis of microbiota-induced peritrophic matrix synthesis. *PLOS Pathogens* *14*, e1006899.

- Stavolone, L., and Lionetti, V. (2017). Extracellular Matrix in Plants and Animals: Hooks and Locks for Viruses. *Frontiers in Microbiology* 8.
- Sugiharti, M., Ono, C., Ito, Toshiaki, Asano, S., Sahara, K., Pujiastuti, Y., and Bando, H. (2010). Isolation of the *Thosea asigna* virus (TaV) from the epizootic *Setothosea asigna* larvae collected in South Sumatra and a study on its pathogenicity to *Limacodidae* larvae in Japan. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 117–124.
- Terra, W.R. (2001a). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.
- Terra, W.R. (2001b). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.
- Terra, W.R., and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 109, 1–62.
- Thouvenot, E., Urbach, S., Dantec, C., Poncet, J., Séveno, M., Demettre, E., Jouin, P., Touchon, J., Bockaert, J., and Marin, P. (2008). Enhanced detection of CNS cell secretome in plasma protein-depleted cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 7, 4409–4421.
- Torres-Flores, J., and Arias, C. (2015). Tight Junctions Go Viral! *Viruses* 7, 5145–5154.
- Tran, D.T., and Ten Hagen, K.G. (2013). Mucin-type O-glycosylation during development. *J. Biol. Chem.* 288, 6921–6929.
- Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.Y., and Parrish, C.R. (1995). Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology* 211, 123–132.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484–487.
- Walski, T., De Schutter, K., Van Damme, E.J.M., and Smagghe, G. (2017). Diversity and functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 83, 21–34.
- Walters, R.W., Pilewski, J.M., Chiorini, J.A., and Zabner, J. (2002). Secreted and transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *J. Biol. Chem.* 277, 23709–23713.
- Wang, P., and Granados, R.R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 135–143.
- Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L., Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., et al. (2013a). Dengue virus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of Virology* 87, 12380–12391.
- Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L., Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., et al. (2013b). Dengue virus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of Virology* 87, 12380–12391.
- Williams, T., Bergoin, M., and van Oers, M.M. (2017). Diversity of large DNA viruses of invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 4–22.
- Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., and Woodlock, J.J. (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 30, 148–152.
- Zeddari, J.-L., Cruzado, J.A., Rodriguez, J.L., and Ravallec, M. (2003). A new nucleopolyhedrovirus from the oil-palm leaf-eater *Euprosterna elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae): preliminary characterization and field

assessment in Peruvian plantation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 96, 69–75.

Zhu, K.Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., and Muthukrishnan, S. (2016). Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology* 61, 177–196.

Zhu, R., Liu, K., Peng, J., Yang, H., and Hong, H. (2007). Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Management Science* 63, 296–300.

Annexe 1

The *Junonia coenia* densovirus lectin-like activity mediates oral infection of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*.

Laetitia Pigeyre, Marc Ravallec, Leila Gasmi, Nicolas Nègre, Cécile Clouet, Martial Seveno, Khadija El Koulali, Mathilde Decourcelle, Yann Guerardel, Didier Cot, Thierry Dupressoir, Anne-Sophie Gosselin-Grenet* and Mylène Ogliastro*

Article soumis pour le numéro special “New insights into Parvovirus Research” du journal *Viruses* (invitation par l’éditeur Dr. Giorgio Gallinella).

1 **The *Junonia coenia* densovirus lectin-like activity mediates oral**
2 **infection of the lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*.**

3

4 Laetitia Pigeyre^{1,2}, Marc Ravallec², Leila Gasmi³, Nicolas Nègre², Cécile Clouet², Martial
5 Seveno⁴, Khadija El Koulali⁴, Mathilde Decourcelle⁴, Yann Guerardel⁵, Didier Cot⁶, Thierry
6 Dupressoir^{1,2}, Anne-Sophie Gosselin-Grenet^{2*} and Mylène Ogliastro^{2*}

7

8 ¹EPHE, PSL Research University, DGIMI, INRA, Université de Montpellier, Montpellier,
9 France.

10 ²DGIMI, INRA, Université de Montpellier, Montpellier, France.

11 ³ERI-BIOTECMED, Universitat de València, Valencia, Spain.

12 ⁴BioCampus Montpellier, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France.

13 ⁵UGSF, Université de Lille, CNRS, UMR 8576, Lille, France.

14 ⁶IEM, Université de Montpellier, CBRS, ENSCM, Montpellier, France.

15

16 *Corresponding authors, co-last authors: Mylene Ogliastro (marie-helene.ogliastro@inra.fr)

17 and Anne-Sophie Gosselin-Grenet (anne-sophie.gosselin-grenet@umontpellier.fr)

18

19 Key words: Insect, Lepidoptera, *Spodoptera frugiperda*, parvovirus, densovirus, peritrophic
20 matrix, chitin, peritrophins, glycans.

21

22

23

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

ABSTRACT

A crucial early step in the pathogenesis of orally infectious viruses is overcoming the gut barrier of their host. In Insects, this barrier is composed by a single-layered epithelium lined by a protective chitinous matrix, the peritrophic matrix (PM), which displays functions similar to the mucous secretions of the vertebrate digestive tract. The PM constitutes the first-line of defense that viruses must cross to reach the epithelium and initiate infection. This process is poorly known for most insect viruses, whether they are pathogenic for or transmitted by insects. To address this issue, we investigated here how an insect parvovirus overcome the digestive tract of a caterpillar host using as models the *Junonia coenia* densovirus (JcDV) and the Lepidopteran pest *Spodoptera frugiperda*. Following ingestion, the naked capsids of JcDV concentrate rapidly on the highly glycosylated PM, suggesting reminiscent of a lectin-like activity. We showed that JcDV binds to glycans and glycoconjugates that are specific of the PM. In vivo competition of JcDV with glycan inhibitors delayed infection showing that these interactions are required for oral infection. Proteomic analyses of JcDV binding proteins revealed mucins and non-mucins peritrophins. Finally, we showed that the early JcDV early infection results in an arrest of chitin synthesis and an overall dys-regulation of genes expression in the midgut, suggesting a rapid dysfunction of the gut barrier in the early steps of the pathogenesis, which may help building densovirus-based biocontrol strategies.

48

49

50 **INTRODUCTION**

51 The predominant routes of infection by parvoviruses are through faecal-oral
52 contamination and inhalation (Allison et al., 2014; Basak and Turner, 1992; Deng et al.,
53 2017). Thus, most infections initiate with primary interaction of the virions with mucosa
54 (gut, respiratory tract), where viruses can limit their replication or spread to subepithelial
55 tissues (Mutuel et al., 2010; Pironi et al., 2009).

56 Mucosa are typically composed of acellular and cellular barriers, constituting two
57 successive lines of defense that limit pathogen access to subepithelial tissues (Nava, 2004;
58 Lambert *et al.*, 2007; Guttman and Finlay, 2009; Torres-Flores and Arias, 2015). Although,
59 horizontally transmitted pathogens including parvoviruses have evolved the capacity to
60 overcome these barriers (Airenne et al., 2013; Attoui et al., 2005; Chiu et al., 2015; Ferrero
61 et al., 2015; Haas-Stapleton et al., 2004; Himeno et al., 1974; Jackson, 2009; Loiseau et al.,
62 2017; Mitsuhashi et al., 2007; Short et al., 2013; Sugiharti et al., 2010; Williams et al., 2017;
63 Zeddami et al., 2003).

64 Parvovirus entry mechanisms have long focused research, due to their interest in
65 human and animal health and particularly in medicine as transfer vectors. A number of
66 receptors have been characterized, mainly proteoglycans and glycosylated proteins, and
67 road maps of the amino acids on the capsids involved in receptor recognition are available
68 for most of the parvoviruses for which glycan receptors are known (Huang et al., 2014).
69 However, most of our understanding of the mechanisms allowing vertebrate parvoviruses
70 to cross mucosa have come from cultures of epithelial cells, which may not reflect the
71 diversity and the complexity of the interactions occurring *in vivo*. Particularly, how virions

72 control the balance between the necessity to bind to mucosal surfaces, where they can be
73 trapped by electrostatic interactions and eliminated, and find their way across to reach their
74 receptor(s) are still debated issues (Walters et al., 2002).

75 Parvoviruses infecting arthropods are generically named densoviruses. They have
76 been grouped within the *Densovirinae* subfamily, where the large diversity of their
77 sequence, structure and genomic organization discriminate five genera. Twenty-one virus
78 species are so far recognized by the International Committee for the Taxonomy of Viruses
79 (ICTV), most of them infecting insects of the Lepidoptera order (Cotmore et al., 2014), which
80 likely represents a sampling bias towards insects of economic importance (François *et al.*,
81 2016).

82 Like their vertebrate counterparts, densoviruses infecting insects are mainly
83 transmitted orally and they display tissue tropisms that can be either restricted to the gut or
84 spread to multiple tissues, including or not the gut (Gupta et al., 2015; Ito et al., 2013;
85 Kemmerer and Bonning, 2018; Liu et al., 2011; Mutuel et al., 2010a). The early pathogenesis
86 of a typical densovirus starts with the gut recognition, although this step is not fairly
87 understood. Only one potential receptor have been identified so far, and it is a mucin-like
88 protein both secreted and transmembrane by the silkworm's gut that likely mediates by the
89 *Bombyx mori* densovirus type 1 (BmDV) (Ito *et al.*, 2018).

90 In insects, the gut is typically composed by a mono-layered epithelium lined and
91 protected by an acellular layer. It shares many components with vertebrates although some
92 are specific, e.g the original composition of the acellular layer made of chitin fibrils
93 interlocked with highly glycosylated proteins (Terra, 2001a). The gut of insects has a unique
94 double embryonic origin, providing also specific features important to consider for virus
95 interactions. The anterior and posterior extremities, the foregut and the hindgut

96 respectively, are ectodermic and thus covered by an impermeable cuticle-containing matrix,
97 similar to the outer exoskeleton. In between lies the midgut, which is endodermic and
98 lined for most insects by a semi-permeable matrix, composed by a solid, chitin-based
99 structure associated mucin and non-mucin proteins (peritrophines) forming a jelly-like
100 material so called the peritrophic matrix (Hegedus et al., 2009; Terra, 2001a). The barrier
101 function of the PM can be illustrated by its ultrastructure that provides a physical protection
102 to the epithelium from food abrasion and compartmentalizes its enzymatic activities
103 (Bolognesi *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2018). The mesh network of the PM has pores, ranging in
104 size between 7-36 nm in Lepidoptera (Barbehenn, 2001; Lehane, 1997; Terra, 2001b; Terra
105 and Ferreira, 1994), that limits the passage of most insect viruses (ranging in size between
106 20 and 200 nm). The midgut is the portal of entry for most pathogens and some viruses
107 have developed specific mechanisms to pass through (Franz et al., 2015; Passarelli, 2011;
108 Stavalone and Lionetti, 2017).

109 Several densovirus are pathogenic for caterpillars from several Lepidopteran
110 orders, a developmental stage of intense feeding. They can represent original models to
111 study the early committed steps of the parvovirus pathogenesis. Herein, we deciphered the
112 early committed steps of JcDV infection of the caterpillar host *S. frugiperda*. We have
113 previously shown that JcDV crossed the gut of the caterpillar by transcytosis without
114 replicating, to spread to several internal tissues, including intestinal muscles and epithelia
115 (eg epidermis, trachea) (Mutuel et al., 2010; Wang et al., 2013a). Interestingly, the virus
116 transcytosis depends on the recognition of 4 amino acids on the capsid surface by a gut-
117 specific receptor that remains to be characterized (Multeau et al., 2012). One intriguing
118 point highlighted by the early densovirus pathogenesis, was the rapid binding of the capsids
119 on the peritrophic matrix, suggesting their lectin-like activity and thus raised the question of

120 the mechanisms involved to cross it over. To address this issue, we used a combination of
121 approaches, including microscopic, biochemical and transcriptomic, *in vitro*, *ex vivo* and *in*
122 *vivo*. We found that capsids bind specifically to peritrophins, which may consequently allow
123 the virus reaching the apical surface of the midgut. This lectin-like activity is specific to oral
124 infection, which further confirmed that the systemic spreading of JcDV to internal tissues
125 involves a different receptor-dependent mechanism. Finally, we explored whether and how
126 these early steps of the densovirus pathogenesis affect the overall gut function, although
127 with no replication within midgut cells. Our results showed that early infection results in an
128 arrest of N-acetyl-Glucosamine (GlcNAc) secretion by epithelial cells, a disorganization of the
129 PM structure and in substantial changes in the expression of proteolytic genes, which
130 probably participates to an early gut dysfunction.

131

132 **RESULTS**

133 **The highly glycosylated peritrophic matrix is a barrier to JcDV infection.** Previous works
134 have shown that the size of the pores of the PM of *S. frugiperda* caterpillars were around 8
135 nm, which makes unlikely a passive passage of 25 nm JcDV capsids (Terra and Ferreira,
136 1994). To confirm these data, we measured the pore size of the *S. frugiperda* from our
137 rearing facility. PMs were isolated and prepared for scanning electron microscopy analysis.
138 Fig. 1A showed the typical organization of the PM where measures of the pore size were
139 confirmed to be around 10 nm (10.37 ± 0.51 nm, mean and standard deviation; $n > 3$ PM
140 representing 1000 measures). To test the barrier function of the PM against densovirus
141 infection we used an optical brightener (Calcofluor white) that has been shown to
142 chemically interfere with the PM of insects, and improve baculovirus infections (Herth,
143 1980; Merzendorfer, 2013; Wang and Granados, 2000; Zhu et al., 2016, 2007). We used *in*

144 *vivo* bioassays to test the capacity of the PM to limit densovirus infections of *S. frugiperda*
145 larvae. We fed second instar (L2) caterpillars with a sub-lethal dose of Calcofluor white
146 (0,5%) prior JcDV oral infection. Larval mortality was assessed every day post infection (p.i.)
147 to measure the time required to kill 50% of the cohort (LT50s) as a proxy of virulence.
148 Results showed that when treated with Calcofluor, infected larvae displayed a significant
149 shorter time to death compared to control untreated infections (7 versus 9 days p.i. for
150 untreated larvae; $p < 0.05$) (Fig. 1B), which confirmed that barrier function of the PM against
151 JcDV infection. Noteworthy, calcofluor induced a late larval mortality in non-infected
152 caterpillars (18% at 10 days p.i.) that might be explained by the deleterious effect of
153 interfering with chitin synthesis that might affect the larval development as a consequence
154 (Merzendorfer, 2013).

155

156 **JcDV particles have a lectin-like activity.** Previous results have highlighted that JcDV
157 particles concentrate on the PM shortly after oral contamination, suggesting a lectin-like
158 activity of the capsids which may have a role in the infection process (Wang et al., 2013a) .
159 To test this hypothesis, we first characterized the affinity of JcDV particles for
160 carbohydrates, testing their ability to agglutinate erythrocytes as most lectins do, and as
161 also displayed by vertebrate parvoviruses (Tresnan et al., 1995). We realized a typical
162 hemagglutination plaque assay, adding serial dilutions of the virus inoculum to rabbit
163 erythrocytes. In the presence of JcDV, a green coloration appeared in the wells, impairing
164 analysis (Fig. 2). Under the microscope, we observed a hemolysis and melanization of the
165 erythrocytes, suggesting a cytotoxicity induced by insect components that co purify with the
166 virus (Jiang et al., 2010; Nakhleh et al., 2017). We thus tested hemagglutination with the
167 virus purified fraction (P_JcDV) and we observed a clear haemagglutination up to the 3rd

168 dilution, with a hemagglutination titer of 1/8. This result indicates that the JcDV capsids
169 have a lectin activity, although rather weak compared with vertebrate glycosylation.

170 Lectins are proteins that form reversible interactions with mono- or oligosaccharide
171 structures, the strength of the binding increasing with the number of interactions (Goldstein
172 and Hayes, 1978). We used the property of oligosaccharides to compete with lectin binding
173 to monosaccharides to test the inhibition of JcDV binding to the PM (Cummings and Etzler,
174 2009). We used four common monomeric glycans as inhibitors, ie N-acetylglucosamine
175 (GlcNAc), N-acetylgalactosamine (GalNAc), Fucose and Mannose, that are also among the
176 main glycans found in insects (Walski et al., 2017). It has to be noted that unlike vertebrates,
177 insect glycosylation does not contain sialic acid, although the presence of sialyltransferase in
178 mosquitoes have suggested that sialic acid may participate to insect glycans (Tran and Ten
179 Hagen, 2013, Walski et al 2017). Competition was obtained with GlcNAc and GalNAc, at high
180 concentration and with D Mannose and D Fucose at very low concentration, which suggests
181 a strong affinity of JcDV capsids for erythrocyte glycans at least at the pH condition tested.

182 To analyze further the JcDV lectin activity for specific glycoconjugates of insects, we
183 took advantage of the solid structure of the PM in caterpillars, making it easy to dissect and
184 manipulate *ex vivo*. We first realized competition assays incubating isolated PM for 30 min
185 with JcDV and a range of concentrations of the same glycans as above (from μM to mM).
186 The PMs were then fixed and prepared for immunofluorescence with an anti-JcDV antibody
187 to quantify the relative levels of fluorescence as a proxy of virus binding and inhibition. As
188 shown on Fig. 3A, an intense fluorescent signal was detected when JcDV was added,
189 illustrating its binding on the PM. This binding was competed with the four glycans within a
190 mM range of 0.5 mM to 5 mM; no inhibition was observed at 5 μM nor dose-dependent
191 effect within the dose range chosen (Supplementary Fig. 1). No significant difference were

192 either observed between the ligands ($P>0,05$, $n=3$) (Supplementary Fig. 1) showing that they
193 can all inhibit the binding of JcDV on glycans or glycoconjugates of the PM with the same
194 efficiency.

195 We next sought to determine the role JcDV affinity for glycans may have in the
196 infection process. We realised competition assays *in vivo*, feeding caterpillars with JcDV and
197 the four inhibitors. We limited this test to two concentrations per glycan, one for competing
198 with JcDV binding *ex vivo* (5 mM), and the other not (5 μ M), and we determined the time to
199 death of caterpillars for each treatment (LT50) as above. As shown in Fig. 4A, infected larvae
200 treated with 5 mM of inhibitors displayed a time to death significantly delayed compared to
201 larvae treated with 5 μ M and untreated controls (7 and 6 days, $P<0.05$). These results show
202 that inhibitors competed with JcDV infection. We analyzed the result of this inhibition on
203 gut semi-thin sections from infected and treated larvae by immunofluorescence with JcDV
204 antibody. As all glycans gave similar inhibition levels, we only considered GlcNAc. Fig. 4B
205 showed that gut sections displayed a strong decrease in fluorescence intensity following
206 feeding with inhibitors, which confirmed the inhibition of JcDV binding on the PM (Fig. 3B).
207 Interestingly, the fluorescent signal was also decreased in the gut lumen, suggesting that
208 viral particles can interact with carbohydrates of the food bolus, which might also include
209 walls of bacteria from the microbiota.

210

211 **JcDV lectin-like activity is required for oral infection.** We have shown that JcDV can
212 efficiently propagate by systemic infection, therefore infecting internal organs including
213 epithelia, through their basal laminae (Multeau et al., 2012; Mutuel et al., 2010). Basal and
214 apical extracellular matrices fulfill different functions and have thus unique protein and
215 glycoprotein composition, mediating JcDV infection by different mechanism (Multeau et al.,

216 2012). We studied the ability of glycans to compete with JcDV systemic infection, injecting
217 JcDV and glycans within the caterpillar abdominal cavity, thus bypassing the gut barrier. We
218 measured the LT50s to compare the outcome of these infections. Interestingly, similar
219 survival rates were obtained for infections with treated and untreated JcDV (Fig. 4C;
220 $p>0.05$), indicating that none of the oligomeric glycan competed for JcDV binding. Hence,
221 this result supports that oral infection is mediated by glycans or glycoconjugates specifically
222 located on the apical matrix and confirm that infections of internal tissues operates by a
223 different mechanism.

224

225 **JcDV interacts specifically with lepidopteran peritrophins (or PM proteins).** The next
226 question is what are the components of the PM that mediate JcDV interaction at the apical
227 surface of the epithelium. Peritrophins encompass a vast array of proteins sharing structural
228 domains, although they display a high diversity and have been poorly characterized in *S.*
229 *furgiperda*.

230 We first set up a biochemical approach to analyze their interaction with JcDV capsids.
231 Proteins were extracted from isolated PM and separated with SDS-PAGE as described by
232 (Shi et al., 2004). Gels were either stained with Coomassie Blue and Periodic Acid Schiff
233 (PAS) to visualize total and glycosylated proteins respectively, or blotted on a nitrocellulose
234 membrane to test interactions with JcDV by a Viral Overlay Protein Binding Assay (VOPBA)
235 (Edmondson and Dent, 2001). The Coomassie blue and PAS stained gels presented on Fig.
236 5A displayed high molecular weight (>250kDa), highly abundant proteins with a pattern
237 typical of mucin-like proteins when compared with the porcine mucins loaded as a control.
238 At lower molecular weight, two sets of proteins in lower abundance, presented high and no
239 glycosylation at 150-200 kDa and 25-60 kDa respectively. Notably, the overall amount of

240 proteins revealed by PAS was low compared to Coomassie blue pattern, suggesting that
241 most proteins of the PM were non-glycosylated.

242 When blotted and analysed by VOPBA, ten to 13 bands (3 replicates) of these
243 proteins were shown to interact with JcDV, although with various intensities (Fig. 5A). The
244 highest labelling was observed with the set of 150-200 kDa proteins that was also labelled in
245 the PAS gel run in parallel. The set of high molecular weight proteins (>250 kDa) displayed a
246 relative lower affinity for JcDV. Interactions were also detected with the set of 25-60 kDa
247 proteins that were not detected with the PAS staining; these proteins might represent
248 degraded or non-glycosylated forms of higher molecular weight proteins. No interaction of
249 JcDV was observed with the heterologous porcine mucin (Fig. 5A), suggesting the specific
250 binding of JcDV on lepidopteran peritrophins. Noteworthy, no competition with JcDV
251 infection was observed *in vivo* with porcine mucin, all larvae displayed LT50s (Fig. 5B). These
252 results show that JcDV binds to glycoproteins of the PM, which in turn may help the virus to
253 cross over to reach the epithelium.

254

255 **JcDV interacts with peritrophins and proteolytic enzymes of the PM.**

256 We next realized a proteomic analysis to identify the PM proteins binding JcDV. We
257 considered proteins which interaction was reproducibly revealed by three replicates of
258 VOPBA. A total of 155 proteins, common to the three replicates were analysed, out of which
259 138 were annotated in the reference genome of *S. frugiperda* (OGS 2.2; (Gouin et al., 2017a)
260 (Fig. 5C). We mostly found enzymes, including serine proteases and aminopeptidases N
261 (APN), and peritrophins including intestinal mucins (Supplementary Table 1). Gene ontology
262 (GO) annotation confirmed the enrichment in proteolytic activities (particularly serine-type
263 endopeptidases) and in chitin synthesis, which is consistent with the gut function and

264 expected from the PM composition. Interestingly in the 150-200 kDa bands that displayed
265 the highest affinity for JcDV, we found an ATP binding cassette A type 5 (ABCA5)
266 transporter, APNs and intestinal mucins (Supplementary Table 1).

267

268 **JcDV early infection induced chitin synthesis arrest and PM structure modification.** Lectins
269 are major components of plants and can have detrimental impact on the gut of
270 phytophagous insects as shown with the chitin specific Wheat Germ Agglutinin (WGA)
271 (Harper et al., 1998). To test whether the early steps of the pathogenesis can affect the PM
272 integrity, we used fluorescent WGA (FITC-WGA) to label the PM at 24h pi as done by Harper
273 et al. (Harper et al., 1998). Third instar caterpillars (4 days post hatching) were fed with JcDV
274 and sacrificed at 24 hours p.i. We dissected the guts and fixed them for sectioning and
275 fluorescence analysis. Fig. 6 showed that the WGA-FITC sharply lined the PM of non-infected
276 larvae (upper panel A). We also observed specific labelling at the apex of columnar cells,
277 which correspond to microvillar secretion of GlcNAc to form chitin fibers. By contrast, the
278 WGA-FITC labelled PM from one-day infected caterpillars displayed a multi-layered and
279 discontinuous labelling (Fig. 6, lower panel B), reminiscent of the disorganized meshwork
280 observed for caterpillars fed with the WGA lectin (Harper et al., 1998). More interestingly,
281 labelling was no longer observed at the tip of the microvilli, suggesting that following
282 infection, columnar cells stopped synthesizing chitin, which probably participates to
283 dismantle the PM structure. The precise mechanism leading chitin synthesis arrest remains
284 to be determined.

285

286 **JcDV early infection affects gut genes expression.** To measure the impact of JcDV infection
287 on the midgut barrier function, we performed a comprehensive analysis of the midgut

288 transcriptome following infection. We used Digital Gene Expression (DGE), a method
289 generating short sequences (Tags) specific for mRNA that provides qualitative and
290 quantitative gene expression data (de Lorgeril et al., 2011; Nielsen et al., 2006; Velculescu et
291 al., 1995). We constructed four libraries from RNA extracted from pools of midguts
292 dissected from mock-infected and infected larvae at 24 and 72 hours p.i. (D1 and D3
293 respectively), i.e. before and after the detection of viral replication (Mutuel et al., 2010).
294 Characteristics of the four libraries and Tags occurrence were summarized in the Table 1
295 and 2) and Tags were assigned using the reference transcriptome for *S. frugiperda* (Gouin et
296 al., 2017b; Legeai et al., 2014) (Supplementary Table 2). Comparison of the tag occurrences
297 between “mock” and “infected” libraries revealed that 190 unique tags are differentially
298 represented between D1 libraries, and 196 unique tags between D3 libraries (fold change \geq
299 5) (see Table 2). We did not detect tags corresponding to virus transcripts, which is
300 consistent with JcDV pathogenesis. Transcripts corresponding to differentially represented
301 Tags were assigned and annotated into functional groups based on GO terms
302 (Supplementary Tables 2 and Fig. 7). At 24 h and 72 h pi, the distributions of the GO terms
303 are similar although with some characteristics. Indeed, functions corresponding to "Cellular
304 and metabolic processes", "Regulation of biological process", "Response to stimulus" and
305 "Signaling" were found in all conditions. This could be interpreted as a global tissue
306 response to infection (Marques and Imler, 2016). At 72 h pi, functions are more dispersed
307 with an additional GO term corresponding to "organization of cellular components" in both
308 under- and over-expressed conditions compared to 24 h pi. The genes whose functions
309 belong to "Developmental processes" are over-expressed at 72 h p.i. Concerning the
310 molecular functions, only one characteristic is visible, the genes whose functions are related
311 to the "structure molecules activity" are over-expressed at 24 h p.i.

312 We detected a significant enrichment in GO terms (metabolic process) for the up-
313 regulated gene expression at 24 h p.i. only (Fig. 7C), although different functions were
314 affected at day-1 and -3 p.i., indicating that only early infection induces an intestinal
315 response in a specific way.

316 Interestingly, we found that a trehalose transporter and an intestinal mucin were
317 down-regulated at day 1 and day 3 p.i., respectively (Supplementary Tables 2B and D), while
318 a chitinase was up-regulated at day 3 p.i. (Supplementary Tables 2C). We did not observe
319 any change in chitin synthase expression that could explain the chitin synthesis arrest,
320 activation of genes involved in gut “inflammation” suggesting that the virus transport across
321 the gut has no effect on the canonical gut immune response. Altogether these results
322 showed that JcDV early infection and transport across the gut induces a downregulation of
323 the expression of gut genes involved in chitin synthesis and intestinal mucins, which
324 supports the chitin synthesis arrest observed at day 1 p.i. which may participate to an
325 overall dysfunction of the gut.

326

327 **DISCUSSION**

328 The oral route represents a major challenge for insect viruses whether they are
329 pathogenic or transmitted by, and they need to overcome a number of barriers to invade or
330 leave their host for transmission. Although crucial, the question of how viruses cross over
331 extracellular matrices remains poorly understood due to the complexity to study these
332 interactions *in vivo*. Pioneering works have described how baculoviruses interact and cross
333 the gut epithelium of their insect hosts and the enzymatic arsenal they encode for that to
334 disrupt the peritrophic matrix (Ohkawa et al., 2010; Passarelli, 2011). How small and naked

335 insect parvoviruses cope with the gut barrier of their hosts and particularly how they find
336 their way across the peritrophic matrix was studied here in a caterpillar model.

337 Densovirus capsids are simple (T=1 symmetry), with one a major protein (VP) that
338 makes the surface, one to three minor proteins participating to the overall icosahedric
339 typical architecture (Bossin et al., 2003; Caspar and Klug, 1962; Liu et al., 2011). The VP of
340 JcDV displays a typical single jelly roll structural domain, also that shared by in a large
341 number of viruses and shared with cellular proteins like lectins and proteins involved in
342 carbohydrate enzymatic activities (Krupovic and Koonin, 2017).

343 Interestingly, our results support a lectin-like activity of JcDV capsids, which probably
344 allows their specific interaction with the PM. We speculate that this interaction further
345 determines the capacity of the capsids to subsequently escape the PM and reach the
346 underlying epithelium.

347 Interaction with the PM was long thought to result from electrostatic charges, a
348 carbohydrate affinity given by the structure of the capsid and a characteristic shared by
349 many viruses (Krupovic and Koonin, 2017). Indeed, the haemagglutination assay showed
350 that JcDV capsids can engage these kinds of low-affinity interactions as well. However, the
351 lectin-like activity more likely revealed specific interaction of JcDV with the PM.
352 Interestingly, variability in the carbohydrate affinity has been observed as well for the
353 Canine and Feline parvoviruses, structural features of the capsids modulate carbohydrate
354 affinity and mediate differential haemagglutination properties (Agbandje-McKenna et al.,
355 1998).

356 We showed that JcV infection results in an arrest of GlcNAc synthesis and thus an
357 arrest of chitin synthesis before we can detect virus replication in target tissues. Intriguingly
358 this arrest was not associated with a drop in the expression of chitin synthase genes

359 suggesting that an alternative (indirect) mechanism could be involved. However, we cannot
360 exclude some lack in the annotation of the genome of *S. frugiperda*.

361 Another point of interest is the role that the microbiota could play in (denso)virus
362 infections. The PM controls commensal bacteria, and conversely its synthesis and integrity
363 were shown to be microbiota-dependent in mosquitoes, the gut microbiota inducing the
364 expression of components of the peritrophic matrix (Rodgers et al., 2017; Song et al., 2018).
365 Hence, we speculate that microbiota may indirectly affect virus infection. Although the role
366 of insect gut microbiota on the barrier function of the peritrophic matrix has not yet been
367 explored in the context of viral infection.

368 Last, we showed that JcDV early infection also triggers arrest of GlcNAc secretion
369 and thus the chitin synthesis. Given the structural role of the chitin, it is clear the PM will be
370 considerably weakened which supports the disorganized pattern we observed. However,
371 the mechanisms remain unknown. We speculate that JcDV transcytosis across the gut may
372 directly induce a mechanical stress on the cytoskeletal network, similar to specific drugs
373 that disorganize microtubules (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2013).

374 Densoviruses can be highly pathogenic for insect pests and vectors, which have long
375 stimulated their interest as biocontrol agents or genes vectors (Kolliopoulou et al.,
376 2017). They are considered today with a renewed interest as solutions to control harmful
377 insects are lacking, which encourages efforts to understand their pathogenesis and their
378 specificity (Carlson et al., 2006; Fédière, 2000; van Munster et al., 2003; Ren and Rasgon,
379 2010; Rivers and Longworth, 1972). Altogether the results presented here highlight the
380 finely tuned mechanisms that determine virus specificity.

381

382

383 **METHODS**

384 **Insect rearing and virus preparation.** Caterpillars of *S. frugiperda* and *S. littoralis* were
385 reared under controlled conditions ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, 65 to 70% relative humidity [RH], 16-h light, 8-
386 h dark photoperiod) on a wheat germ-based artificial diet. JcDV was amplified by orally
387 infecting *S. littoralis* caterpillars. At death, larvae were crushed and virus extraction was
388 processed by clarification and filtration on $0.22 \mu\text{m}$ (semi-purified virus stock, JcDV). This
389 virus stock was deposited on OptiPrepTM (Sigma) density gradient and dialyzed against
390 Phosphate-buffered saline (PBS) 1X to obtain a purified virus stock (P_JcDV) as previously
391 described in (Mutuel et al., 2010). Viral concentrations were estimated by quantitative PCR
392 (qPCR) as described in (Wang et al., 2013b) and virus titers determined by the tissue culture
393 assay method (50% tissue culture infective dose [TCID₅₀]) in the permissive Ld652 cells as
394 previously described (Li et al., 1996).

395 **Calcofluor, carbohydrates and lectins.** The following products were purchased from Sigma :
396 Calcofluor white M2R (Calcofluor; F3543), *N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc; A4106), *N*-
397 Acetyl-D-galactosamine (GalNAc; A2795), D-(+)-Fucose (Fucose; F8150), D-(+)-Mannose
398 (Mannose; M6020), Mucin from porcine stomach (Porcine mucin; M2378). WGA-FITC
399 conjugate was from Sigma (L4895).

400 **Bioassays in *S. frugiperda* caterpillars.** Cohorts of third-instar (L3) *S. frugiperda* were
401 individually infected by feeding with JcDV (10^9 viral equivalent genomes [veg]) or by
402 injection (10^8 veg). Calcofluor (0,5%) was concomitantly administrated with the virus. For
403 the competition assays, JcDV was incubated with glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or
404 Mannose at $5 \mu\text{M}$ and/or 5mM ; Porcine mucin at 7mM) for one hour before feeding or
405 injection. In all experiments, control larvae were fed or injected with PBS. Caterpillar

406 mortality was recorded once a day during 10 days and results were presented as survival
407 rates per day. Each treatment was applied to a cohort of 24 caterpillars and three
408 independent experiments were performed. The time to death was assessed by comparing
409 the survival curves using the Kaplan Meier method (GraphPad Prism software, version 7).
410 The significance between groups were analysed using log-rank (Mantel-cox) tests and
411 Gehan-Breslow-Wilcoxon tests.

412 **Hemagglutination assay.** Rabbit erythrocytes cells were diluted at 3% (v/v) with 150 mM
413 NaCl and treated with 0.5 mg/mL of trypsin (Sigma) for 30 min at 37°C. After washes with
414 150 mM NaCl, 25 µl serially two-fold dilutions of JcDV or P_JcDV (10^{11} veg/µl) were mixed
415 with 25 µl of erythrocytes in 96 well microtiter plates for 30 min at 37°C. Positive control
416 (hemagglutination) was performed using 25 µl of WGA (1 mg/ml) instead of virus dilution.
417 For the competition assays, 25 µl serially two-fold dilutions of 25 mM of glycans (GlcNAc,
418 GalNAc, , Fucose and Mannose) were incubated with 25 µl of P_JcDV for 30 min at RT in 96
419 well microtiter plates. Then, 50 µl of erythrocytes were added in each well for 30 min at
420 37°C. Then, hemagglutination results were read under a light microscope.

421 **PM isolation and *ex vivo* infection.** Sixth-instar (L6) *S. frugiperda* caterpillars were
422 anesthetized on ice and then sacrificed. The PMs were isolated, washed with Phosphate
423 Buffered Saline (PBS) to remove the food bolus and incubated for 30 min at room
424 temperature (RT) with JcDV alone (10^9 veg/PM), or with JcDV incubated 1 h with glycans
425 (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose; 5 µM to 50 mM) before infection. The PMs were then
426 washed with PBS and fixed 1 h with 4% paraformaldehyde (PFA).

427 **PM observation with Scanning Electron Microscopy.** The fixed PMs were dehydrated with
428 increasing concentrations of ethanol (50% to 100%). Then, PMs were dehydrated in 1:1

429 (100% ethanol and hexamethyldisilazane [HMDS]) for 10 min and finally in 100% HMDS for
430 20 min. After complete OVN evaporation, samples were ultimately coated with Platinum
431 and observed with a Scanning Electron Microscope HITACHI S-4800, with an acceleration
432 voltage of 2 kV and a working distance of 5 mm. Pores diameter was measured on SEM
433 images (8 bits) randomly taken on the PM (minimum 3 PMs, representing a total of 1000
434 measured pores), by counting the pixels whose intensity was under the threshold cut-point
435 of 130 (Fiji software). **Oral infection and semi-thin sections.** L3 *S. frugiperda* caterpillars
436 were individually feeding as above. Two hour or twenty-four hours later, caterpillars were
437 anesthetized on ice and sacrificed, then fixed in 4% PFA for 30 min at 4°C. After washes in
438 PBS, larvae were dehydrated by incubations in increasing concentrations of ethanol (50% to
439 100%) before a progressive embedding in 100% Unicryl resin (BB International) as described
440 in (Wang et al., 2013b). Semithin sections (1 µm) were further processed for
441 immunolabeling as described below.

442 **Immunolabelling and microscopy analysis.** Immunolabelling of JcDV capsids on isolated
443 PMs and semi-thin sections were performed using a rabbit primary JcDV anti-capsid
444 antibody (1:1,000; Eurogentec) incubated with samples for 2h at RT and an anti-rabbit
445 secondary antibody (Alexa Fluor® 568; 1:500; Invitrogen) incubated for 45 min at RT. Semi-
446 thin sections were incubated 45 min with WGA-FITC (1:300) to label GlcNAc and the PM or
447 with Phalloidin-FITC (1:300; Sigma) to label actin cytoskeleton, and 10 min with Dapi (1
448 µg/ml; Invitrogen) to label nuclei. Labeled PMs and semi-thin sections were then mounted
449 in Dako (Sigma) on coverslips for observation. For epifluorescence measurements, we
450 worked on a Zeiss AxioImager Z2, equipped with suitable filters for the dyes, using a 40X/1.3
451 Plan-Apochromat Oil PH3 and a 63X/1.4 Plan-Apochromat Oil PH3 objectives. For structured
452 illumination images, the Zeiss ApoTome-slider was introduced into the field-stop plane of

453 the microscope to improve resolution of images. We used the ZEN software to operate the
454 microscope and all images were taken with a CMOS Orca Flash 4.0 B&W camera. Images
455 were processed with Fiji software. The intensity of fluorescence (arbitrary unit) were
456 measured on epifluorescence images. Statistical analyses were performed using the non-
457 parametric Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism software, version 7). Each experiment was
458 repeated at least three times, and each independent experiment gave similar results.

459 **SDS-PAGE, PAS staining and Far Western-Blot.** Peritrophins were extracted from 5 *S.*
460 *frugiperda* PMs in 200 µl of Laemmli buffer 2X (4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-
461 mercaptoethanol, 0.004% bromphenol blue and 0.125 M Tris HCl, pH 7), then boiled and
462 heated at 95°C for 5 min {Shi, 2004 #282}. After centrifugation at 8,000 g for 10 min 4°C, the
463 supernatant was collected and 1/15 was loaded on 4-15 % polyacrylamide Tris-HCl gel
464 (Biorad, Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, Hercules USA) and separated by SDS-
465 PAGE. In parallel, 30 µg of porcine mucins were also loaded on the same gel. Gel was
466 stained with Page blue (Thermo Fisher Scientific) to analyse total proteins or with Periodic
467 Acid-Schiff as described in (Zacharius et al., 1969) to analyse glycosylated proteins. Proteins
468 were also transferred on nitrocellulose membranes (Biorad) for 3 h at 70 V for VOPBA.
469 Briefly, the membrane was saturated with 3% BSA in PBS/Tween 0,1 % (PBST) for 2 h at RT,
470 then incubated OVN at 4°C with JcDV (10^9 veg diluted in PBST containing 1% BSA). After
471 washes in PBST, the membrane was incubated with the primary anti-capsid antibody
472 (1:1,000; see above), then incubated with an anti-rabbit secondary antibody HRP-
473 conjugated (1:3,000; Biorad), both for 1h at RT. Proteins were revealed by enhanced
474 chemiluminescence (Millipore) using the Odyssey Fc imager (LI-COR Biosciences).

475 **Identification of PM proteins by LC–MS/MS.** Protein bands revealed by far western blot
476 were cut in SDS-PAGE gel stained with Page blue (3 replicates, 10 to 13 bands depending on
477 the replicate)) and destained with three washes in 50% acetonitrile and 50 mM TEABC. After
478 protein reduction (with 10 mM dithiothreitol in 50mM TEABC at 60 °C for 30 min in the
479 dark) and alkylation (55 mM iodoacetamide TEABC at room temperature for 30 min)
480 proteins were digested in-gel using trypsin (0.5 µg/band, Gold, Promega, Madison USA) as
481 previously described (Thouvenot *et al.*, 2008). Digest products were dehydrated in a vacuum
482 centrifuge and resuspended with 0.05% TFA and 2% ACN. The generated peptides were
483 analysed online by nano-flowHPLC–nanoelectrospray ionization using a Q-Exactive Plus
484 mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) coupled to an Ultimate 3000
485 RSLC (Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentration of samples were
486 performed on-line on a Pepmap® pre-column (0.3 mm × 10 mm, Dionex). A gradient
487 consisting of 0-25% B for 30 min, 25-40% in 5 min and 90% B for 8 min (A = 0.1% formic acid;
488 B = 0.1 % formic acid in 80% acetonitrile) at 300 nL/min was used to elute peptides from the
489 capillary reverse-phase column (0.075 mm × 150 mm, Acclaim Pepmap 100® C18, Thermo
490 Fisher Scientific) fitted with an uncoated silica PicoTip Emitter (NewObjective, Woburn, USA).
491 Spectra were acquired with the instrument operating in the information-dependent
492 acquisition mode throughout the HPLC gradient. Survey scans were acquired in the Orbitrap
493 system with resolution set at a value of 70,000. Up to twelve of the most intense ions per
494 cycle were fragmented and analyzed using a resolution of 17,500. Peptide fragmentation
495 was performed using nitrogen gas on the most abundant and at least doubly charged ions
496 detected in the initial MS scan and an active exclusion time of 45 sec. For all full scan
497 measurements with the Orbitrap detector a lock-mass ion from ambient air (m/z
498 445.120024) was used as an internal calibrant as described (Olsen *et al.*, 2005).

499 Analysis was performed using the MaxQuant software (version 1.5.5.1) (Cox et al., Nat
500 Biotechnol 2008; 26:1367–72). All MS/MS spectra were searched using Andromeda against
501 a decoy database consisting of a combination of *S. frugiperda* databases (Gouin et al.,
502 2017a) and 236 classical contaminants, containing forward and reverse entities. The
503 following settings were applied: spectra were searched with a mass tolerance of 7 ppm (MS)
504 and 0.5 Th (MS/MS). Enzyme specificity was set to trypsin. Up to two missed cleavages were
505 allowed and only peptides with at least seven amino acids in length were considered.
506 Carbamidomethylation was set as fixed cystein modification and oxidation was set as
507 variable methionine modification for searches. FDR was set at 0.01 for peptides and
508 proteins. Sequences which found homology were annotated according to the gene ontology
509 (GO) terms and classified using Blast2Go software (<https://www.blast2go.com/>; (Conesa et
510 al., 2005)). The enrichment in GO terms compared to the *S. frugiperda* reference (predicted
511 proteins from the OGS2.2 genome; Gouin et al., 2017) was analyzed with the same software
512 (FDR set at 0.01).

513 **RNA extraction from midgut.** Fourth instar *S. frugiperda* caterpillars were orally infected or
514 not with JcDV (10^{12} veg per caterpillar; 20 caterpillars per condition). At 24 h p.i. or 72 h p.i.,
515 caterpillars were anesthetized on ice and dissected. The midguts were washed in PBS to
516 eliminate the food bolus and the PMs. Trachea, Malpighi tubes and visceral muscles were
517 removed and the epithelia were incubated with 2.5% trypsin for 30 min to dissociate the
518 tissues. After washes, gut cells were lysed in 800 μ l of TRIzol[®] reagent (Invitrogen) for total
519 RNA extraction according to the manufacturer's instructions. Total RNA amount and purity
520 were checked by using spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) and the
521 integrity of total RNA was analyzed by capillary electrophoresis (2100 Bioanalyzer
522 Instrument, Agilent).

523 **DGE library construction and sequencing.** Four DGE libraries were constructed from midgut
524 total RNA extracted from *S. frugiperda* caterpillars infected (or not) for 1 and 3 days.
525 Sequence tag preparation was done with Illumina's Digital Gene Expression Tag Profiling Kit
526 according to the manufacturer's protocol (version 2.1B) as described in (de Lorgeril et al.,
527 2011). For fourth libraries, 10 µg of total RNA were incubated with oligo-dT beads. First- and
528 second-strand cDNA syntheses were performed using superscript II reverse transcription kit
529 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The cDNAs were cleaved using the
530 NlaIII anchoring enzyme. Subsequently, digested cDNAs were ligated with the GEX adapter 1
531 containing a restriction site of MmEI. The second digestion with MmEI was performed,
532 which cuts 17 bp downstream of the CATG site. At this point, the fragments detach from the
533 beads. The GEX adapter 2 was ligated to the 3' end of the tag. A PCR amplification with 15
534 cycles using Phusion polymerase (Finnzymes) was performed with primers complementary
535 to the adapter sequences to enrich the samples for the desired fragments. The resulting
536 fragments of 85 bp were purified by excision from a 6% polyacrylamide TBE gel. The DNA
537 was eluted from the gel using Spin-X Cellulose Acetate Filter (0.45 µm), precipitated,
538 resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) and quantified using Nanodrop 1000
539 spectrophotometer. Cluster generation was performed after applying 4 pM of each sample
540 to the individual lanes of the Illumina 1G flowcell. After hybridization of the sequencing
541 primer to the single-stranded products, 18 cycles of base incorporation were carried out on
542 the 1G analyzer according to the manufacturer's instructions. Image analysis and base
543 calling were performed using the Illumina Pipeline, where sequence tags were obtained
544 after purity filtering.

545 **Functional annotation of Tags.** The sequence files of each DGE library were analyzed with
546 BIOTAG software (Skuld-Tech, Grabels, France). The statistical value of DGE data

547 comparisons, as a function of tag counts, was calculated by assuming that each tag has an
548 equal chance of being detected. Differential expression of the Tag counts of the infected
549 versus mock conditions was performed to obtain a list of up- and down-regulated tags for
550 each condition. Tags for which differential expression was ≥ 5 fold change were assigned
551 using the reference transcriptome for *S. frugiperda* (Gouin et al., 2017b; Legeai et al.,
552 2014)). Sequences which found homology were annotated according to the GO terms and
553 classified using Blast2Go software (<https://www.blast2go.com/>; (Conesa et al., 2005)) and
554 represented at level 2 of Biological process and Molecular function. The enrichment in GO
555 terms compared to the *S. frugiperda* reference (predicted transcripts from the OGS2.2
556 genome) was analyzed with the same software (FDR set at 0.01).

557

558 **ACKNOWLEDGEMENTS**

559 We are grateful to C. Gibard and G. Clabot for their great help with insect rearing. We
560 especially acknowledge Elodie Jublanc and Chantal Cazevieille for their skillful technical
561 assistance and the imaging facility MRI, member of the national France-BioImaging
562 infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04,
563 «Investments for the future»). Thanks to Philippe Clair from the qPHD Platform (Montpellier
564 GenomiX). Manuella Younes, master student, and David Piquemal are also acknowledged
565 for their support in the SAGE part of this work. Special thanks to Pierre-André Lafon for his
566 help for the statistical analysis. L. Pigeyre was a doctoral fellow of the french Ministry for
567 Higher Education and Research / EPHE.

568

569

570

571 **FIGURES LEGENDS**

572 **Figure 1. Calcofluor increases *S. frugiperda* caterpillars susceptibility to densovirus oral**
573 **infection.** (A) SEM image of PM ultrastructure. Endoperitrophic face is shown (bar, 500 nm).
574 (B) *S. frugiperda* caterpillars (n=24) were individually infected by feeding with JcDV
575 concomitantly with 0.5% of Calcofluor or PBS as a control. Caterpillar mortality was
576 recorded once a day during 10 days and results were presented as survival rates per day.
577 Three independent experiments were performed, each independent experiment gave
578 similar results, one is represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-
579 Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values of less than 0.05
580 were considered significant (**, *P* < 0.01). PBS refers to control (PBS-treated and non-
581 infected) caterpillars; Calcofluor refers to Calcofluor-treated and non-infected caterpillars;
582 JcDV refers to JcDV-infected caterpillars and JcDV+Calcofluor to Calcofluor-treated and
583 JcDV-infected caterpillars.

584

585 **Figure 2. Hemagglutination assays with JcDV.** Rabbit erythrocytes cells were incubated with
586 serially two-fold dilutions of JcDV or P_JcDV for 30 min at 37°C. Positive control
587 (hemagglutination) was performed using 25 µl of WGA (1 mg/ml) instead of virus dilution.
588 For the competition assays, serially two-fold dilutions of 25 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc, ,
589 Fucose and Mannose) were incubated with P_JcDV before incubation with
590 hemagglutination assays. Semi-purified virus (JcDV) induced a green coloration in the wells,
591 signs of hemolysis and melanization of erythrocytes. The purified virus (P_JcDV) showed a
592 clear haemagglutination for the 3 first dilutions. Inhibition of haemagglutination was
593 obtained with 25 mM of GlcNAc and GalNAc.

594

595 **Figure 3. Ex vivo interaction of JcDV with the PM involves carbohydrates.** Apotome images
596 of PMs *ex vivo* incubated with JcDV alone or with JcDV treated for 1 h with 5 μ M to 50 mM
597 of glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose) before infection. JcDV labeling is in red.
598 PBS 50 mM refers to control PMs incubated only with 50 mM of glycans. Bars, 50 μ m. Each
599 experiment was repeated at least three times, and each independent experiment gave
600 similar results, one is shown here.

601

602 **Figure 4. The lectin-like activity of JcDV for the PM favors oral infection of *S. frugiperda***
603 **caterpillars.** (A) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by feeding with JcDV alone or
604 with JcDV incubated for 1 h with 5 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose)
605 before infection. Control caterpillars were fed with PBS. Three independent experiments
606 were performed, each independent experiment gave similar results, one is represented
607 here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to
608 determine statistical significance. *P* values of less than 0.05 were considered significant (ns,
609 non-significant; *, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; *** *P* < 0.001). PBS refers to control (PBS-treated
610 and non-infected) caterpillars and JcDV to JcDV-infected caterpillars; JcDV+GlcNAc,
611 JcDV+GalNAc, Jc+Fucose and Jc+Mannose refer to caterpillars infected with JcDV incubated
612 with GlcNAc, GalNAc, Fucose or Mannose, respectively, before feeding. (B) Immunolabeling
613 of midgut semithin transversal sections 2 h after ingestion of JcDV alone or JcDV incubated
614 for 1 h with 5 mM of GlcNAc or GalNAc before infection. Control caterpillars (non-infected
615 [NI]) were fed with PBS. The PM is shown by an arrow. Phalloidin-FITC is in green, JcDV is in
616 red, and nuclei are labeled with Dapi (blue). Bars, 30 μ m. Lum, midgut lumen; HemoL,
617 hemolymphatic compartment. (C) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by injection

618 with JcDV alone or with JcDV incubated for 1 h with 5 mM of glycans (GlcNAc, GalNAc,
619 Fucose or Mannose) before infection. Control caterpillars were injected with PBS. Three
620 independent experiments were performed, each independent experiment gave similar
621 results, one is represented here. The log-rank (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-
622 Wilcoxon tests were used to determine statistical significance. *P* values are less than 0.05
623 and were considered non-significant (ns). PBS, JcDV, JcDV+GlcNAc, JcDV+GalNAc,
624 JcDV+Fucose and JcDV+Mannose refer as in (A).

625

626 **Figure 5. JcDV has specific affinity for glycosylated proteins of the PM.** (A) VOPBA analysis
627 of PM proteins interacting with JcDV. Proteins were extracted from PMs and separated by
628 SDS-PAGE as described in Methods. Thirty µg of porcine mucins were also loaded in the gel
629 as a control of highly O-glycosylated proteins. Proteins were then stained with Coomassie
630 Blue or Periodic Acid Schiff (PAS, pink) to visualize total or glycosylated proteins,
631 respectively, and transferred to nitrocellulose membranes for probing with JcDV and anti-
632 JcDV capsid antibody. Proteins interacting with JcDV capsids were finally revealed by
633 enhanced chemiluminescence (black arrowheads). Blue and pink arrowheads show the
634 corresponding position of these proteins in gel stained with Page blue or PAS, respectively.
635 (B) Survival curves of caterpillars (n=24) infected by feeding with JcDV alone or with JcDV
636 incubated for 1 h with 7 mM of porcine mucin before infection. Control caterpillars (non-
637 infected) were fed with PBS. Three independent experiments were performed, each
638 independent experiment gave similar results, one is represented here. The log-rank
639 (Mantel-cox) and the Gehan-Breslow-Wilcoxon tests were used to determine statistical
640 significance. *P* values of less than 0.05 were considered significant (ns, non significant).
641 Porcine mucins refer to porcine mucin-fed and non-infected caterpillars; JcDV refers to

642 JcDV-infected caterpillars and JcDV+Porcine mucin to caterpillars infected with JcDV that
643 was incubated with porcine mucin before feeding. (C) Venn diagram of three replicates of
644 proteomic analysis (PM1, PM2, PM3) of PM proteins interacting with JcDV. Protein bands
645 revealed by far western blot were cut in SDS-PAGE gel stained with Page blue and analyzed
646 by LC-MS/MS as described in Methods. Among the 155 proteins common to the three
647 replicates, 138 were annotated in the reference genome of *S. frugiperda* (Gouin et al.,
648 2017). (D) GO terms enrichment for the 138 common annotated PM proteins interacting
649 with JcDV, compared to the reference (predicted proteins from OGS2.2 *S. frugiperda*
650 genome; Gouin et al., 2017) (FDR set at 0.01). The 138 common PM proteins were
651 assigned to the gene ontology (GO) terms using Blast2Go software.

652

653 **Figure 6. JcDV oral infection induces PM disorganization.** Caterpillars were orally (B)
654 infected with JcDV or (A) fed with PBS as a control (PBS, non-infected larvae) . At 24 h pi,
655 semi-thin transversal sections (1 μm) were prepared and processed for immunolabeling as
656 described in Methods. WGA-FITC was used to visualize chitin synthesis and PM structure (in
657 green). Nuclei are in blue (Dapi). Arrows show GlcNAc secretion by microvilli and arrowhead
658 the PM. Bars, 20 μm .

659

660 **Figure 7. JcDV oral infection induces midgut gene expression modulation.** (A and B) Pie
661 charts representation of GO assignment of 196 and 60 unique transcripts over- and under-
662 represented (≥ 5 fold change) between infected and non-infected midgut DGE libraries,
663 respectively, at day 1 (up panel) and day 3 (lower) p.i. Categorization were based on GO
664 terms assignment from 2nd level of Biological Process (A) and Molecular Function (B) using

665 Blast2GO software. (C) GO terms enrichment for the up-regulated genes at 24 h p.i.,
666 compared to the reference, compared to the reference (OGS2.2 *S. frugiperda* genome;
667 Gouin et al., 2017) (FDR set at 0.01).

668

669 **Supplementary Figure. Relative quantification of JcDV binding on isolated PM and**
670 **competition assays with monomeric glycans.** Intensity of red fluorescence (arbitrary unit
671 [U.A.]) of PMs measured on epifluorescence images. Values are the result of the
672 quantification of at least 10 images from 3 independent experiments. Statistical analyses
673 were determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test. P values of less than 0.05
674 were considered significant (ns, non-significant; *, P < 0.05; **, P < 0.01; *** P < 0.001).
675 Mock refers to PM infected with a clarified and filtered homogenate of non-infected
676 caterpillars.

677

678

679 **Bibliography**

680 Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., and Rossmann, M.G.
681 (1998). Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of
682 mice. *Structure* 6, 1369–1381.

683

684 Airene, K., Hu, Y.-C., Kost, T., Smith, R., Kotin, R., Ono, C., Matsuura, Y., Wang, S.,
685 and Ylä-Herttua, S. (2013). Baculovirus: an Insect-derived Vector for Diverse Gene
686 Transfer Applications. *Molecular Therapy* 21, 739–749.

687

688 Allison, A.B., Kohler, D.J., Ortega, A., Hoover, E.A., Grove, D.M., Holmes, E.C., and
689 Parrish, C.R. (2014). Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In
690 Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *PLOS Pathogens* 10, e1004475.

691

692 Attoui, H., Mohd Jaafar, F., Belhouchet, M., Biagini, P., Cantaloube, J.-F., de Micco, P., and
693 de Lamballerie, X. (2005). Expansion of family Reoviridae to include nine-segmented
694 dsRNA viruses: isolation and characterization of a new virus designated *Aedes*
695 *pseudoscutellaris* reovirus assigned to a proposed genus (*Dinovernavirus*). *Virology* 343,
696 212–223.

697
698 Barbehenn, R.V. (2001). Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects
699 from ingested plant allelochemicals. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 86–
700 99.
701
702 Basak, S., and Turner, H. (1992). Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology*
703 186, 368–376.
704
705 Bolognesi, R., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., and Ferreira, C. (2001). The peritrophic membrane
706 of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling
707 digestive enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 62–75.
708
709 Bossin, H., Fournier, P., Royer, C., Barry, P., Cérutti, P., Gimenez, S., Couble, P., and
710 Bergoin, M. (2003). *Junonia coenia* Densovirus-Based Vectors for Stable Transgene
711 Expression in Sf9 Cells: Influence of the Densovirus Sequences on Genomic Integration. *J*
712 *Virol* 77, 11060–11071.
713
714 Carlson, J., Suchman, E., and Buchatsky, L. (2006). Densoviruses for control and genetic
715 manipulation of mosquitoes. *Advances in Virus Research* 68, 361–392.
716
717 Caspar, D.L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses.
718 *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 1–24.
719
720 Chiu, E., Hijnen, M., Bunker, R.D., Boudes, M., Rajendran, C., Aizel, K., Olieric, V.,
721 Schulze-Briese, C., Mitsuhashi, W., Young, V., et al. (2015). Structural basis for the
722 enhancement of virulence by viral spindles and their in vivo crystallization. *Proceedings of*
723 *the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 3973–3978.
724
725 Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005).
726 Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics
727 research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676.
728
729 Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J.,
730 Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., et al. (2014). The family
731 *Parvoviridae*. *Archives of Virology* 159, 1239–1247.
732
733 Cummings, R.D., and Etzler, M.E. (2009). Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In
734 *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley,
735 C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring
736 Harbor Laboratory Press), p.
737
738 Deng, X., Zou, W., Xiong, M., Wang, Z., Engelhardt, J.F., Ye, S.Q., Yan, Z., and Qiu, J.
739 (2017). Human Parvovirus Infection of Human Airway Epithelia Induces Pyroptotic Cell
740 Death by Inhibiting Apoptosis. *J Virol* 91.
741
742 Dias, R.O., Cardoso, C., Pimentel, A.C., Damasceno, T.F., Ferreira, C., and Terra, W.R.
743 (2018). The roles of mucus-forming mucins, peritrophins and peritrophins with mucin
744 domains in the insect midgut: Insect mucus-forming mucins. *Insect Molecular Biology* 27,
745 46–60.
746

747 Edmondson, D.G., and Dent, S.Y. (2001). Identification of protein interactions by far western
748 analysis. *Current Protocols in Protein Science Chapter 19*, Unit 19 7.
749

750 Fédière, G. (2000). Epidemiology and Pathology of Densoviriinae. In *Contributions to*
751 *Microbiology*, pp. 1–11.
752

753 Ferrero, D.S., Buxaderas, M., Rodríguez, J.F., and Verdaguer, N. (2015). The Structure of the
754 RNA-Dependent RNA Polymerase of a Permutotetravirus Suggests a Link between Primer-
755 Dependent and Primer-Independent Polymerases. *PLOS Pathogens 11*, e1005265.
756

757 François, S., Filloux, D., Roumagnac, P., Bigot, D., Gayral, P., Martin, D.P., Froissart, R.,
758 and Ogliastro, M. (2016). Discovery of parvovirus-related sequences in an unexpected broad
759 range of animals. *Scientific Reports 6*, 30880.
760

761 Franz, A.W., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., and Clem, R.J. (2015). Tissue Barriers to
762 Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses 7*, 3741–3767.

763 Goldstein, I.J., and Hayes, C.E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants
764 and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry 35*, 127–340.
765

766 Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., Hilliou, F.,
767 Durand, N., Montagné, N., Darboux, I., et al. (2017a). Two genomes of highly polyphagous
768 lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges.
769 *Scientific Reports 7*.
770

771 Gouin, A., Bretaudeau, A., Nam, K., Gimenez, S., Aury, J.-M., Duvic, B., Hilliou, F.,
772 Durand, N., Montagné, N., Darboux, I., et al. (2017b). Two genomes of highly polyphagous
773 lepidopteran pests (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae) with different host-plant ranges.
774 *Scientific Reports 7*.
775

776 Gupta, T., Kadono-Okuda, K., Ito, K., Trivedy, K., and Ponnuvel, K.. (2015). Densovirus
777 infection in silkworm *Bombyx mori* and genes associated with disease resistance.
778 *Invertebrate Survival Journal 118–128*.
779

780 Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2009). Tight junctions as targets of infectious agents.
781 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1788*, 832–841.
782

783 Haas-Stapleton, E.J., Washburn, J.O., and Volkman, L.E. (2004). P74 Mediates Specific
784 Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to
785 Primary Cellular Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *Journal of*
786 *Virology 78*, 6786–6791.
787

788 Harper, M.S., Hopkins, T.L., and Czapla, T.H. (1998). Effect of wheat germ agglutinin on
789 formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia*
790 *nubilalis*) larvae. *Tissue Cell 30*, 166–176.
791

792 Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., and Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic
793 matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology 54*, 285–302.
794

795 Herth, W. (1980). Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of
796 *Poteroiochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation.

797 The Journal of Cell Biology 87, 442–450.
798
799 Himeno, M., Onodera, K., and Tanami, Y. (1974). Properties of flacherie virus of the
800 silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Invertebrate Pathology 23, 164–171.
801
802 Huang, L.Y., Halder, S., and Agbandje-McKenna, M. (2014). Parvovirus glycan interactions.
803 Current Opinion in Virology 7, 108–118.
804
805 Ito, K., Kidokoro, K., Shimura, S., Katsuma, S., and Kadono-Okuda, K. (2013). Detailed
806 investigation of the sequential pathological changes in silkworm larvae infected with
807 *Bombyx densovirus* type 1. Journal of Invertebrate Pathology 112, 213–218.
808
809 Ito, K., Kidokoro, K., Katsuma, S., Sezutsu, H., Uchino, K., Kobayashi, I., Tamura, T.,
810 Yamamoto, K., Mita, K., Shimada, T., et al. (2018). A single amino acid substitution in the
811 *Bombyx* -specific mucin-like membrane protein causes resistance to *Bombyx mori*
812 densovirus. Scientific Reports 8, 7430.
813
814 Jackson, T.A. (2009). The Use of *Oryctes* Virus for Control of Rhinoceros Beetle in the
815 Pacific Islands. In Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods, A.E.
816 Hajek, T.R. Glare, and M. O’Callaghan, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 133–
817 140.
818
819 Kemmerer, M., and Bonning, B. (2018). Transcytosis of *Junonia coenia* densovirus VP4
820 across the gut epithelium of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Insect Science.
821 Kolliopoulou, A., Taning, C.N.T., Smagghe, G., and Swevers, L. (2017). Viral Delivery of
822 dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects
823 and Challenges. Front Physiol 8.
824
825 Krupovic, M., and Koonin, E.V. (2017). Multiple origins of viral capsid proteins from
826 cellular ancestors. Proceedings of the National Academy of Sciences 114, E2401–E2410.
827 Lambert, D., O’Neill, C., and Padfield, P. (2007). Methyl- β -Cyclodextrin Increases
828 Permeability of Caco-2 Cell Monolayers by Displacing Specific Claudins from Cholesterol
829 Rich Domains Associated with Tight Junctions. Cellular Physiology and Biochemistry 20,
830 495–506.
831
832 Legeai, F., Gimenez, S., Duvic, B., Escoubas, J.M., Gosselin Grenet, A.S., Blanc, F.,
833 Cousserans, F., Seninet, I., Bretaudeau, A., Mutuel, D., et al. (2014). Establishment and
834 analysis of a reference transcriptome for *Spodoptera frugiperda*. BMC Genomics 15, 704.
835
836 Lehane, M.J. (1997). PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. Annual
837 Review of Entomology 42, 525–550.
838
839 Li, Y., Jousset, F.X., Giraud, C., Rolling, F., Quiot, J.M., and Bergoin, M. (1996). A titration
840 procedure of the *Junonia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned
841 genomic DNA in four lepidopteran cell lines. Journal of Virological Methods 57, 47–60.
842
843 Liu, K., Li, Y., Jousset, F.-X., Zadori, Z., Szelei, J., Yu, Q., Pham, H.T., Lépine, F., Bergoin,
844 M., and Tijssen, P. (2011). The *Acheta domesticus* Densovirus, Isolated from the European
845 House Cricket, Has Evolved an Expression Strategy Unique among Parvoviruses ν . J Virol
846 85, 10069–10078.

847
848 Loiseau, V., Giraud, I., Federici, B., Bigot, Y., Cordaux, R., and Gilbert, C. (2017). Iridovirus
849 IIV31 : un pathogène d'isopodes terrestres remarquable. *Virologie 21*, 147–149.
850
851 de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., and Bachere, E. (2011). Whole
852 transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster
853 *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PLoS One 6*, e23142.
854
855 Marques, J.T., and Imler, J.-L. (2016). The diversity of insect antiviral immunity: insights
856 from viruses. *Curr Opin Microbiol 32*, 71–76.
857
858 Merzendorfer, H. (2013). Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments.
859 *Insect Science 20*, 121–138.
860
861 Merzendorfer, H., and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function
862 and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology 206*,
863 4393–4412.
864
865 Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., and
866 Wada, S. (2007). Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by
867 disrupting the peritrophic membrane. *Journal of Virology 81*, 4235–4243.
868
869 Multeau, C., Froissart, R., Perrin, A., Castelli, I., Casartelli, M., and Ogliastro, M. (2012).
870 Four amino acids of an insect densovirus capsid determine midgut tropism and virulence.
871 *Journal of Virology 86*, 5937–5941.
872
873 van Munster, M., Dulleman, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault,
874 V., Clerivet, A., and van der Wilk, F. (2003). Characterization of a new densovirus infecting
875 the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology 84*, 6–14.
876
877 Mutuel, D., Ravallec, M., Chabi, B., Multeau, C., Salmon, J.M., Fournier, P., and Ogliastro,
878 M. (2010a). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of
879 infection that leads to hypoxia. *Virology 403*, 137–144.
880
881 Mutuel, D., Ravallec, M., Chabi, B., Multeau, C., Salmon, J.M., Fournier, P., and Ogliastro,
882 M. (2010b). Pathogenesis of *Junonia coenia* densovirus in *Spodoptera frugiperda*: a route of
883 infection that leads to hypoxia. *Virology 403*, 137–144.
884
885 Nava, P. (2004). The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of
886 tight junctions in epithelial cells. *Journal of Cell Science 117*, 5509–5519.
887
888 Nielsen, K.L., Hogh, A.L., and Emmersen, J. (2006). DeepSAGE--digital transcriptomics
889 with high sensitivity, simple experimental protocol and multiplexing of samples. *Nucleic
890 Acids Research 34*, e133.
891
892 Ohkawa, T., Volkman, L.E., and Welch, M.D. (2010). Actin-based motility drives
893 baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *The Journal of Cell Biology 190*, 187–195.
894 Olsen, J.V., de Godoy, L.M.F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A.,
895 Lange, O., Horning, S., and Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap
896 mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol. Cell Proteomics 4*, 2010–2021.

897 Passarelli, A.L. (2011). Barriers to success: how baculoviruses establish efficient systemic
898 infections. *Virology* 411, 383–392.
899

900 Pironi, L., Bonvicini, F., Gionchetti, P., D’Errico, A., Rizzello, F., Corsini, C., Foroni, L., and
901 Gallinella, G. (2009). Parvovirus B19 Infection Localized in the Intestinal Mucosa and
902 Associated with Severe Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 47,
903 1591–1595.
904

905 Ren, X., and Rasgon, J.L. (2010). Potential for the *Anopheles gambiae* densovirus
906 to act as an “evolution-proof” biopesticide. *Journal of Virology* 84, 7726–7729.
907

908 Rivers, C.F., and Longworth, J.F. (1972). A nonoccluded virus of *Junonia coenia*
909 (Nymphalidae: Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology* 20, 369–370.
910

911 Rodgers, F.H., Gendrin, M., Wyer, C.A.S., and Christophides, G.K. (2017). Microbiota-
912 induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of
913 malaria vector mosquitoes. *PLoS Pathogens* 13, e1006391.
914

915 Shi, X., Chamankhah, M., Visal-Shah, S., Hemmingsen, S.M., Erlandson, M., Braun, L.,
916 Altung-Mees, M., Khachatourians, G.G., O’Grady, M., and Hegedus, D.D. (2004). Modeling
917 the structure of the type I peritrophic matrix: characterization of a *Mamestra configurata*
918 intestinal mucin and a novel peritrophin containing 19 chitin binding domains. *Insect*
919 *Biochemistry and Molecular Biology* 34, 1101–1115.
920

921 Short, J.R., Nakayinga, R., Hughes, G.E., Walter, C.T., and Dorrington, R.A. (2013).
922 Providence virus (family: Carmotetraviridae) replicates vRNA in association with the Golgi
923 apparatus and secretory vesicles. *Journal of General Virology* 94, 1073–1078.
924

925 Song, X., Wang, M., Dong, L., Zhu, H., and Wang, J. (2018). PGRP-LD mediates *A.*
926 *stephensi* vector competency by regulating homeostasis of microbiota-induced peritrophic
927 matrix synthesis. *PLOS Pathogens* 14, e1006899.
928

929 Stavolone, L., and Lionetti, V. (2017). Extracellular Matrix in Plants and Animals: Hooks
930 and Locks for Viruses. *Frontiers in Microbiology* 8.
931

932 Sugiharti, M., Ono, C., Ito, Toshiaki, Asano, S., Sahara, K., Pujiastuti, Y., and Bando, H.
933 (2010). Isolation of the *Thauma asigna* virus (TaV) from the epizootic *Setothauma asigna*
934 larvae collected in South Sumatra and a study on its pathogenicity to *Limacodidae* larvae in
935 Japan. *Journal of Insect Biotechnology and Sericulture* 117–124.
936

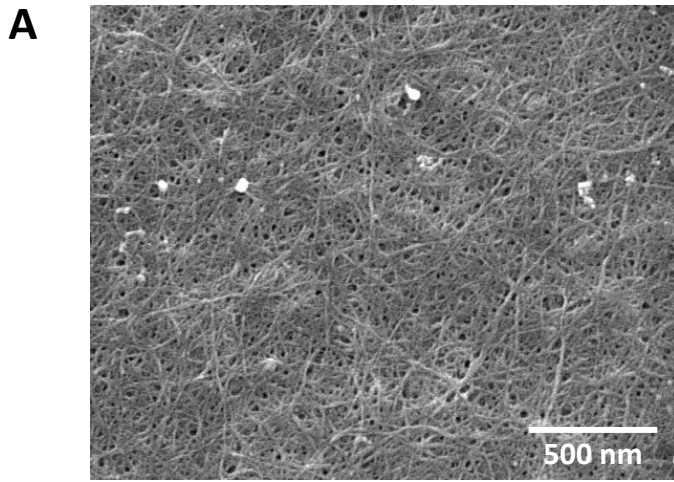
937 Terra, W.R. (2001a). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and
938 peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.
939

940 Terra, W.R. (2001b). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and
941 peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47, 47–61.
942

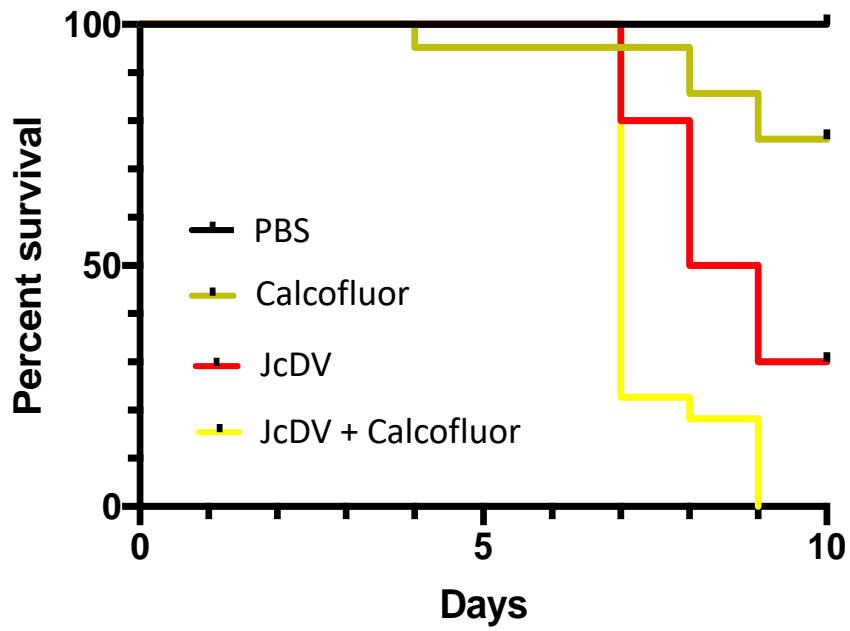
943 Terra, W.R., and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties,
944 compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:*
945 *Comparative Biochemistry* 109, 1–62.
946

947 Thouvenot, E., Urbach, S., Dantec, C., Poncet, J., Séveno, M., Demettré, E., Jouin, P.,
948 Touchon, J., Bockaert, J., and Marin, P. (2008). Enhanced detection of CNS cell secretome in
949 plasma protein-depleted cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 7, 4409–4421.
950
951 Torres-Flores, J., and Arias, C. (2015). Tight Junctions Go Viral! *Viruses* 7, 5145–5154.
952 Tran, D.T., and Ten Hagen, K.G. (2013). Mucin-type O-glycosylation during development. *J.*
953 *Biol. Chem.* 288, 6921–6929.
954
955 Tresnan, D.B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J.Y., and Parrish, C.R. (1995). Analysis of
956 the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine
957 parvovirus capsid. *Virology* 211, 123–132.
958
959 Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1995). Serial analysis of
960 gene expression. *Science* 270, 484–487.
961 Walski, T., De Schutter, K., Van Damme, E.J.M., and Smagghe, G. (2017). Diversity and
962 functions of protein glycosylation in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 83,
963 21–34.
964
965 Walters, R.W., Pilewski, J.M., Chiorini, J.A., and Zabner, J. (2002). Secreted and
966 transmembrane mucins inhibit gene transfer with AAV4 more efficiently than AAV5. *J. Biol.*
967 *Chem.* 277, 23709–23713.
968
969 Wang, P., and Granados, R.R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in
970 insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 135–143.
971
972 Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L.,
973 Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., et al. (2013a). Densovirus crosses
974 the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of*
975 *Virology* 87, 12380–12391.
976
977 Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L.,
978 Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., et al. (2013b). Densovirus crosses
979 the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *Journal of*
980 *Virology* 87, 12380–12391.
981
982 Williams, T., Bergoin, M., and van Oers, M.M. (2017). Diversity of large DNA viruses of
983 invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology* 4–22.
984
985 Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., and Woodlock, J.J. (1969). Glycoprotein staining
986 following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 30, 148–152.
987
988 Zeddani, J.-L., Cruzado, J.A., Rodriguez, J.L., and Ravallec, M. (2003). A new
989 nucleopolyhedrovirus from the oil-palm leaf-eater *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera:
990 Limacodidae): preliminary characterization and field assessment in Peruvian plantation.
991 *Agriculture, Ecosystems & Environment* 96, 69–75.
992
993 Zhu, K.Y., Merzendorfer, H., Zhang, W., Zhang, J., and Muthukrishnan, S. (2016).
994 Biosynthesis, Turnover, and Functions of Chitin in Insects. *Annual Review of Entomology*
995 61, 177–196.
996

997 Zhu, R., Liu, K., Peng, J., Yang, H., and Hong, H. (2007). Optical brightener M2R destroys
998 the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest*
999 *Management Science* 63, 296–300.

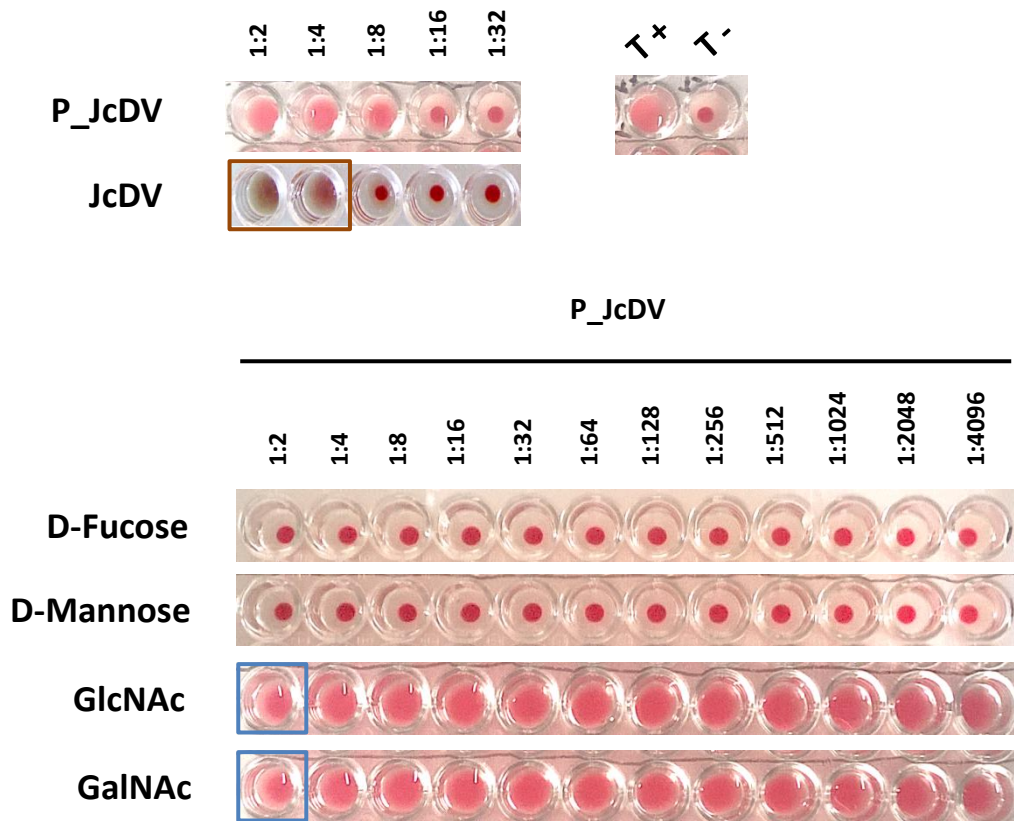


B



Pairwise comparison	Log-rank (Mantel-Cox)	Gehan-Breslow-Wilcoxon
JcDV + Calcofluor vs JcDV	P value = 0.0013 **	P value = 0,0026 **
Calcofluor vs JcDV	P value = 0.0027 **	P value = 0.0039 **

Figure 1



T+	+
T-	-

Virus dilutions	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
P_JcDV	+	+	+	-	-
JcDV	-	-	-	-	-

Glycans dilutions	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GlcNAc	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GalNAc	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Figure 2

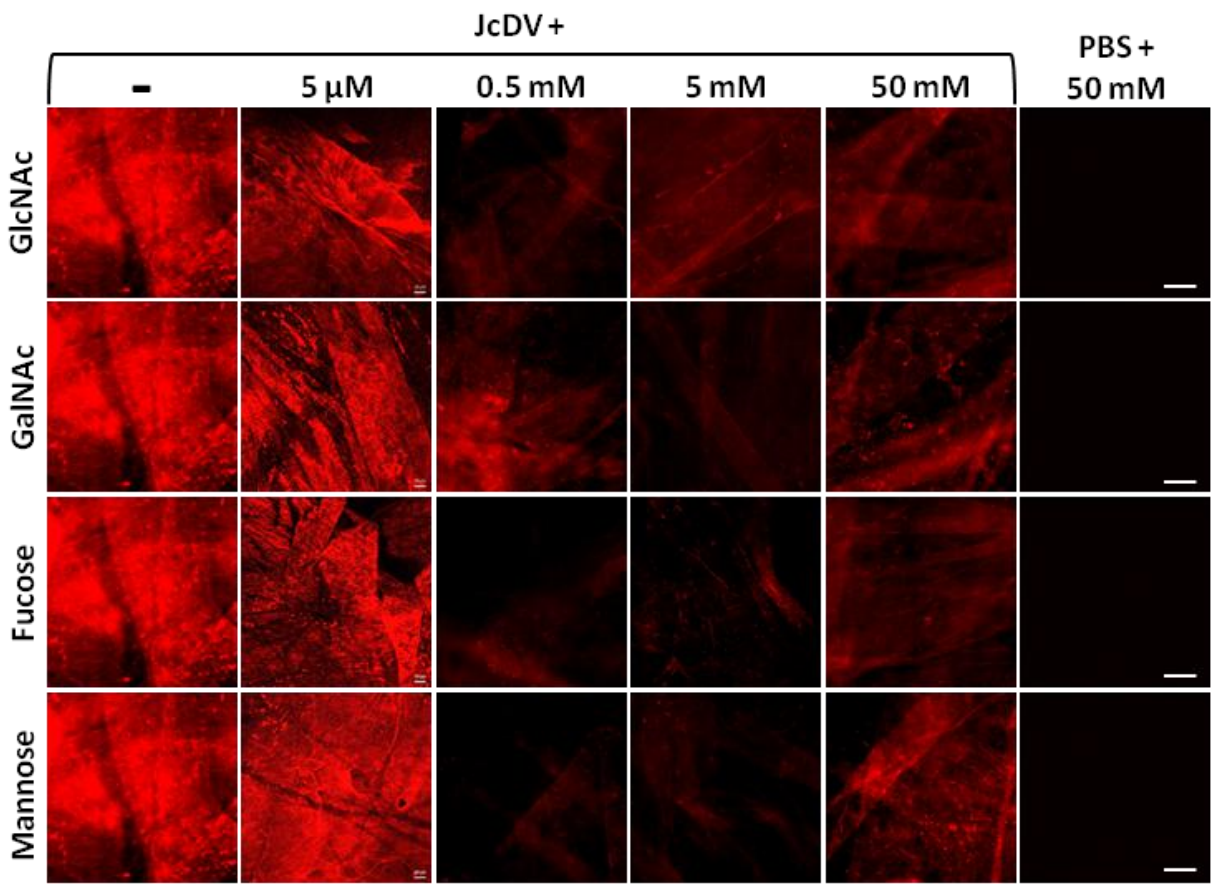
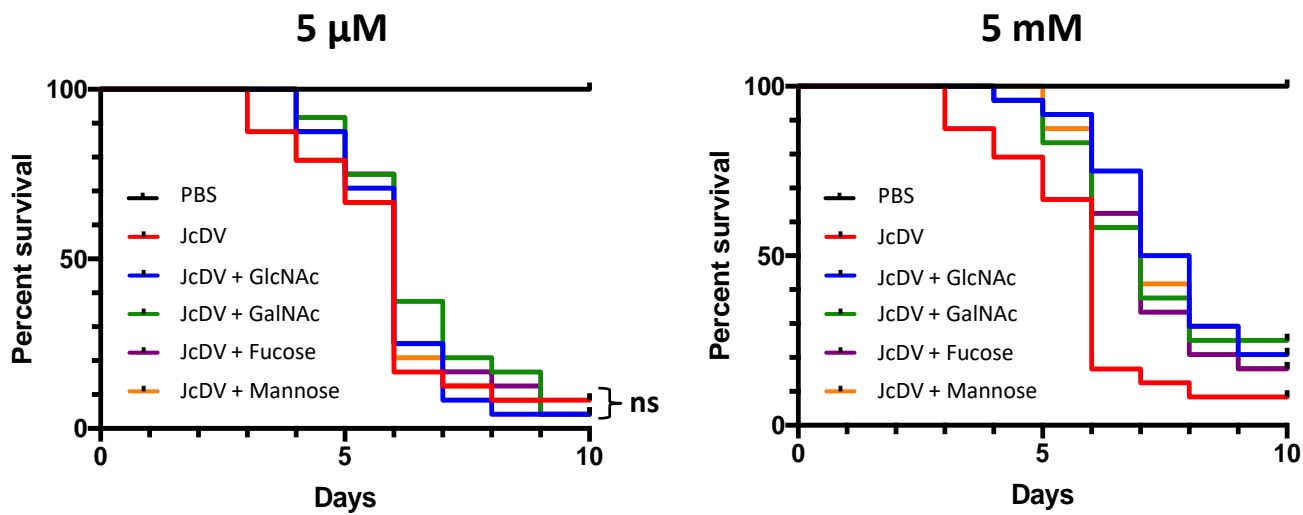


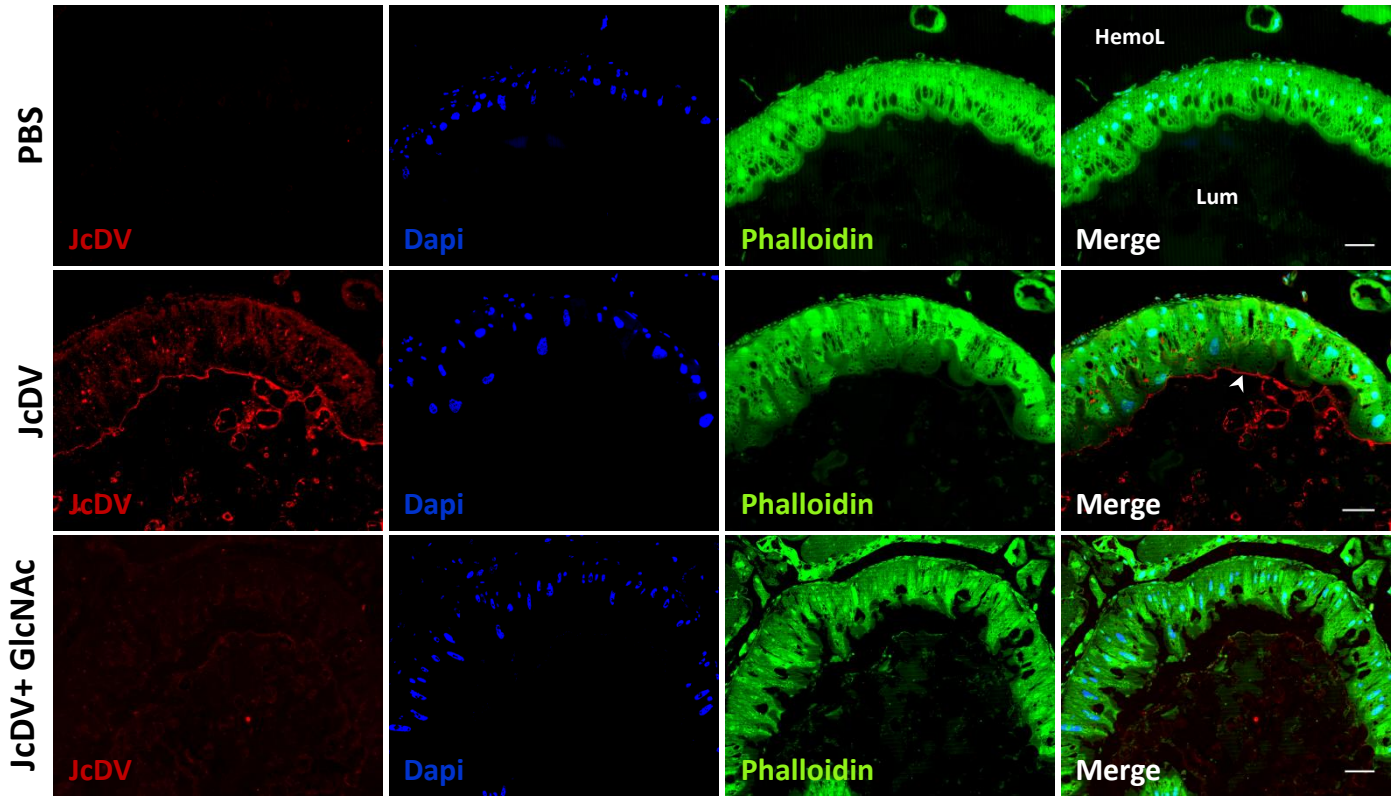
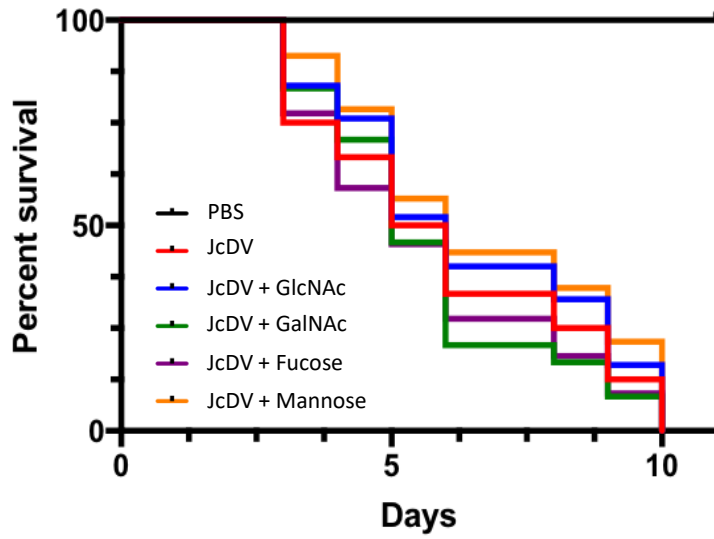
Figure 3

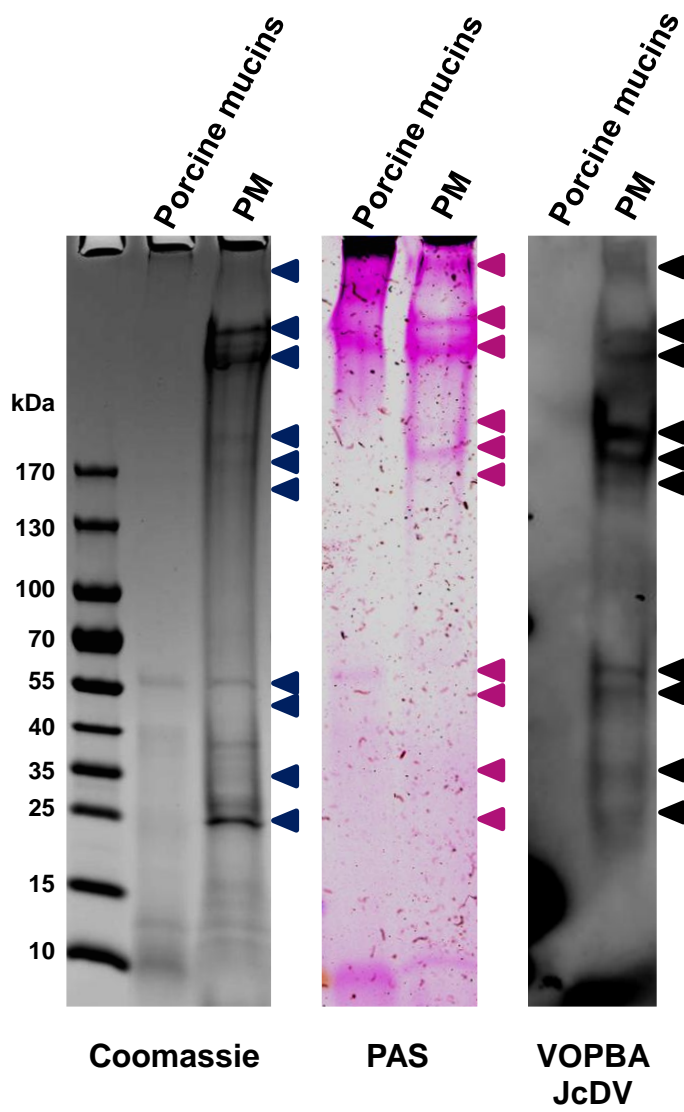
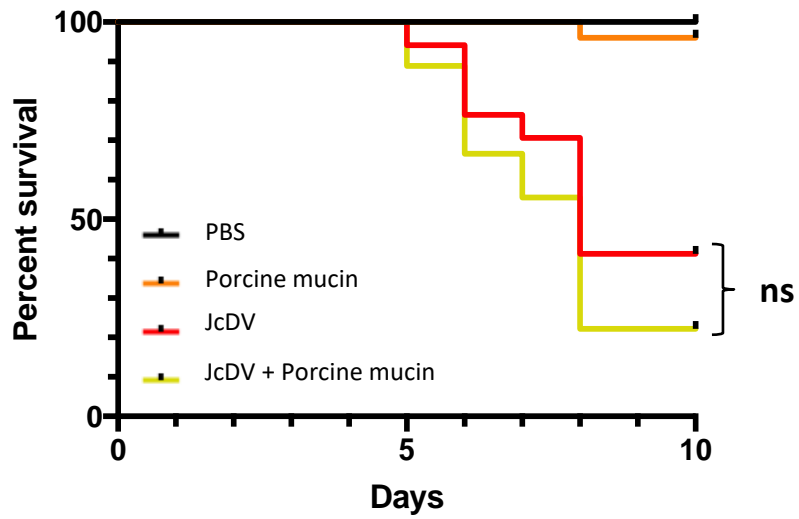
A

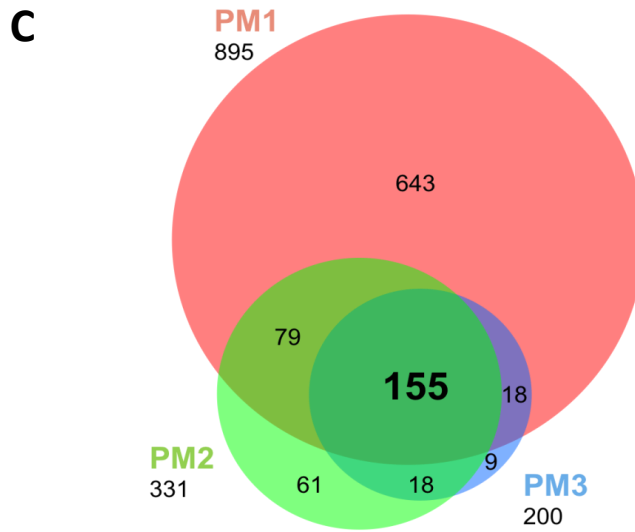


Pairwise comparison	Log-rank (Mantel-Cox)	Gehan-Breslow-Wilcoxon
JcDV + GlcNAc vs JcDV	P value = 0.0024 **	P value = 0,0003 ***
JcDV + GalNAc vs JcDV	P value = 0.0159 *	P value = 0.0075 **
JcDV + Fucose vs JcDV	P value = 0.0131 *	P value = 0.002 **
JcDV + Mannose vs JcDV	P value = 0.0179 *	P value = 0.0038 **

Figure 4

B**C****Figure 4**

A**B****Figure 5**



D

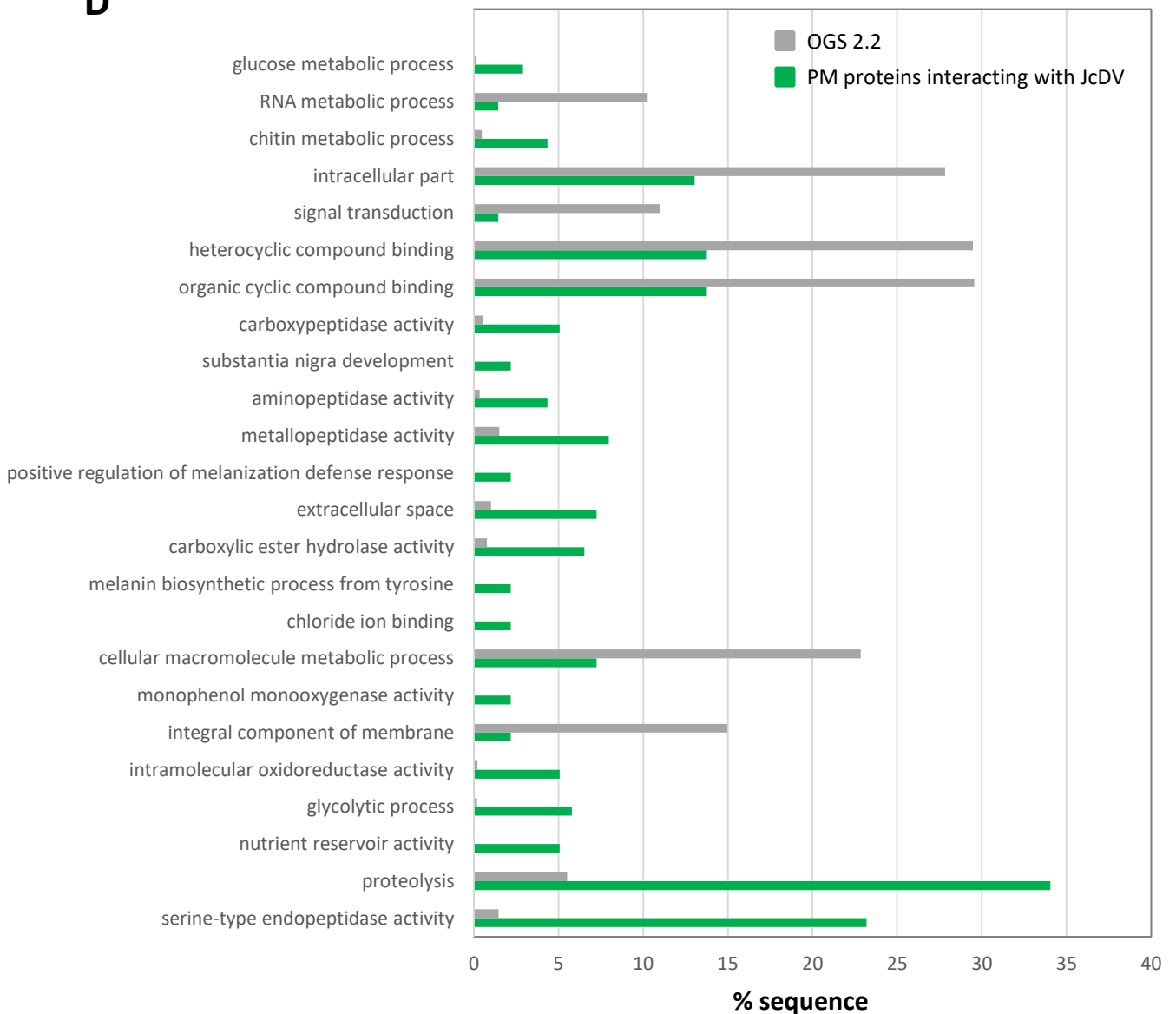
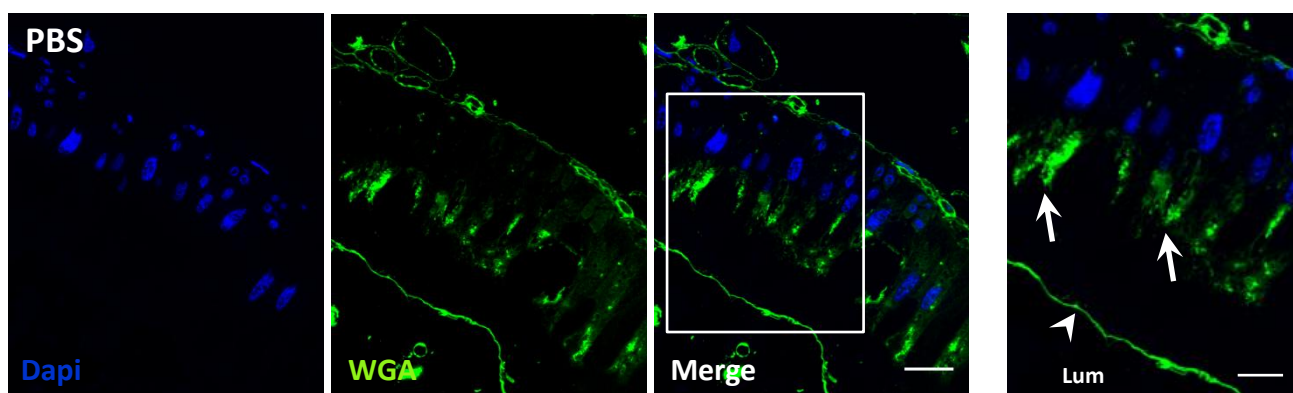


Figure 5

A



B

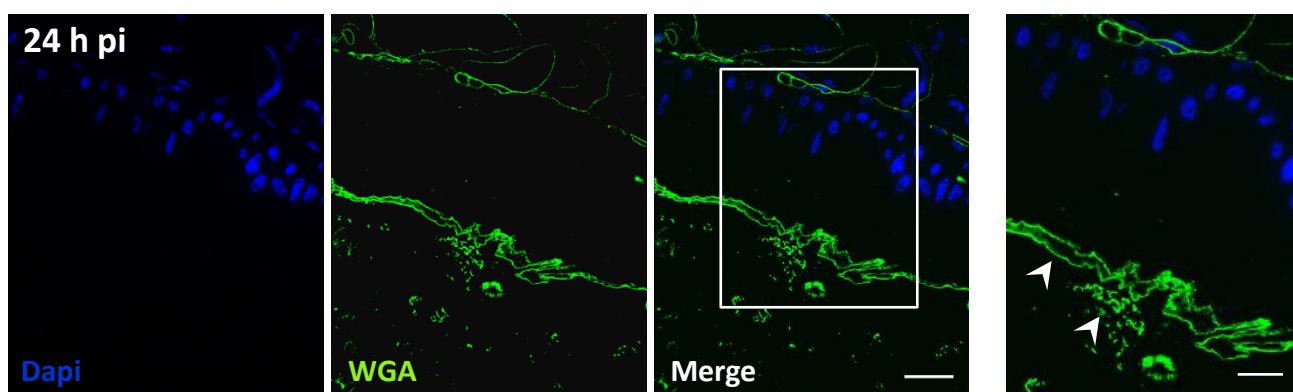
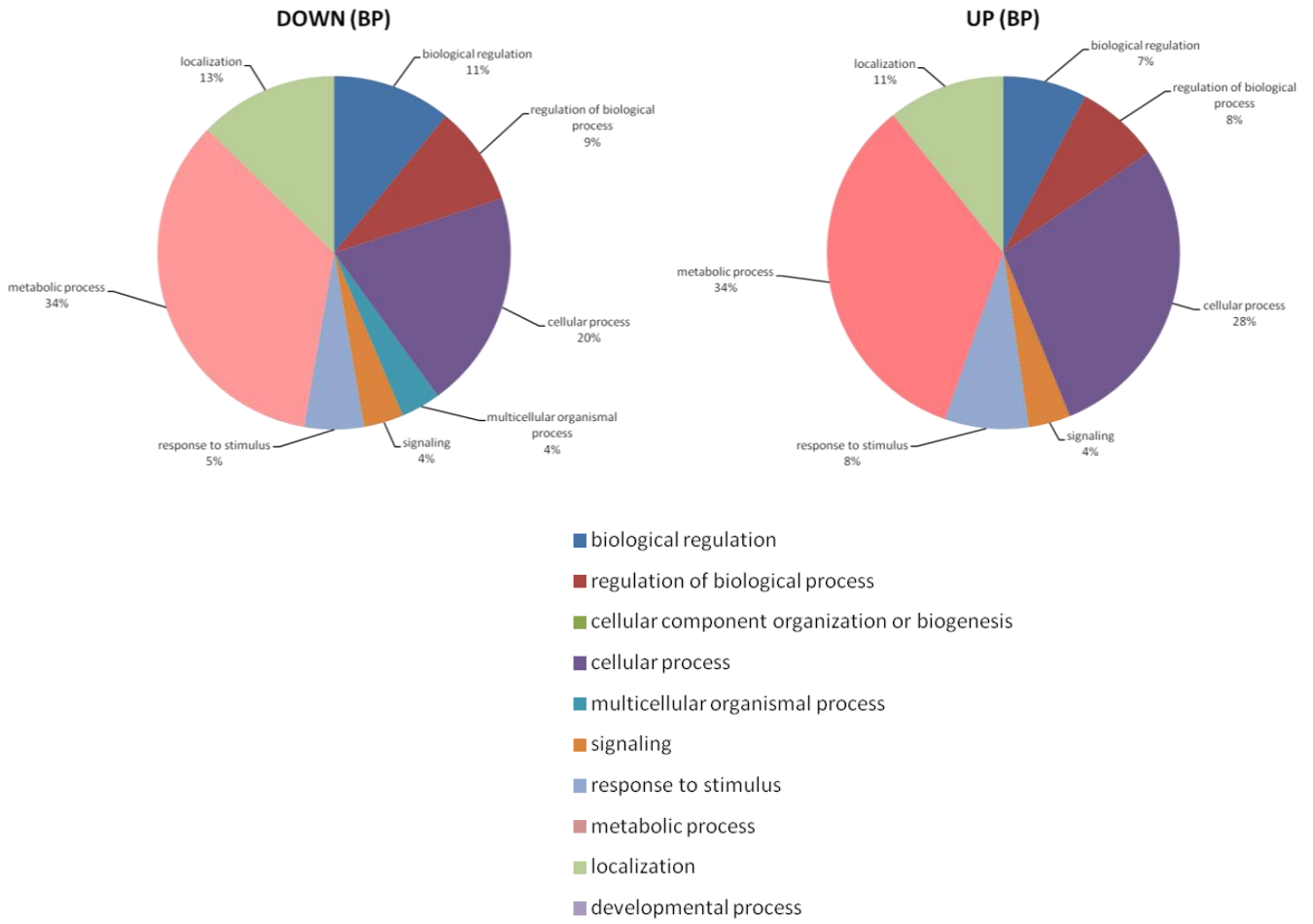


Figure 6

A

DAY 1 (Biological process)



DAY 3 (Biological process)

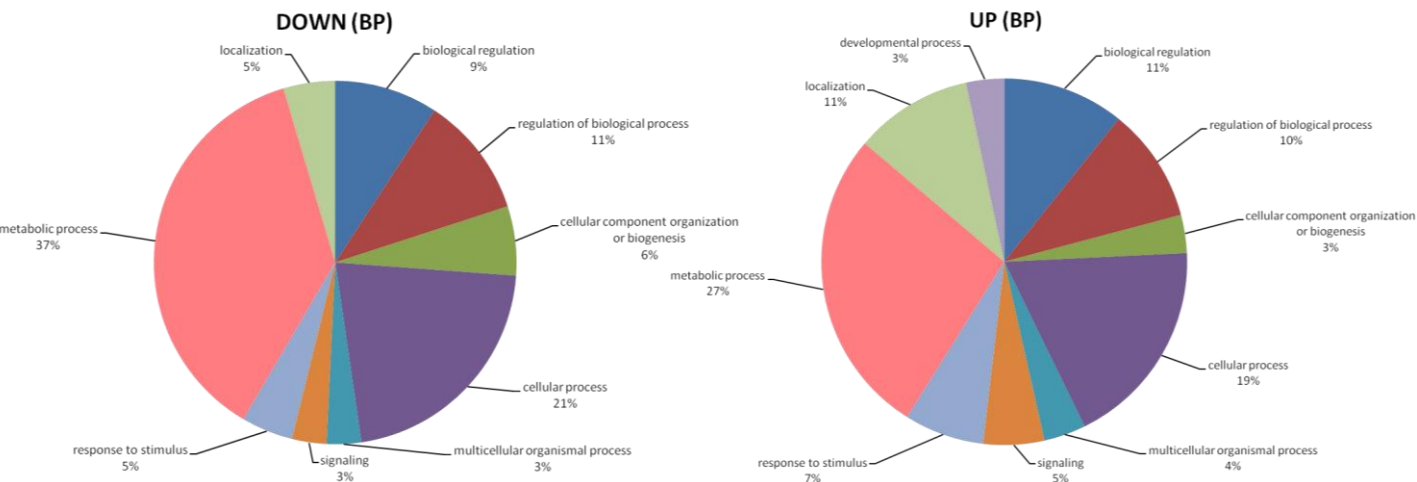
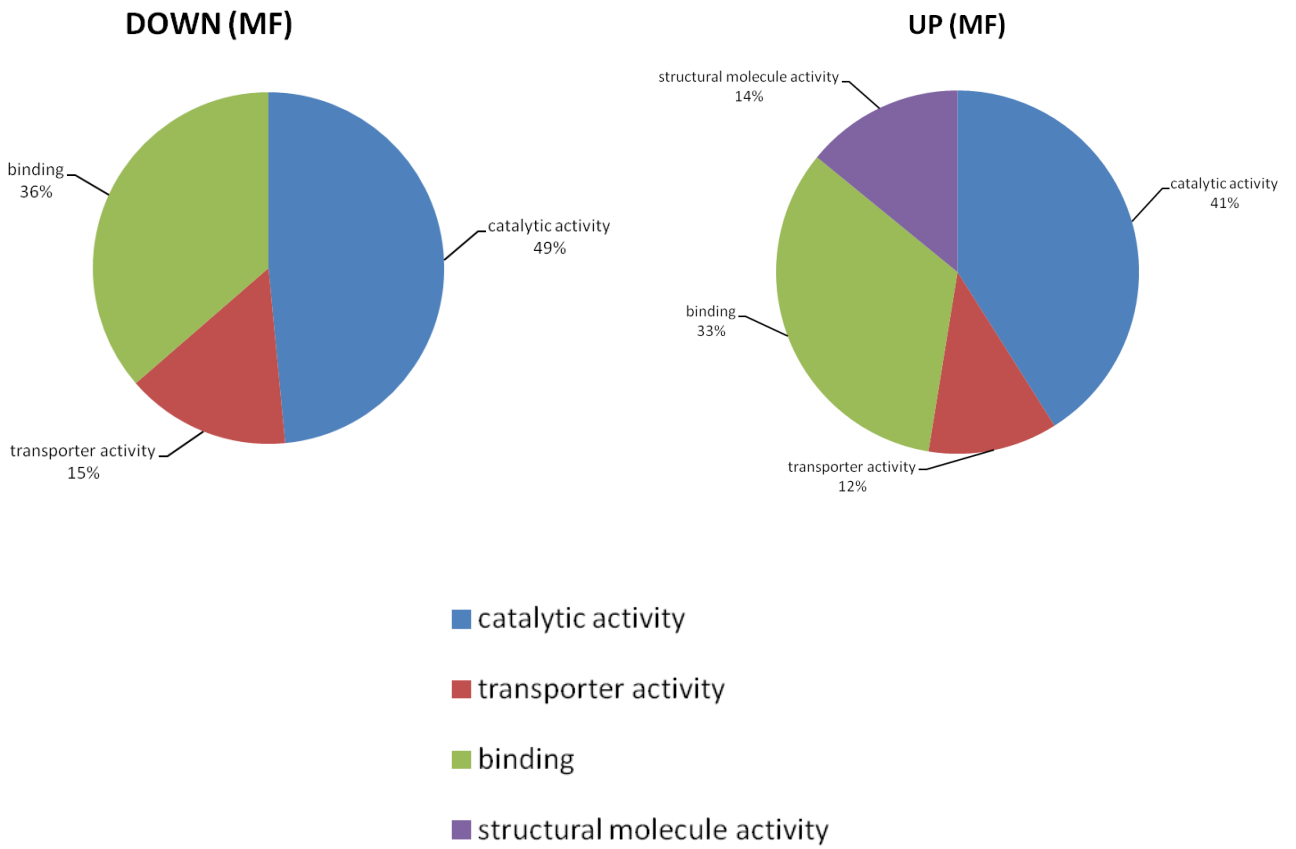


Figure 7

B

DAY 1 (Molecular function)



DAY 3 (Molecular function)

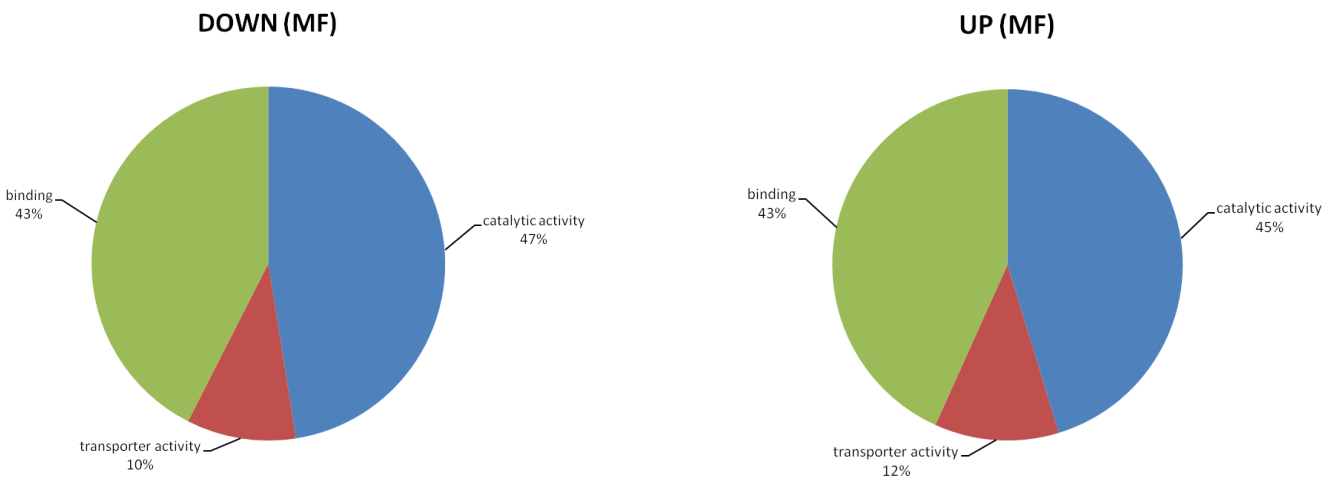


Figure 7

C

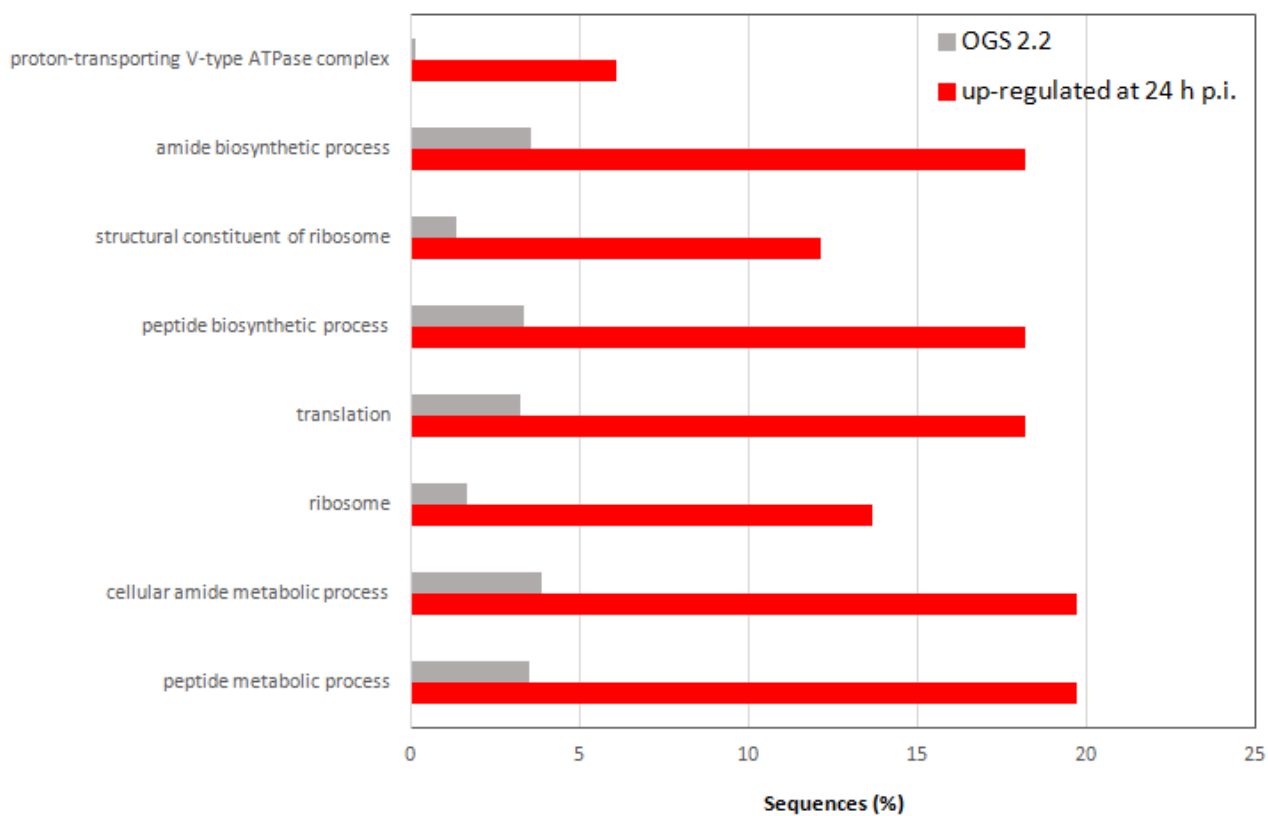


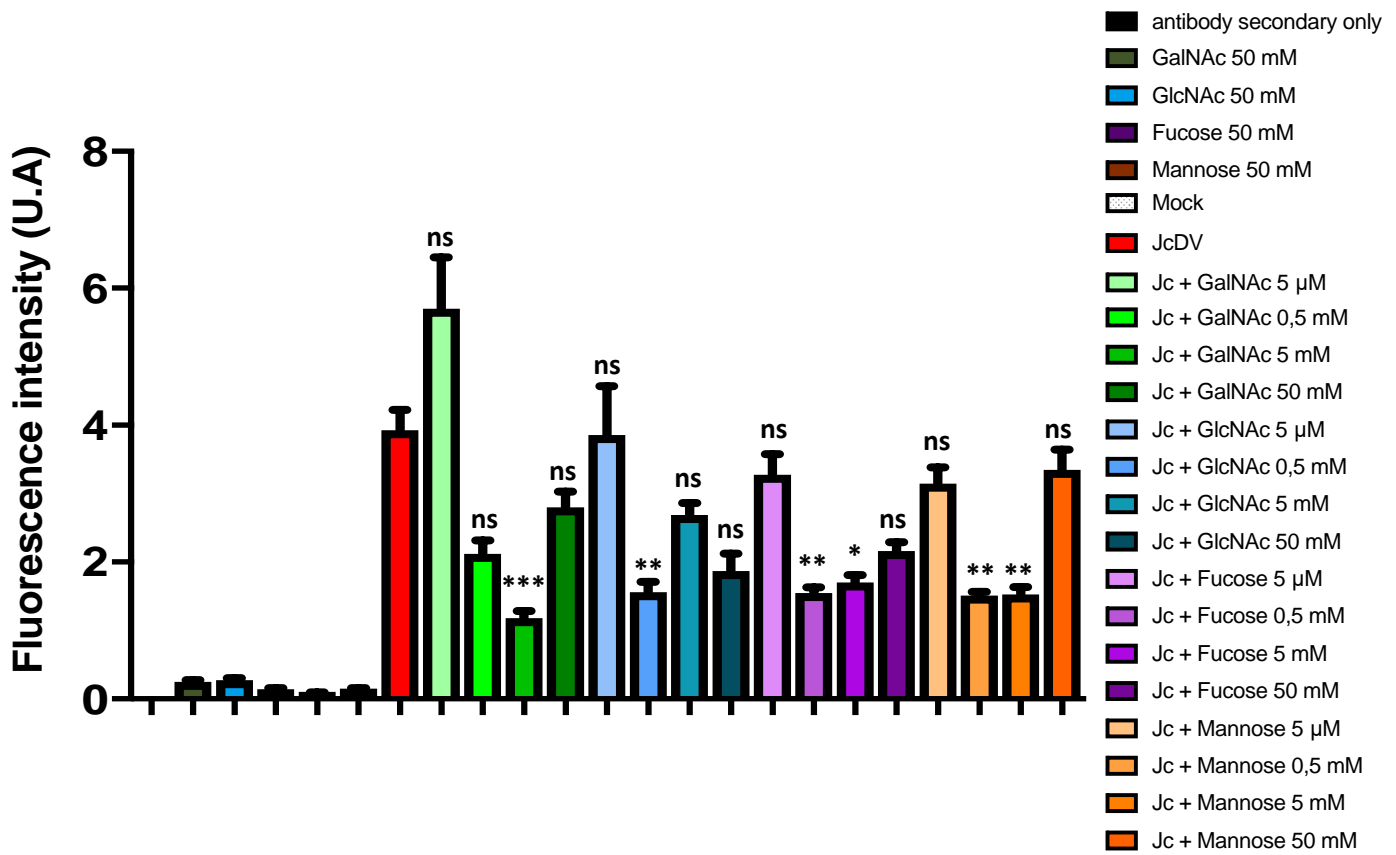
Figure 7

Table 1 : Characteristics of DGE libraries generated from caterpillars orally infected with JcDV

DGE libraries	Sequenced Tags
Day 1 Mock	605378
Day 1 JcDV	1753522
Day 3 Mock	640390
Day 3 JcDV	638945

Table 2 : Characteristics of annotated Tags and transcripts

	Day 1 (Mock/JcDV)	Day 3 (Mock/JcDV)
Unique Tags (p-value<0.001)	8586	6317
Annotated Tags	4649	3341
Tags differentially represented between libraries (fold change ≥ 5)	190	196
Up-represented transcripts in JcDV condition	66	130
Down-represented transcripts in JcDV condition	28	32



Supplementary Figure 1

Supplementary Table 1 : Annotation of PM proteins interacting with JcDV in VOPBA

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00020857001.3-PA	14-3-3 protein epsilon isoform x1	41	P:GO:0000075; P:GO:0000086; P:GO:0001764; P:GO:0003064; F:GO:0003723; F:GO:0004497; C:GO:0005739; C:GO:0005829; C:GO:0005871; C:GO:0005925; P:GO:0006367; P:GO:0006605; P:GO:0007264; F:GO:0015459; P:GO:0016032; F:GO:0019904; P:GO:0021762; P:GO:0021766; P:GO:0021987; F:GO:0023026; C:GO:0030424; C:GO:0030659; F:GO:0031625; P:GO:0035329; C:GO:0042470; F:GO:0042826; P:GO:0043281; F:GO:0044325; F:GO:0046982; P:GO:0048011; F:GO:0050815; P:GO:0055114; P:GO:0060306; C:GO:0070062; P:GO:0086013; P:GO:0086091; P:GO:0097193; P:GO:1900034; P:GO:1900740; P:GO:1901016; P:GO:1902309	P:cell cycle checkpoint; P:G2/M transition of mitotic cell cycle; P:neuron migration; P:regulation of heart rate by hormone; F:RNA binding; F:monoxygenase activity; C:mitochondrion; C:cytosol; C:kinesin complex; C:focal adhesion; P:transcription initiation from RNA polymerase II promoter; P:protein targeting; P:small GTPase mediated signal transduction; F:potassium channel regulator activity; P:protein domain specific binding; P:substantia nigra development; P:hippocampus development; P:cerebral cortex development; F:MHC class II protein complex binding; C:axon; C:cytoplasmic vesicle membrane; F:ubiquitin protein ligase binding; P:hippo signaling; C:melanosome; F:histone deacetylase binding; P:regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process; F:ion channel binding; F:protein heterodimerization activity; P:neurotrophin TRK receptor signaling pathway; F:phosphoserine residue binding; P:oxidation-reduction process; P:regulation of membrane repolarization; C:extracellular exosome; P:membrane repolarization during cardiac muscle cell action potential; P:regulation of heart rate by cardiac conduction; P:intrinsic apoptotic signaling pathway; P:regulation of cellular response to heat; P:positive regulation of protein insertion into mitochondrial membrane involved in apoptotic signaling pathway; P:regulation of potassium ion transmembrane transporter activity; P:negative regulation of peptidyl-serine dephosphorylation
GSSPFG00022879001-PA	14-3-3 protein zeta isoform x1	2	C:GO:0005737; F:GO:0019904	C:cytoplasm; F:protein domain specific binding
GSSPFG00016664001.1-PA	af361483_1chymotrypsin inhibitor ci-8a	3	C:GO:0005615; P:GO:0010466; F:GO:0030414	C:extracellular space; P:negative regulation of peptidase activity; F:peptidase inhibitor activity
GSSPFG00012908001.3-PA	alkaline a-like	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00019582001.4-PA	alkaline nuclease	4	F:GO:0003676; P:GO:0008152; F:GO:0016787; F:GO:0046872	F:nucleic acid binding; P:metabolic process; F:hydrolase activity; F:metal ion binding
GSSPFG00004452001-PA	alpha amylase	3	P:GO:0005975; F:GO:0016787; F:GO:0043169	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity; F:cation binding
GSSPFG00027172001.1-PA	alpha-amylase 2	8	F:GO:0004556; P:GO:0005975; P:GO:0006567; F:GO:0008890; P:GO:0009058; F:GO:0016874; F:GO:0030170; F:GO:0043169	F:alpha-amylase activity; P:carbohydrate metabolic process; P:threonine catabolic process; F:glycine C-acetyltransferase activity; P:biosynthetic process; F:ligase activity; F:pyridoxal phosphate binding; F:cation binding
GSSPFG00000424001-PA	alpha-amylase 4n-like	3	F:GO:0004556; P:GO:0005975; F:GO:0043169	F:alpha-amylase activity; P:carbohydrate metabolic process; F:cation binding
GSSPFG00025752001.1-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00004595001-PA	aminopeptidase n	2	F:GO:0046872; F:GO:0070011	F:metal ion binding; F:peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
GSSPFG00026992001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00019131001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00002605001-PA	aminopeptidase n1	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00002604001-PA	aminopeptidase n4	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00006479001.1-PA	aminopeptidase n5	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00027324001-PA	anhydro-d-fructose reductase-like isoform x3	2	F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00022331001.1-PA	apolipoporphins	7	F:GO:0005488; P:GO:0006810; P:GO:0009987; P:GO:0033036; C:GO:0044464; P:GO:0051179; P:GO:0065007	F:binding; P:transport; P:cellular process; P:macromolecule localization; C:cell part; P:localization; P:biological regulation
GSSPFG00013898001-PA	apolipoporphins	7	F:GO:0005488; P:GO:0006810; P:GO:0009987; P:GO:0033036; C:GO:0044464; P:GO:0051179; P:GO:0065007	F:binding; P:transport; P:cellular process; P:macromolecule localization; C:cell part; P:localization; P:biological regulation
GSSPFG00000973001-PA	apolipoprotein d-like protein	2	C:GO:0005576; F:GO:0031409	C:extracellular region; F:pigment binding
GSSPFG00020046001-PA	arginine kinase	3	F:GO:0004054; F:GO:0005524; P:GO:0016310	F:arginine kinase activity; F:ATP binding; P:phosphorylation
GSSPFG00017029001-PA	arylphorin precursor	2	C:GO:0005615; F:GO:0045735	C:extracellular space; F:nutrient reservoir activity
GSSPFG00017028001-PA	arylphorin precursor	2	C:GO:0005615; F:GO:0045735	C:extracellular space; F:nutrient reservoir activity
GSSPFG00017030001-PA	arylphorin subunit alpha	2	C:GO:0005615; F:GO:0045735	C:extracellular space; F:nutrient reservoir activity
GSSPFG00017555001.4-PA	atp-binding cassette sub-family a member 5-like isoform x1	6	F:GO:0005215; F:GO:0005524; P:GO:0006810; P:GO:0008152; C:GO:0016021; F:GO:0016887	F:transporter activity; F:ATP binding; P:transport; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:ATPase activity
GSSPFG00031214001-PA	beta- partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsolete MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00026444001-PA	beta- partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsolete MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00017294001-PA	beta-glucanase	2	F:GO:0004553; P:GO:0005975	F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P:carbohydrate metabolic process
GSSPFG00002042001.2-PA	beta-glucanase	2	F:GO:0004553; P:GO:0005975	F:hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds; P:carbohydrate metabolic process
GSSPFG00017301001.1-PA	carboxypeptidase b precursor	3	F:GO:0004181; P:GO:0006508; F:GO:0008270	F:metallocarboxypeptidase activity; P:proteolysis; F:zinc ion binding

GSSPFG00002079001-PA	muscle	6	F:GO:0004452; F:GO:0005524; C:GO:0005737; C:GO:0005856; P:GO:0008299; F:GO:0016787	F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity; F:ATP binding; C:cytoplasm; C:cytoskeleton; P:isoprenoid biosynthetic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00030827001-PA	myosin-ib isoform x2	1	F:GO:0000166	F:nucleotide binding
GSSPFG00005110001-PA	neutral lipase	3	F:GO:0004806; C:GO:0005576; P:GO:0008152	F:triglyceride lipase activity; C:extracellular region; P:metabolic process
GSSPFG00005485001.1-PA	neutral lipase	3	F:GO:0004806; C:GO:0005576; P:GO:0008152	F:triglyceride lipase activity; C:extracellular region; P:metabolic process
GSSPFG00006266001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00024193001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00009950001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00005109001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00003910001-PA	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 5	3	P:GO:0000413; F:GO:0003755; P:GO:0006457	P:protein peptidyl-prolyl isomerization; F:peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity; P:protein folding
GSSPFG00031847001-PA	peritrophic matrix insect intestinal mucin	3	C:GO:0005576; P:GO:0006030; F:GO:0008061	C:extracellular region; P:chitin metabolic process; F:chitin binding
GSSPFG00013728001-PA	peritrophic membrane chitin binding protein	3	P:GO:0005975; P:GO:0016810; F:GO:0051060	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds; F:pullulanase activity
GSSPFG00016558001.1-PA	peritrophic membrane chitin binding protein	3	P:GO:0005975; F:GO:0016810; F:GO:0051060	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds; F:pullulanase activity
GSSPFG00015718001.1-PA	polycomb protein suz12-b isoform x1	4	F:GO:0003756; C:GO:0005783; P:GO:0006457; P:GO:0045454	F:protein disulfide isomerase activity; C:endoplasmic reticulum; P:protein folding; P:cell redox homeostasis
GSSPFG00021013001.3-PA	prophenoloxidase subunit 1	7	F:GO:0004503; F:GO:0005507; C:GO:0005576; P:GO:0006583; F:GO:0031404; P:GO:0035008; P:GO:0055114	F:monophenol monooxygenase activity; F:copper ion binding; C:extracellular region; P:melanin biosynthetic process from tyrosine; F:chloride ion binding; P:positive regulation of melanization defense response; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00012369001-PA	prophenoloxidase subunit 1	7	F:GO:0004503; F:GO:0005507; C:GO:0005576; P:GO:0006583; F:GO:0031404; P:GO:0035008; P:GO:0055114	F:monophenol monooxygenase activity; F:copper ion binding; C:extracellular region; P:melanin biosynthetic process from tyrosine; F:chloride ion binding; P:positive regulation of melanization defense response; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00013976001.3-PA	prophenoloxidase subunit 2	7	F:GO:0004503; F:GO:0005507; C:GO:0005576; P:GO:0006583; F:GO:0031404; P:GO:0035008; P:GO:0055114	F:monophenol monooxygenase activity; F:copper ion binding; C:extracellular region; P:melanin biosynthetic process from tyrosine; F:chloride ion binding; P:positive regulation of melanization defense response; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00034655001.1-PA	protein disulfide-isomerase	4	F:GO:0003756; C:GO:0005783; P:GO:0006457; P:GO:0045454	F:protein disulfide isomerase activity; C:endoplasmic reticulum; P:protein folding; P:cell redox homeostasis
GSSPFG00003602001.1-PA	protein disulfide-isomerase	4	F:GO:0003756; C:GO:0005783; P:GO:0006457; P:GO:0045454	F:protein disulfide isomerase activity; C:endoplasmic reticulum; P:protein folding; P:cell redox homeostasis
GSSPFG00025002001-PA	pyruvate kinase	5	F:GO:0000287; F:GO:0004743; P:GO:0006096; F:GO:0016301; F:GO:0030955	F:magnesium ion binding; F:pyruvate kinase activity; P:glycolytic process; F:kinase activity; F:potassium ion binding
GSSPFG00021735001.1-PA	pyruvate kinase-like isoform x1	5	F:GO:0000287; F:GO:0004743; P:GO:0006096; F:GO:0016301; F:GO:0030955	F:magnesium ion binding; F:pyruvate kinase activity; P:glycolytic process; F:kinase activity; F:potassium ion binding
GSSPFG00009143001-PA	retinal dehydrogenase 1	4	F:GO:0001758; F:GO:0004028; F:GO:0018479; P:GO:0055114	F:retinal dehydrogenase activity; F:3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase activity; F:benzaldehyde dehydrogenase (NAD+) activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00035967001.2-PA	serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00002248001.3-PA	serine protease 11	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00020781001.3-PA	serine protease 11	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00000365001.3-PA	serine protease 2	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG000033017001.3-PA	serine protease 33	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG000028610001.3-PA	serine protease 33	1	F:GO:0008236	F:serine-type peptidase activity
GSSPFG000033041001.2-PA	serine protease 38	1	F:GO:0008233	F:peptidase activity
GSSPFG000025116001.3-PA	serine protease 40	2	F:GO:0005515; F:GO:0008236	F:protein binding; F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00014594001.3-PA	serine protease 40	3	F:GO:0004252; P:GO:0005515; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; F:protein binding; P:proteolysis
GSSPFG00028801001-PA	serine protease snake-like	1	F:GO:0016787	F:hydrolase activity
GSSPFG00009353001-PA	serine protease snake-like	1	F:GO:0008233	F:peptidase activity
GSSPFG00012894001-PA	serpin 1	4	C:GO:0005615; F:GO:0008233; P:GO:0010466; F:GO:0030414	C:extracellular space; F:peptidase activity; P:negative regulation of peptidase activity; F:peptidase inhibitor activity
GSSPFG00027555001-PA	thymus-specific serine protease	3	F:GO:0004180; P:GO:0006508; F:GO:0008236	F:carboxypeptidase activity; P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00018186001.2-PA	triosephosphate isomerase	8	F:GO:0003735; F:GO:0004807; C:GO:0005840; P:GO:0006094; P:GO:0006096; P:GO:0006098; P:GO:0006412; F:GO:0019843	F:structural constituent of ribosome; F:triose-phosphate isomerase activity; C:ribosome; P:gluconeogenesis; P:glycolytic process; P:pentose-phosphate shunt; P:translation; F:rRNA binding
GSSPFG00018186001.2-PB	triosephosphate isomerase	8	F:GO:0003735; F:GO:0004807; C:GO:0005840; P:GO:0006094; P:GO:0006096; P:GO:0006098; P:GO:0006412; F:GO:0019843	F:structural constituent of ribosome; F:triose-phosphate isomerase activity; C:ribosome; P:gluconeogenesis; P:glycolytic process; P:pentose-phosphate shunt; P:translation; F:rRNA binding
GSSPFG00001201001.2-PA	trypsin ia2	1	F:GO:0008236	F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00035969001.2-PA	trypsin ia2	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00034101001.3-PA	trypsin precursor 9	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00005080001.4-PA	trypsin precursor 9	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG000019625001.2-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00012657001.3-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00007297001.3-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00032515001.3-PA	trypsin-like protease	1	F:GO:0016787	F:hydrolase activity
GSSPFG00021205001.4-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00013283001.6-PB	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00013282001.6-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00012077001.4-PA	trypsin-like serine partial	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00028489001.5-PB	trypsin-like serine proteinase t26	3	F:GO:0004252; F:GO:0005515; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; F:protein binding; P:proteolysis
GSSPFG00028708001.1-PA	uncharacterized protein loc100878113	3	P:GO:0006413; C:GO:0032991; C:GO:0044444	P:translational initiation; C:protein-containing complex; C:cytoplasmic part
GSSPFG00027141001-PA	v-type proton atpase catalytic subunit a	5	F:GO:0005524; P:GO:0015991; C:GO:0033180; P:GO:0046034; F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG00034314001-PA	xaa-pro aminopeptidase 1	2	P:GO:0008152; F:GO:0016787	P:metabolic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00018804001.1-PA	zinc carboxypeptidase-like	1	F:GO:0004180	F:carboxypeptidase activity
GSSPFG00017650001-PA	zinc carboxypeptidase-like	2	F:GO:0004180; F:GO:0046872	F:carboxypeptidase activity; F:metal ion binding

Supplementary Table 2A : Annotation of up-regulated intestinal transcripts at 1 day p.i.

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00022879001-PA	14-3-3 protein zeta isoform x1	2	C:GO:0005737; F:GO:0019904	C:cytoplasm; F:protein domain specific binding
GSSPFG00006068001-PA	40s ribosomal protein s11	3	F:GO:0003735; C:GO:0005840; P:GO:0006412	F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; P:translation
GSSPFG00003276001-PA	40s ribosomal protein s14	3	F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0022627	F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:cytosolic small ribosomal subunit
GSSPFG00019839001-PA	40s ribosomal protein s23	4	F:GO:0003677; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015935	F:DNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:small ribosomal subunit
GSSPFG00014527001-PA	60s ribosomal protein l10a	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015934	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:large ribosomal subunit
GSSPFG00007050001-PA	60s ribosomal protein l10a	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015934	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:large ribosomal subunit
GSSPFG00012069001.3-PA	actin-related protein 3	21	F:GO:0003779; F:GO:0005200; F:GO:0005524; C:GO:0005884; C:GO:0005885; P:GO:0006886; P:GO:0006909; P:GO:0007413; P:GO:0007520; P:GO:0010592; P:GO:0022416; C:GO:0030027; P:GO:0030037; P:GO:0030589; P:GO:0030713; P:GO:0034314; P:GO:0045747; P:GO:0045887; P:GO:0051491; P:GO:0072553; P:GO:0097320	F:actin binding; F:structural constituent of cytoskeleton; F:ATP binding; C:actin filament; C:Arp2/3 protein complex; P:intracellular protein transport; P:phagocytosis; P:axonal fasciculation; P:myoblast fusion; P:positive regulation of lamellipodium assembly; P:chabeta development; C:lamellipodium; P:actin filament reorganization involved in cell cycle; P:pseudocleavage involved in syncytial blastoderm formation; P:ovarian follicle cell stalk formation; P:Arp2/3 complex-mediated actin nucleation; P:positive regulation of Notch signaling pathway; P:positive regulation of synaptic growth at neuromuscular junction; P:positive regulation of filopodium assembly; P:terminal button organization; P:plasma membrane tubulation
GSSPFG00014383001-PA	aldo-keto reductase	2	F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00004769001-PA	cadherin-87a	2	P:GO:0007155; C:GO:0016020	P:cell adhesion; C:membrane
GSSPFG00002450001-PA	carboxylesterase	2	P:GO:0008152; F:GO:0016787	P:metabolic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00030094001-PA	carboxypeptidase b-like	1	F:GO:0004180	F:carboxypeptidase activity
GSSPFG00006714001-PA	catalase	13	F:GO:0004096; F:GO:0005515; P:GO:0006979; P:GO:0009987; F:GO:0020037; C:GO:0043231; P:GO:0044238; P:GO:0044260; C:GO:0044444; F:GO:0046872; P:GO:0050794; P:GO:0055114; P:GO:1901360	F:catalase activity; F:protein binding; P:response to oxidative stress; P:cellular process; F:heme binding; C:intracellular membrane-bounded organelle; P:primary metabolic process; P:cellular macromolecule metabolic process; C:cytoplasmic part; F:metal ion binding; P:regulation of cellular process; P:oxidation-reduction process; P:organic cyclic compound metabolic process
GSSPFG00030477001.4-PA	catalase	29	F:GO:0000981; F:GO:0001158; P:GO:0003007; F:GO:0004096; F:GO:0004102; C:GO:0005634; C:GO:0005777; C:GO:0005891; P:GO:0007274; P:GO:0007517; P:GO:0008292; F:GO:0008332; P:GO:0008340; P:GO:0016339; F:GO:0020037; P:GO:0035206; P:GO:0038001; P:GO:0042542; P:GO:0042673; P:GO:0042682; P:GO:0042744; P:GO:0045471; P:GO:0045676; P:GO:0045944; F:GO:0046872; P:GO:0048813; P:GO:0055114; P:GO:0070509; P:GO:0070588	F:DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific; F:enhancer sequence-specific DNA binding; P:heart morphogenesis; F:catalase activity; F:choline O-acetyltransferase activity; C:nucleus; C:peroxisome; C:voltage-gated calcium channel complex; P:neuromuscular synaptic transmission; P:muscle organ development; P:acetylcholine biosynthetic process; F:low voltage-gated calcium channel activity; P:determination of adult lifespan; P:calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules; F:heme binding; P:regulation of hemocyte proliferation; P:paracrine signaling; P:response to hydrogen peroxide; P:regulation of retinal cone cell fate specification; P:regulation of compound eye cone cell fate specification; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:response to ethanol; P:regulation of R7 cell differentiation; P:positive regulation of transcription by RNA polymerase II; F:metal ion binding; P:dendrite morphogenesis; P:oxidation-reduction process; P:calcium ion import; P:calcium ion transmembrane transport
GSSPFG00006818001.1-PA	cd63 antigen	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00004358001-PA	cell cycle checkpoint control protein rad9a	3	P:GO:0000077; P:GO:0006281; C:GO:0030896	P:DNA damage checkpoint; P:DNA repair; C:checkpoint clamp complex
GSSPFG00008227001.3-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00030121001.3-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00034359001.3-PA	chymotrypsin-like serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00003632001-PA	complement component 1 q subcomponent-binding mitochondrial	1	C:GO:0005759	C:mitochondrial matrix
GSSPFG00022978001.3-PA	cysteine protease atg4d isoform x2	5	C:GO:0005737; P:GO:0006508; P:GO:0006914; F:GO:0008234; P:GO:0015031	C:cytoplasm; P:proteolysis; P:autophagy; F:cysteine-type peptidase activity; P:protein transport
GSSPFG00019339001-PA	delta-aminolevulinic acid dehydratase isoform x2	4	F:GO:0004655; F:GO:0005524; P:GO:0006779; F:GO:0046872	F:porphobilinogen synthase activity; F:ATP binding; P:porphyrin-containing compound biosynthetic process; F:metal ion binding
GSSPFG00009074001-PA	deoxycytidylate deaminase	4	F:GO:0004132; P:GO:0009117; F:GO:0046872; C:GO:0070062	F:dCMP deaminase activity; P:nucleotide metabolic process; F:metal ion binding; C:extracellular exosome
GSSPFG00020627001-PA	dj-1 beta	5	P:GO:0008344; P:GO:0042775; P:GO:0046626; P:GO:0048640; P:GO:0070301	P:adult locomotory behavior; P:mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport; P:regulation of insulin receptor signaling pathway; P:negative regulation of developmental growth; P:cellular response to hydrogen peroxide
GSSPFG00025486001.2-PA	dna (cytosine-5)-methyltransferase-like isoform x1	6	F:GO:0003677; F:GO:0003682; F:GO:0003886; C:GO:0005634; F:GO:0008270; P:GO:0090116	F:DNA binding; F:chromatin binding; F:DNA (cytosine-5-)methyltransferase activity; C:nucleus; F:zinc ion binding; P:C-5 methylation of cytosine
GSSPFG00005701001-PA	dopamine n-acetyltransferase-like	2	F:GO:0008080; P:GO:0008152	F:N-acetyltransferase activity; P:metabolic process
GSSPFG00033485001-PA	elongation factor 1 delta	3	F:GO:0003746; C:GO:0005853; P:GO:0006414	F:translation elongation factor activity; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; P:translational elongation
GSSPFG00022059001-PA	glucosamine-6-phosphate isomerase-like isoform x1	7	F:GO:0004342; C:GO:0005737; P:GO:0005975; P:GO:0006043; P:GO:0006044; P:GO:0006091; F:GO:0016787	F:glucosamine-6-phosphate deaminase activity; C:cytoplasm; P:carbohydrate metabolic process; P:glucosamine catabolic process; P:N-acetylglucosamine metabolic process; P:generation of precursor metabolites and energy; F:hydrolase activity
GSSPFG00009170001.5-PA	glutathione s-transferase theta-1-like	2	F:GO:0004364; P:GO:0008152	F:glutathione transferase activity; P:metabolic process
GSSPFG00007670001-PA	growth arrest and dna damage-inducible protein gadd45 alpha-like	3	C:GO:0005634; P:GO:0006950; P:GO:0051726	C:nucleus; P:response to stress; P:regulation of cell cycle
GSSPFG00021491001.3-PA	growth hormone-inducible transmembrane	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00002254001-PA	haspin-like protein	3	F:GO:0004672; F:GO:0005524; P:GO:0006468	F:protein kinase activity; F:ATP binding; P:protein phosphorylation
GSSPFG00004200001.1-PA	hatching enzyme-like protein	3	F:GO:0004222; P:GO:0006508; F:GO:0008270	F:metalloendopeptidase activity; P:proteolysis; F:zinc ion binding
GSSPFG00015955001.3-PA	heat shock protein	1	F:GO:0005212	F:structural constituent of eye lens
GSSPFG00026171001-PA	high affinity copper uptake protein 1 isoform x2	3	F:GO:0005375; C:GO:0016021; P:GO:0035434	F:copper ion transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane; P:copper ion transmembrane transport

GSSPFG00028706001-PA	histone	4	C:GO:0000786; F:GO:0003677; C:GO:0005634; F:GO:0046982	C:nucleosome; F:DNA binding; C:nucleus; F:protein heterodimerization activity
GSSPFG00031885001-PA	ischemia reperfusion inducible protein	4	F:GO:0003725; P:GO:0006412; F:GO:0016740; F:GO:0045182	F:double-stranded RNA binding; P:translation; F:transferase activity; F:translation regulator activity
GSSPFG00009739001.1-PA	leukocyte receptor cluster member 4 protein	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00009826001-PA	map kinase-interacting serine threonine-protein kinase 1	11	F:GO:0004674; F:GO:0005524; C:GO:0005635; C:GO:0005813; C:GO:0005829; C:GO:0005874; P:GO:0006468; P:GO:0007017; P:GO:0040008; P:GO:0046580; F:GO:0051019	F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; C:nuclear envelope; C:centrosome; C:cytosol; C:microtubule; P:protein phosphorylation; P:microtubule-based process; P:regulation of growth; P:negative regulation of Ras protein signal transduction; F:mitogen-activated protein kinase binding
GSSPFG00011895001-PA	mitochondrial dicarboxylate carrier	2	P:GO:0006810; C:GO:0016021	P:transport; C:integral component of membrane
GSSPFG00001220001-PA	organic cation transporter protein isoform x1	3	C:GO:0016021; F:GO:0022857; P:GO:0055085	C:integral component of membrane; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport
GSSPFG00003126001.3-PA	partial	3	F:GO:0003700; P:GO:0006355; F:GO:0043565	F:DNA-binding transcription factor activity; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:sequence-specific DNA binding
GSSPFG00002429001-PA	pleckstrin homology domain-containing family m member 1	3	C:GO:0005622; F:GO:0008270; P:GO:0035556	C:intracellular; F:zinc ion binding; P:intracellular signal transduction
GSSPFG00031628001-PA	probable phosphoserine aminotransferase	2	F:GO:0004648; P:GO:0006564	F:O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; P:L-serine biosynthetic process
GSSPFG00013235001-PA	pyruvate mitochondrial isoform x1	8	F:GO:0003677; F:GO:0004075; F:GO:0004736; F:GO:0005524; P:GO:0006090; P:GO:0006094; F:GO:0009374; F:GO:0046872	F:DNA binding; F:biotin carboxylase activity; F:pyruvate carboxylase activity; F:ATP binding; P:pyruvate metabolic process; P:gluconeogenesis; F:biotin binding; F:metal ion binding
GSSPFG00020427001-PA	ribosomal protein l13	3	F:GO:0003735; C:GO:0005840; P:GO:0006412	F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; P:translation
GSSPFG00024299001-PA	ribosomal protein l18a	3	F:GO:0003735; C:GO:0005840; P:GO:0006412	F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; P:translation
GSSPFG00002705001.1-PA	ribosomal protein s2	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015935	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:small ribosomal subunit
GSSPFG00023951001-PA	serine threonine-protein phosphatase alpha-2 isoform	2	F:GO:0004721; P:GO:0006470	F:phosphoprotein phosphatase activity; P:protein dephosphorylation
GSSPFG00000284001-PA	serine threonine-protein phosphatase rdgc-like	6	F:GO:0004721; F:GO:0005506; F:GO:0005509; P:GO:0006470; F:GO:0030145; P:GO:0050906	F:phosphoprotein phosphatase activity; F:iron ion binding; F:calcium ion binding; P:protein dephosphorylation; F:manganese ion binding; P:detection of stimulus involved in sensory perception
GSSPFG00001324001.1-PA	s-formylglutathione hydrolase	4	C:GO:0005737; F:GO:0018738; C:GO:0043231; P:GO:0046294	C:cytoplasm; F:S-formylglutathione hydrolase activity; C:intracellular membrane-bounded organelle; P:formaldehyde catabolic process
GSSPFG00025156001-PA	signal peptidase complex subunit 3-like	4	C:GO:0005787; P:GO:0006465; F:GO:0008233; C:GO:0016021	C:signal peptidase complex; P:signal peptide processing; F:peptidase activity; C:integral component of membrane
GSSPFG00029082001.6-PA	small heat shock protein	2	F:GO:0005212; C:GO:0005840	F:structural constituent of eye lens; C:ribosome
GSSPFG00010112001-PA	succinyl-ligase	4	F:GO:0005524; P:GO:0008152; F:GO:0016874; F:GO:0046872	F:ATP binding; P:metabolic process; F:ligase activity; F:metal ion binding
GSSPFG00011227001-PA	synaptic vesicle glycoprotein 2b	4	F:GO:0008270; C:GO:0016021; F:GO:0022857; P:GO:0055085	F:zinc ion binding; C:integral component of membrane; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport
GSSPFG00007437001.3-PA	transcription factor kayak isoform x3	3	F:GO:0003700; P:GO:0006357; F:GO:0043565	F:DNA-binding transcription factor activity; P:regulation of transcription by RNA polymerase II; F:sequence-specific DNA binding
GSSPFG00020171001-PA	translocon-associated protein subunit beta	4	C:GO:0005789; F:GO:0008519; C:GO:0016021; P:GO:0072488	C:endoplasmic reticulum membrane; F:ammonium transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane; P:ammonium transmembrane transport
GSSPFG00021205001.4-PA	trypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00028708001.1-PA	uncharacterized protein loc100878113	3	P:GO:0006413; C:GO:0032991; C:GO:0044444	P:translational initiation; C:protein-containing complex; C:cytoplasmic part
GSSPFG00028709001.1-PA	uncharacterized protein loc100878113	3	P:GO:0006413; C:GO:0032991; C:GO:0044444	P:translational initiation; C:protein-containing complex; C:cytoplasmic part
GSSPFG00017701001-PA	vesicle transport protein got1b	2	P:GO:0006457; P:GO:0016192	P:protein folding; P:vesicle-mediated transport
GSSPFG00009357001-PA	vesicle transport protein got1b	2	P:GO:0006457; P:GO:0016192	P:protein folding; P:vesicle-mediated transport
GSSPFG00027141001-PA	v-type proton atpase catalytic subunit a	5	F:GO:0005524; P:GO:0015991; C:GO:0033180; P:GO:0046034; F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG0000066001-PA	v-type proton atpase subunit e 2-like	5	P:GO:0008152; F:GO:0015078; P:GO:0015991; F:GO:0016787; C:GO:0033179	P:metabolic process; F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; F:hydrolase activity; C:proton-transporting V-type ATPase, V0 domain
GSSPFG00002721001-PA	v-type proton atpase subunit e 2-like	5	P:GO:0008152; F:GO:0015078; P:GO:0015991; F:GO:0016787; C:GO:0033179	P:metabolic process; F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; F:hydrolase activity; C:proton-transporting V-type ATPase, V0 domain
GSSPFG00032564001-PA	v-type proton atpase subunit g	5	C:GO:0016324; C:GO:0016471; F:GO:0042626; P:GO:0055085; P:GO:1902600	C:apical plasma membrane; C:vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:transmembrane transport; P:proton transmembrane transport
GSSPFG00017650001-PA	zinc carboxypeptidase-like	2	F:GO:0004180; F:GO:0046872	F:carboxypeptidase activity; F:metal ion binding

Supplementary Table 2B : Annotation of down-regulated intestinal transcripts at 1 day p.i.

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00023569001-PA	acyl-binding protein	1	F:GO:0000062	F:fatty-acyl-CoA binding
GSSPFG00019131001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00016399001.2-PA	d-arabinitol dehydrogenase 1-like	3	F:GO:0008270; F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:zinc ion binding; F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00030737001-PA	e3 ubiquitin-protein ligase siah1-like	7	F:GO:0004842; C:GO:0005634; P:GO:0006511; P:GO:0007275; F:GO:0008270; P:GO:0016567; F:GO:0016874	F:ubiquitin-protein transferase activity; C:nucleus; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; P:multicellular organism development; F:zinc ion binding; P:protein ubiquitination; F:ligase activity
GSSPFG00014785001-PA	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g	8	F:GO:0000166; P:GO:0001731; F:GO:0003743; C:GO:0005852; P:GO:0006446; F:GO:0008270; C:GO:0016282; C:GO:0033290	F:nucleotide binding; P:formation of translation preinitiation complex; F:translation initiation factor activity; C:eukaryotic translation initiation factor 3 complex; P:regulation of translational initiation; F:zinc ion binding; C:eukaryotic 43S preinitiation complex; C:eukaryotic 48S preinitiation complex
GSSPFG00002382001-PA	facilitated trehalose transporter tret1-2 homolog	5	F:GO:0005355; C:GO:0005886; C:GO:0016021; P:GO:0046427; P:GO:0055085	F:glucose transmembrane transporter activity; C:plasma membrane; C:integral component of membrane; P:positive regulation of JAK-STAT cascade; P:transmembrane transport
GSSPFG00034701001-PA	fatty acid binding protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; F:GO:0008289	F:transporter activity; P:transport; F:lipid binding
GSSPFG00034702001-PA	fatty acid binding protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; F:GO:0008289	F:transporter activity; P:transport; F:lipid binding
GSSPFG00026492001.1-PA	glucosylceramidase-like	3	P:GO:0006665; F:GO:0016787; P:GO:0050794	P:sphingolipid metabolic process; F:hydrolase activity; P:regulation of cellular process
GSSPFG00027388001-PA	hydroxyacyl-coenzyme a dehydrogenase	4	F:GO:0003857; F:GO:0004300; P:GO:0006635; C:GO:0016507	F:3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity; F:enoyl-CoA hydratase activity; P:fatty acid beta-oxidation; C:mitochondrial fatty acid beta-oxidation multienzyme complex
GSSPFG00002672001-PA	inorganic pyrophosphatase	4	F:GO:0000287; F:GO:0004427; C:GO:0005737; P:GO:0006796	F:magnesium ion binding; F:inorganic diphosphatase activity; C:cytoplasm; P:phosphate-containing compound metabolic process
GSSPFG00032730001-PA	lipase	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00028977001-PA	nitric oxide synthase	9	F:GO:0004517; F:GO:0005506; F:GO:0005516; P:GO:0006809; F:GO:0010181; F:GO:0020037; F:GO:0050660; F:GO:0050661; P:GO:0055114	F:nitric-oxide synthase activity; F:iron ion binding; F:calmodulin binding; P:nitric oxide biosynthetic process; F:FMN binding; F:heme binding; F:flavin adenine dinucleotide binding; F:NADP binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00019809001-PA	nose resistant to fluoxetine protein 6-like	2	P:GO:0008152; F:GO:0016747	P:metabolic process; F:transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
GSSPFG000005109001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00009950001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00034748001-PA	parathyroid hormone-responsive b1	1	C:GO:0034464	C:BBSome
GSSPFG00009935001.1-PA	protein aatf	1	C:GO:0005634	C:nucleus
GSSPFG00008671001-PA	protein rop isoform x1	2	C:GO:0005623; P:GO:0006904	C:cell; P:vesicle docking involved in exocytosis
GSSPFG00015295001-PA	rna polymerase ii transcriptional coactivator	3	F:GO:0003677; F:GO:0003713; P:GO:0006355	F:DNA binding; F:transcription coactivator activity; P:regulation of transcription, DNA-templated
GSSPFG00018170001-PA	sterol carrier protein 2 3-oxoacyl- thiolase	7	F:GO:0005548; C:GO:0005739; C:GO:0005777; C:GO:0005811; P:GO:0008152; P:GO:0015914; F:GO:0016747	F:phospholipid transporter activity; C:mitochondrion; C:peroxisome; C:lipid droplet; P:metabolic process; P:phospholipid transport; F:transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
GSSPFG00027537001-PA	transmembrane protein 14c	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00010017001-PA	trna pseudouridine synthase mitochondrial-like isoform x1	5	P:GO:0001522; F:GO:0003723; F:GO:0004730; P:GO:0008033; F:GO:0009982	P:pseudouridine synthesis; F:RNA binding; F:pseudouridylylate synthase activity; P:tRNA processing; F:pseudouridine synthase activity
GSSPFG00030048001.3-PA	trypsin-like serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis

GSSPFG00027850001-PA	uncharacterized peptidase c1-like protein isoform x2	6	F:GO:0005044; P:GO:0006508; F:scavenger receptor activity; P:proteolysis; P:receptor-mediated P:GO:0006898; P:GO:0006955; endocytosis; P:immune response; F:cysteine-type peptidase F:GO:0008234; F:GO:0030247 activity; F:polysaccharide binding
GSSPFG00012410001-PA	uncharacterized protein loc101739891	1	C:GO:0016020 C:membrane
GSSPFG00034417001-PA	uv opsin	7	F:GO:0004930; P:GO:0007186; F:G protein-coupled receptor activity; P:G protein-coupled P:GO:0007601; P:GO:0007602; receptor signaling pathway; P:visual perception; F:GO:0009881; C:GO:0016021; P:phototransduction; F:photoreceptor activity; C:integral P:GO:0018298 component of membrane; P:protein-chromophore linkage
GSSPFG00014231001-PA	v-type proton atpase subunit e	4	P:metabolic process; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; P:GO:0008152; P:GO:0015991; C:proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic C:GO:0033178; F:GO:0046961 domain; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism

Supplementary Table 2C : Annotation of up-regulated intestinal transcripts at 3 days p.i.

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00032551001-PA	nad-dependent protein deacylase sirtuin- mitochondrial	11	C:GO:0005758; C:GO:0005759; C:GO:0005829; P:GO:0006476; F:GO:0008270; P:GO:0010566; P:GO:0036047; P:GO:0036049; F:GO:0036054; F:GO:0036055; F:GO:0070403	C:mitochondrial intermembrane space; C:mitochondrial matrix; C:cytosol; P:protein deacetylation; F:zinc ion binding; P:regulation of ketone biosynthetic process; P:peptidyl-lysine demalonylation; P:peptidyl-lysine desuccinylation; F:protein-malonyllysine demalonylase activity; F:protein-succinyllysine desuccinylase activity; F:NAD+ binding
GSSPFG00002850001.3-PA	epithelial membrane protein	6	F:GO:0005044; C:GO:0005764; C:GO:0005887; P:GO:0006952; P:GO:0007155; P:GO:0035071	F:scavenger receptor activity; C:lysosome; C:integral component of plasma membrane; P:defense response; P:cell adhesion; P:salivary gland cell autophagic cell death
GSSPFG00004769001-PA	cadherin-87a	2	P:GO:0007155; C:GO:0016020	P:cell adhesion; C:membrane
GSSPFG00029484001-PA	signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2 isoform	3	F:GO:0005096; P:GO:0043547; P:GO:0051056	F:GTPase activator activity; P:positive regulation of GTPase activity; P:regulation of small GTPase mediated signal transduction
GSSPFG00018308001-PA	septin isoform b	15	P:GO:000281; F:GO:0003746; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005875; C:GO:0005940; P:GO:0006414; P:GO:0007295; P:GO:0007349; P:GO:0007444; P:GO:0022008; C:GO:0031105; F:GO:0042803; C:GO:0045172; P:GO:0051726	P:mitotic cytokinesis; F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:microtubule associated complex; C:septin ring; P:translational elongation; P:growth of a germlarium-derived egg chamber; P:cellularization; P:imaginal disc development; P:neurogenesis; C:septin complex; F:protein homodimerization activity; C:germline ring canal; P:regulation of cell cycle
GSSPFG00006068001-PA	40s ribosomal protein s11	3	F:GO:0003735; C:GO:0005840; P:GO:0006412	F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; P:translation
GSSPFG00008368001-PA	cg3595	29	P:GO:000281; P:GO:0001736; P:GO:0003384; F:GO:0005509; C:GO:0005911; C:GO:0005912; C:GO:0005938; P:GO:0007298; C:GO:0016324; C:GO:0016460; C:GO:0016461; P:GO:0019749; C:GO:0030496; P:GO:0031036; C:GO:0031941; F:GO:0032036; C:GO:0032154; P:GO:0032956; P:GO:0035148; P:GO:0035159; C:GO:0035183; P:GO:0035191; P:GO:0035277; P:GO:0035317; C:GO:0042060; C:GO:0048471; C:GO:0051233; P:GO:0060288; P:GO:0090254	P:mitotic cytokinesis; P:establishment of planar polarity; P:apical constriction involved in gastrulation; F:calcium ion binding; C:cell-cell junction; C:adherens junction; C:cell cortex; P:border follicle cell migration; C:apical plasma membrane; C:myosin II complex; C:unconventional myosin complex; P:cytoskeleton-dependent cytoplasmic transport, nurse cell to oocyte; C:midbody; P:myosin II filament assembly; C:filamentous actin; F:myosin heavy chain binding; C:cleavage furrow; P:regulation of actin cytoskeleton organization; P:tube formation; P:regulation of tube length, open tracheal system; C:female germline ring canal inner rim; P:nuclear axial expansion; P:spiracle morphogenesis, open tracheal system; P:imaginal disc-derived wing hair organization; P:wound healing; C:perinuclear region of cytoplasm; C:spindle midzone; P:formation of a compartment boundary; P:cell elongation involved in imaginal disc-derived wing morphogenesis
GSSPFG00020627001-PA	dj-1 beta	5	P:GO:0008344; P:GO:0042775; P:GO:0046626; P:GO:0048640; P:GO:0070301	P:adult locomotory behavior; P:mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport; P:regulation of insulin receptor signaling pathway; P:negative regulation of developmental growth; P:cellular response to hydrogen peroxide
GSSPFG00014527001-PA	60s ribosomal protein l10a	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015934	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:large ribosomal subunit
GSSPFG00000123001.3-PA	nedd2-like caspase	3	F:GO:0004197; P:GO:0006508; P:GO:0042981	F:cysteine-type endopeptidase activity; P:proteolysis; P:regulation of apoptotic process
GSSPFG00029082001.6-PA	small heat shock protein	2	F:GO:0005212; C:GO:0005840	F:structural constituent of eye lens; C:ribosome
GSSPFG00023353001-PA	uncharacterized protein loc101456014	8	P:GO:0002121; F:GO:0005089; P:GO:0007411; P:GO:0007480; P:GO:0035025; P:GO:0035277; P:GO:0043547; C:GO:0045179	P:inter-male aggressive behavior; F:rho guanyl-nucleotide exchange factor activity; P:axon guidance; P:imaginal disc-derived leg morphogenesis; P:positive regulation of rho protein signal transduction; P:spiracle morphogenesis, open tracheal system; P:positive regulation of GTPase activity; C:apical cortex
GSSPFG00021491001.3-PA	growth hormone-inducible transmembrane	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00007626001-PA	atp synthase subunit mitochondrial	3	C:GO:0000276; F:GO:0015078; P:GO:0015986	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o); F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP synthesis coupled proton transport
GSSPFG00031268001-PA	splicing factor 3b subunit 6-like protein	2	F:GO:0000166; F:GO:0003676; F:GO:0005215; F:GO:0005524; P:GO:0006810; P:GO:0008152; C:GO:0016021; F:GO:0016887	F:nucleotide binding; F:nucleic acid binding
GSSPFG00017555001.4-PA	atp-binding cassette sub-family a member 5-like isoform x1	6	F:GO:0006810; P:GO:0008152; C:GO:0016021; F:GO:0016887	F:transporter activity; F:ATP binding; P:transport; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:ATPase activity
GSSPFG00024304001-PA	transmembrane protein 14c	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00020109001.4-PB	cytochrome p450	5	F:GO:0005506; C:GO:0005789; F:GO:0020037; P:GO:0055114; F:GO:0070330	F:iron ion binding; C:endoplasmic reticulum membrane; F:heme binding; P:oxidation-reduction process; F:aromatase activity
GSSPFG00008376001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00026171001-PA	high affinity copper uptake protein 1 isoform x2	3	F:GO:0005375; C:GO:0016021; P:GO:0035434	F:copper ion transmembrane transporter activity; C:integral component of membrane; P:copper ion transmembrane transport
GSSPFG00034417001-PA	uv opsin	7	F:GO:0004930; P:GO:0007186; P:GO:0007601; P:GO:0007602; F:GO:0009881; C:GO:0016021; P:GO:0018298	F:G protein-coupled receptor activity; P:G protein-coupled receptor signaling pathway; P:visual perception; P:phototransduction; F:photoreceptor activity; C:integral component of membrane; P:protein-chromophore linkage
GSSPFG00016195001-PA	polyubiquitin-b isoform x1	33	F:GO:0002020; F:GO:0003723; C:GO:0005615; C:GO:0005634; C:GO:0005739; P:GO:0006511; P:GO:0007141; P:GO:0007144; P:GO:0008585; P:GO:0010992; P:GO:0021888; F:GO:0031386; P:GO:0031397; P:GO:0032020; P:GO:0032649; P:GO:0034340; P:GO:0042742; C:GO:0043005; C:GO:0043025; C:GO:0043209; P:GO:0045071; P:GO:0045648; P:GO:0047497; P:GO:0048812; P:GO:0051607; P:GO:0051881; P:GO:0060613; P:GO:0061136; C:GO:0070062; P:GO:0072520; P:GO:0097009; P:GO:1901214; P:GO:1902255	F:protease binding; F:RNA binding; C:extracellular space; C:nucleus; C:mitochondrion; P:ubiquitin-dependent protein catabolic process; P:male meiosis I; P:female meiosis I; P:female gonad development; P:ubiquitin recycling; P:hypothalamus gonadotrophin-releasing hormone neuron development; F:protein tag; P:negative regulation of protein ubiquitination; P:ISG15-protein conjugation; P:regulation of interferon-gamma production; P:response to type I interferon; P:defense response to bacterium; C:neuron projection; C:neuronal cell body; C:myelin sheath; P:negative regulation of viral genome replication; P:positive regulation of erythrocyte differentiation; P:mitochondrion transport along microtubule; P:neuron projection morphogenesis; P:defense response to virus; P:regulation of mitochondrial membrane potential; P:fat pad development; P:regulation of proteasomal protein catabolic process; C:extracellular exosome; P:seminiferous tubule development; P:energy homeostasis; P:regulation of neuron death; P:positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator
GSSPFG00028489001.5-PA	trypsin-like serine proteinase t26	2	F:GO:0005515; F:GO:0008233	F:protein binding; F:peptidase activity

GSSPFG00008485001-PA	atp synthase subunit mitochondrial	3	C:GO:000276; F:GO:0015078; P:GO:0015986	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o); F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP synthesis coupled proton transport
GSSPFG00011227001-PA	synaptic vesicle glycoprotein 2b	4	F:GO:0008270; C:GO:0016021; F:GO:0022857; P:GO:0055085	F:zinc ion binding; C:integral component of membrane; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport
GSSPFG00026778001-PA	neuronal pas domain-containing protein 4-like	7	F:GO:0003677; F:GO:0004812; F:GO:0005524; C:GO:0005634; P:GO:0006355; P:GO:0006418; F:GO:0046983	F:DNA binding; F:aminoacyl-tRNA ligase activity; F:ATP binding; C:nucleus; P:regulation of transcription, DNA-templated; P:tRNA aminoacylation for protein translation; F:protein dimerization activity
GSSPFG00027565001.2-PA	cytochrome p450	5	F:GO:0004497; F:GO:0005506; F:GO:0016705; F:GO:0020037; P:GO:0055114	F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00005701001-PA	dopamine n-acetyltransferase-like	2	F:GO:0008080; P:GO:0008152	F:N-acetyltransferase activity; P:metabolic process
GSSPFG000029413001-PA	poly-specific endoribonuclease homolog	4	F:GO:0008152; F:GO:0016788; P:GO:0097159; F:GO:1901363	P:metabolic process; F:hydrolase activity, acting on ester bonds; F:organic cyclic compound binding; F:heterocyclic compound binding
GSSPFG00016017001-PA	proton-coupled folate transporter-like	2	C:GO:0016021; P:GO:0055085	C:integral component of membrane; P:transmembrane transport
GSSPFG00017370001-PA	telomerase reverse transcriptase	2	F:GO:0003964; P:GO:0006278	F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:RNA-dependent DNA biosynthetic process
GSSPFG00024799001-PA	guanine nucleotide exchange factor dbs-like isoform x3	1	P:GO:0050789	P:regulation of biological process
GSSPFG00022767001-PA	set1 ash2 histone methyltransferase complex subunit ash2	3	F:GO:0008168; F:GO:0008270; P:GO:0032259	F:methyltransferase activity; F:zinc ion binding; P:methylation
GSSPFG00003077001.5-PA	glutathione s-transferase	2	F:GO:0004364; P:GO:0008152; F:GO:0004983; P:GO:0007218; C:GO:0016021	F:glutathione transferase activity; P:metabolic process; F:neuropeptide Y receptor activity; P:neuropeptide signaling pathway; C:integral component of membrane
GSSPFG00010594001-PA	neurexin-4 isoform x2	4	F:GO:0000287; P:GO:0008152; F:GO:0008897; C:GO:0016021	F:magnesium ion binding; P:metabolic process; F:holo-[acly-carrier-protein] synthase activity; C:integral component of membrane
GSSPFG00000957001-PA	zinc finger protein 800 isoform x2	1	F:GO:0005488	F:binding
GSSPFG00014231001-PA	v-type proton atpase subunit e	4	P:GO:0008152; P:GO:0015991; C:GO:0033178; F:GO:0046961	P:metabolic process; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG0002580001-PA	uv excision repair protein rad23 homolog b	4	F:GO:0003684; C:GO:0005634; P:GO:0006289; P:GO:0043161	F:damaged DNA binding; C:nucleus; P:nucleotide-excision repair; P:proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process
GSSPFG00000520001-PA	uncharacterized protein partial	2	F:GO:0005319; P:GO:0006869	F:lipid transporter activity; P:lipid transport
GSSPFG00007846001-PA	uncharacterized protein loc105389112	3	F:GO:0016301; P:GO:0016310; F:GO:0043168	F:kinase activity; P:phosphorylation; F:anion binding
GSSPFG00022738001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00021500001.3-PA	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	1	F:GO:0008270	F:zinc ion binding
GSSPFG00026320001-PA	phosphatidate mitochondrial	4	C:GO:0005739; P:GO:0008654; C:GO:0016020; F:GO:0016779	C:mitochondrion; P:phospholipid biosynthetic process; C:membrane; F:nucleotidyltransferase activity
GSSPFG00006843001-PA	lipoyltransferase mitochondrial	2	F:GO:0003824; P:GO:0006464	F:catalytic activity; P:cellular protein modification process
GSSPFG00026411001-PA	tyrosine aminotransferase	4	F:GO:0004838; P:GO:0009058; P:GO:0009072; F:GO:0030170	F:L-tyrosine:2-oxoglutarate aminotransferase activity; P:biosynthetic process; P:aromatic amino acid family metabolic process; F:pyridoxal phosphate binding
GSSPFG00025843001-PA	nuclear pore complex protein nup107	2	C:GO:0005643; P:GO:0006810; C:GO:0016021; F:GO:0022848; C:GO:0030054; C:GO:0045211; P:GO:0098655	C:nuclear pore; P:transport; C:integral component of membrane; F:acetylcholine-gated cation-selective channel activity; C:cell junction; C:postsynaptic membrane; P:cation transmembrane transport
GSSPFG00034701001-PA	fatty acid binding protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; F:GO:0008289	F:transporter activity; P:transport; F:lipid binding
GSSPFG00001387001.3-PA	trypsin-like protease	1	F:GO:0016787	F:hydrolase activity
GSSPFG00017853001-PA	seminal fluid protein hacp038	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00009112001-PA	zinc finger protein 271-like	1	F:GO:0005488	F:binding
GSSPFG00034702001-PA	fatty acid binding protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; F:GO:0008289	F:transporter activity; P:transport; F:lipid binding
GSSPFG00018170001-PA	sterol carrier protein 2 3-oxoacyl- thiolase	7	F:GO:0005548; C:GO:0005739; C:GO:0005777; C:GO:0005811; P:GO:0008152; P:GO:0015914; F:GO:0016747	F:phospholipid transporter activity; C:mitochondrion; C:peroxisome; C:lipid droplet; P:metabolic process; P:phospholipid transport; F:transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups
GSSPFG00034353001.4-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00034354001.3-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00002450001-PA	carboxylesterase	2	P:GO:0008152; F:GO:0016787	P:metabolic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00028152001.3-PA	mitochondrial manganese superoxide dismutase	4	F:GO:0004784; P:GO:0019430; F:GO:0046872; P:GO:0055114; F:GO:0005201; F:GO:0005509; C:GO:0031012	F:superoxide dismutase activity; P:removal of superoxide radicals; F:metal ion binding; P:oxidation-reduction process; F:extracellular matrix structural constituent; F:calcium ion binding; C:extracellular matrix
GSSPFG00014800001-PA	fibrillin-2-like	3	F:GO:0005215; C:GO:0016021; P:GO:0055085	F:transporter activity; C:integral component of membrane; P:transmembrane transport
GSSPFG00032730001-PA	lipase	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00034358001.3-PA	chymotrypsin-like serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00029683001-PA	methionine--trna mitochondrial	3	F:GO:0000166; F:GO:0004812; P:GO:0006418	F:nucleotide binding; F:aminoacyl-tRNA ligase activity; P:tRNA aminoacylation for protein translation
GSSPFG00028012001-PA	gdp-d-glucose phosphorylase 1	2	P:GO:0008152; F:GO:0016740	P:metabolic process; F:transferase activity
GSSPFG00013063001-PA	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	4	F:GO:0004303; C:GO:0005777; C:GO:0005811; P:GO:0055114	F:estradiol 17-beta-dehydrogenase activity; C:peroxisome; C:lipid droplet; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00004595001-PA	aminopeptidase n	2	F:GO:0046872; F:GO:0070011	F:metal ion binding; F:peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
GSSPFG00015310001-PA	lim and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	2	F:GO:0008270; P:GO:0046854	F:zinc ion binding; P:phosphatidylinositol phosphorylation
GSSPFG00023167001-PA	39s ribosomal protein mitochondrial	1	C:GO:0005840	C:ribosome
GSSPFG00006714001-PA	catalase	13	F:GO:0004096; F:GO:0005515; P:GO:0006979; P:GO:0009987; F:GO:0020037; C:GO:0043231; P:GO:0044238; P:GO:0044260; C:GO:0044444; F:GO:0046872; P:GO:0050794; P:GO:0055114; P:GO:1901360	F:catalase activity; F:protein binding; P:response to oxidative stress; P:cellular process; F:heme binding; C:intracellular membrane-bounded organelle; P:primary metabolic process; P:cellular macromolecule metabolic process; C:cytoplasmic part; F:metal ion binding; P:regulation of cellular process; P:oxidation-reduction process; P:organic cyclic compound metabolic process
GSSPFG00026383001-PA	taf6-like rna polymerase ii p300 cbp-associated factor-associatt	5	C:GO:0005634; P:GO:0006325; P:GO:0006352; F:GO:0046982; P:GO:1903506	C:nucleus; P:chromatin organization; P:DNA-templated transcription, initiation; F:protein heterodimerization activity; P:regulation of nucleic acid-templated transcription
GSSPFG00033217001-PA	gtp-binding protein 128up	1	F:GO:0005525	F:GTP binding

GSSPFG00013616001-PA	heat shock protein 70	17	F:GO:0003723; F:GO:0005524; C:GO:0005730; C:GO:0005925; P:GO:0006457; P:GO:0006611; P:GO:0006626; P:GO:0009636; F:GO:00017134; F:GO:0031072; F:GO:0031625; C:GO:0042645; P:GO:0043066; C:GO:0043209; F:GO:0051082; C:GO:0070062; P:GO:0071347	F:RNA binding; F:ATP binding; C:nucleolus; C:focal adhesion; P:protein folding; P:protein export from nucleus; F:protein targeting to mitochondrion; P:response to toxic substance; F:fibroblast growth factor binding; F:heat shock protein binding; F:ubiquitin protein ligase binding; C:mitochondrial nucleoid; P:negative regulation of apoptotic process; C:myelin sheath; F:unfolded protein binding; C:extracellular exosome; P:cellular response to interleukin-1
GSSPFG00013592001.3-PA	superoxide dismutase	5	F:GO:0004784; C:GO:0005737; P:GO:0019430; F:GO:0046872; P:GO:0055114	F:superoxide dismutase activity; C:cyttoplasm; P:removal of superoxide radicals; F:metal ion binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00015808001-PA	transcription factor dp-1	6	F:GO:0003677; F:GO:0003700; C:GO:0005634; C:GO:0005667; P:GO:0006355; P:GO:0007049	F:DNA binding; F:DNA-binding transcription factor activity; C:nucleus; C:transcription factor complex; P:regulation of transcription, DNA-templated; P:cell cycle
GSSPFG00023569001-PA	acyl-binding protein	1	F:GO:0000062	F:fatty-acyl-CoA binding
GSSPFG00016760001-PA	aldehyde dehydrogenase family 7 member a1 homolog	5	C:GO:0016021; F:GO:0016620; F:GO:0022857; P:GO:0055085; P:GO:0055114	C:integral component of membrane; F:oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:transmembrane transporter activity; P:transmembrane transport; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00001835001.3-PA	carboxyl choline esterase cce016b	2	P:GO:0008152; F:GO:0016787	P:metabolic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00033418001-PA	protein ddi1 homolog 2	2	F:GO:0004190; P:GO:0006508	F:aspartic-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00030048001.3-PA	trypsin-like serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00011996001-PA	copper transport protein atox1	2	P:GO:0030001; F:GO:0046872	P:metal ion transport; F:metal ion binding
GSSPFG00032780001.1-PA	40s ribosomal protein s13	16	P:GO:0000184; F:GO:0003729; F:GO:0003735; F:GO:0005515; C:GO:0005730; C:GO:0005925; P:GO:0006413; P:GO:0006414; P:GO:0006415; P:GO:0006614; C:GO:0016020; P:GO:0019083; C:GO:0022627; P:GO:0033119; C:GO:0070062; F:GO:0070181	P:nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay; F:mRNA binding; F:structural constituent of ribosome; F:protein binding; C:nucleolus; C:focal adhesion; P:translational initiation; P:translational elongation; P:translational termination; P:SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane; C:membrane; P:viral transcription; C:cytosolic small ribosomal subunit; P:negative regulation of RNA splicing; C:extracellular exosome; F:small ribosomal subunit rRNA binding
GSSPFG00031255001-PA	bess motif-containing partial	1	F:GO:0003677	F:DNA binding
GSSPFG00004237001-PA	u7 snrna-associated sm-like protein lsm10	1	C:GO:0005634	C:nucleus
GSSPFG00033586001-PA	protein roadkill isoform x3	12	C:GO:0005634; P:GO:0007349; P:GO:0016567; P:GO:0030162; P:GO:0031648; P:GO:0042067; P:GO:0042308; F:GO:0042803; P:GO:0043065; P:GO:0045879; P:GO:0046330; P:GO:0046331	C:nucleus; P:cellularization; P:protein ubiquitination; P:regulation of proteolysis; P:protein destabilization; P:establishment of ommatidial planar polarity; P:negative regulation of protein import into nucleus; F:protein homodimerization activity; P:positive regulation of apoptotic process; P:negative regulation of smoothened signaling pathway; P:positive regulation of JNK cascade; P:lateral inhibition
GSSPFG00008731001.2-PA	hox cluster protein	5	C:GO:0005634; P:GO:0006355; P:GO:0007275; F:GO:0043565; P:GO:0048856	C:nucleus; P:regulation of transcription, DNA-templated; P:multicellular organism development; F:sequence-specific DNA binding; P:anatomical structure development
GSSPFG00022970001.3-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00011282001-PA	alpha-mannosyltransferase alg2	6	F:GO:0004378; C:GO:0005811; P:GO:0009058; C:GO:0012505; F:GO:0033164; P:GO:0097502	F:GDP-Man:Man1GlcNAc2-PP-Dol alpha-1,3-mannosyltransferase activity; C:lipid droplet; P:biosynthetic process; C:endomembrane system; F:glycolipid 6-alpha-mannosyltransferase activity; P:mannosylation
GSSPFG00001034001-PA	topoisomerase partial	5	F:GO:0003677; F:GO:0003917; F:GO:0003918; C:GO:0005694; P:GO:0006265	F:DNA binding; F:DNA topoisomerase type I activity; F:DNA topoisomerase type II (ATP-hydrolyzing) activity; C:chromosome; P:DNA topological change
GSSPFG00015723001.3-PA	heat shock 70 kda protein 14	2	F:GO:0005524; C:GO:0005737	F:ATP binding; C:cyttoplasm
GSSPFG00022971001.4-PA	chymotrypsin-like protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00013450001.3-PA	chymotrypsin-like serine protease precursor	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00007550001-PA	protein vav isoform x1	5	F:GO:0005089; C:GO:0005622; P:GO:0035023; P:GO:0043547; F:GO:0046872	F:Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity; C:intracellular; P:regulation of Rho protein signal transduction; P:positive regulation of GTPase activity; F:metal ion binding
GSSPFG00009950001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00026650001-PA	glucose-dependent insulinotropic receptor-like	3	F:GO:0004930; P:GO:0007186; C:GO:0016021	F:G protein-coupled receptor activity; P:G protein-coupled receptor signaling pathway; C:integral component of membrane
GSSPFG00012665001-PA	translocon-associated protein subunit gamma	3	C:GO:0005784; P:GO:0006613; C:GO:0030176	C:Sec61 translocon complex; P:cotranslational protein targeting to membrane; C:integral component of endoplasmic reticulum membrane
GSSPFG00033909001-PA	atp synthase subunit mitochondrial	3	C:GO:0000276; F:GO:0015078; P:GO:0015986	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o); F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP synthesis coupled proton transport
GSSPFG00018941001-PA	probable chitinase 3	5	F:GO:0004568; C:GO:0005576; P:GO:0005975; P:GO:0006032; F:GO:0008061	F:chitinase activity; C:extracellular region; P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process; F:chitin binding
GSSPFG00005709001-PA	leukocyte receptor cluster member 8 homolog isoform x2	1	F:GO:0016740	F:transferase activity
GSSPFG00007548001-PA	sulfiredoxin-1 isoform x1	3	F:GO:0005524; F:GO:0032542; P:GO:0055114	F:ATP binding; F:sulfiredoxin activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00013754001-PA	4-hydroxybutyrate-transferase	7	C:GO:0005739; C:GO:0005811; C:GO:0005829; P:GO:0006084; F:GO:0008411; F:GO:0016787; P:GO:0022008	C:mitochondrion; C:lipid droplet; C:cytosol; P:acetyl-CoA metabolic process; F:4-hydroxybutyrate CoA-transferase activity; F:hydrolase activity; P:neurogenesis
GSSPFG00023780001.3-PA	serine threonine-protein kinase pelle	4	F:GO:0004674; F:GO:0005524; P:GO:0006468; P:GO:0007165	F:protein serine/threonine kinase activity; F:ATP binding; P:protein phosphorylation; P:signal transduction
GSSPFG00000598001-PA	rab gdp-dissociation inhibitor	3	F:GO:0005093; P:GO:0015031; P:GO:0050790	F:Rab GDP-dissociation inhibitor activity; P:protein transport; P:regulation of catalytic activity
GSSPFG000029716001.2-PA	fatty acid binding protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; F:GO:0008289	F:transporter activity; P:transport; F:lipid binding
GSSPFG00003126001.3-PA	partial	3	F:GO:0003700; P:GO:0006355; F:GO:0043565	F:DNA-binding transcription factor activity; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:sequence-specific DNA binding
GSSPFG00007084001-PA	40s ribosomal protein s28	6	P:GO:0002181; F:GO:0003735; P:GO:0006355; P:GO:0006407; C:GO:0022627; C:GO:0043189	P:cytoplasmic translation; F:structural constituent of ribosome; P:regulation of transcription, DNA-templated; P:rRNA export from nucleus; C:cytosolic small ribosomal subunit; C:H4/H2A histone acetyltransferase complex
GSSPFG00005448001-PA	math and lrr domain-containing protein pfe0570w-like	2	F:GO:0097159; F:GO:1901363	F:organic cyclic compound binding; F:heterocyclic compound binding
GSSPFG00000597001-PA	rab gdp dissociation inhibitor alpha	8	F:GO:0005093; C:GO:0005829; C:GO:0005875; P:GO:0007269; C:GO:0008021; P:GO:0015031; P:GO:0016192; P:GO:0050790	F:Rab GDP-dissociation inhibitor activity; C:cytosol; C:microtubule associated complex; P:neurotransmitter secretion; C:synaptic vesicle; P:protein transport; P:vesicle-mediated transport; P:regulation of catalytic activity

GSSPFG00029664001-PA	b-cell cll lymphoma 7 protein family member b	2	F:GO:0003676; F:GO:0046872	F:nucleic acid binding; F:metal ion binding
			P:GO:0001508; F:GO:0003676; F:GO:0005471; C:GO:0005743; C:GO:0005811; P:GO:0006839; P:GO:0007268; P:GO:0007629; P:GO:0008340; P:GO:0009612; P:GO:0010507; P:GO:0015074; P:GO:0015866; P:GO:0015867; C:GO:0016021; P:GO:0034599; P:GO:0040011; P:GO:0046716; P:GO:0048477; P:GO:0048489; P:GO:0051124; P:GO:0051480; P:GO:0051560; P:GO:0051900; P:GO:0055085; P:GO:0070050; P:GO:2001171	P:action potential; F:nucleic acid binding; F:ATP:ADP antiporter activity; C:mitochondrial inner membrane; C:lipid droplet; P:mitochondrial transport; P:chemical synaptic transmission; P:flight behavior; P:determination of adult lifespan; P:response to mechanical stimulus; P:negative regulation of autophagy; P:DNA integration; P:ADP transport; P:ATP transport; C:integral component of membrane; P:cellular response to oxidative stress; P:locomotion; P:muscle cell cellular homeostasis; P:oogenesis; P:synaptic vesicle transport; P:synaptic growth at neuromuscular junction; P:regulation of cytosolic calcium ion concentration; P:mitochondrial calcium ion homeostasis; P:regulation of mitochondrial depolarization; P:transmembrane transport; P:neuron cellular homeostasis; P:positive regulation of ATP biosynthetic process
GSSPFG00016217001-PA	adenine nucleotide translocase insect2	27		
GSSPFG00015967001.1-PA	e3 ubiquitin-protein ligase trip12 isoform x1	8	F:GO:0004842; F:GO:0005096; C:GO:0005622; F:GO:0008270; P:GO:0016567; F:GO:0016874; P:GO:0035556; P:GO:0043547	F:ubiquitin-protein transferase activity; F:GTPase activator activity; C:intracellular; F:zinc ion binding; P:protein ubiquitination; F:ligase activity; P:intracellular signal transduction; P:positive regulation of GTPase activity
GSSPFG00009775001.1-PA	prostaglandin reductase 1-like	3	F:GO:0008270; F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:zinc ion binding; F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00020100001-PA	gag-pol polyprotein	1	F:GO:0016787	F:hydrolase activity
GSSPFG00000050001-PA	gtp-binding protein rad	6	F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005622; P:GO:0007264; C:GO:0016020; P:GO:1901386	F:GTPase activity; F:GTP binding; C:intracellular; P:small GTPase mediated signal transduction; C:membrane; P:negative regulation of voltage-gated calcium channel activity
GSSPFG00003027001-PA	drip protein	3	F:GO:0005215; P:GO:0006810; C:GO:0016021	F:transporter activity; P:transport; C:integral component of membrane
GSSPFG00007050001-PA	60s ribosomal protein l10a	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015934	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:large ribosomal subunit
GSSPFG00009778001.1-PA	prostaglandin reductase 1-like	3	F:GO:0008270; F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:zinc ion binding; F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00005108001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00007187001-PA	islet cell autoantigen 1	2	F:GO:0019904; P:GO:0046928	F:protein domain specific binding; P:regulation of neurotransmitter secretion
GSSPFG00014493001.3-PB	cytochrome p450 cyp314a1	4	F:GO:0004501; F:GO:0005506; F:GO:0020037; P:GO:0055114	F:cytochrome 20-monoxygenase activity; F:iron ion binding; F:heme binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00005109001-PA	pancreatic triacylglycerol lipase-like	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00001676001-PA	heme oxygenase	3	F:GO:0004392; P:GO:0006788; F:GO:0046872	F:heme oxygenase (decyclizing) activity; P:heme oxidation; F:metal ion binding
GSSPFG00007711001-PA	eukaryotic peptide chain release factor gtp-binding subunit erf:	7	F:GO:0003746; F:GO:0003747; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005829; P:GO:0006414; P:GO:0006415	F:translation elongation factor activity; F:translation release factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:cytosol; P:translational elongation; P:translational termination
GSSPFG00002106001.3-PA	slit homolog 1 protein	5	P:GO:0007165; P:GO:0008152; C:GO:0016021; F:GO:0016787; P:GO:0045087	P:signal transduction; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:hydrolase activity; P:innate immune response
GSSPFG00004783001.1-PA	e3 ubiquitin-protein ligase trip12 isoform x1	3	F:GO:0004842; P:GO:0016567; F:GO:0016874	F:ubiquitin-protein transferase activity; P:protein ubiquitination; F:ligase activity
GSSPFG00014405001-PA	dipeptidyl peptidase 4	3	P:GO:0006508; F:GO:0008236; C:GO:0016020	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; C:membrane
GSSPFG00014584001.1-PA	cystathionine gamma-lyase	3	P:GO:0008152; F:GO:0016829; F:GO:0030170	P:metabolic process; F:lyase activity; F:pyridoxal phosphate binding
GSSPFG00024425001.3-PA	transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	1	F:GO:0008270	F:zinc ion binding
GSSPFG00026492001.1-PA	glucosylceramidase-like	3	P:GO:0006665; F:GO:0016787; P:GO:0050794	P:sphingolipid metabolic process; F:hydrolase activity; P:regulation of cellular process
GSSPFG00026398001.1-PA	39s ribosomal protein mitochondrial	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; C:GO:0005762; P:GO:0006412	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; C:mitochondrial large ribosomal subunit; P:translation
GSSPFG00028772001-PA	e3 ubiquitin-protein ligase mycbp2 isoform x1	2	F:GO:0004842; P:GO:0016567	F:ubiquitin-protein transferase activity; P:protein ubiquitination

Supplementary Table 2D : Annotation of down-regulated intestinal transcripts at 3 days p.i.

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00022879001-PA	14-3-3 protein zeta isoform x1	2	C:GO:0005737; F:GO:0019904	C:cytoplasm; F:protein domain specific binding
GSSPFG00020046001-PA	arginine kinase	3	F:GO:0004054; F:GO:0005524; P:GO:0016310	F:arginine kinase activity; F:ATP binding; P:phosphorylation
GSSPFG00030477001.4-PA	catalase	29	F:GO:0000981; F:GO:0001158; F:GO:0003007; F:GO:0004096; F:GO:0004102; C:GO:0005634; C:GO:0005777; C:GO:0005891; P:GO:0007274; P:GO:0007517; P:GO:0008292; F:GO:0008332; P:GO:0008340; P:GO:0016339; F:GO:0020037; P:GO:0035206; P:GO:0038001; P:GO:0042542; P:GO:0042673; P:GO:0042682; P:GO:0042744; P:GO:0045471; P:GO:0045676; P:GO:0045944; F:GO:0046872; P:GO:0048813; P:GO:0055114; P:GO:0070509; P:GO:0070588	F:DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific; F:enhancer sequence-specific DNA binding; P:heart morphogenesis; F:catalase activity; F:choline O-acetyltransferase activity; C:nucleus; C:peroxisome; C:voltage-gated calcium channel complex; P:neuromuscular synaptic transmission; P:muscle organ development; P:acetylcholine biosynthetic process; F:low voltage-gated calcium channel activity; P:determination of adult lifespan; P:calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules; F:heme binding; P:regulation of hemocyte proliferation; P:paracrine signaling; P:response to hydrogen peroxide; P:regulation of retinal cone cell fate specification; P:regulation of compound eye cone cell fate specification; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:response to ethanol; P:regulation of R7 cell differentiation; P:positive regulation of transcription by RNA polymerase II; F:metal ion binding; P:dendrite morphogenesis; P:oxidation-reduction process; P:calcium ion import; P:calcium ion transmembrane transport
GSSPFG00016528001-PA	cd63 antigen-like isoform x1	1	C:GO:0016021	C:integral component of membrane
GSSPFG00034359001.3-PA	chymotrypsin-like serine protease	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00022639001.1-PA	cklf-like marvel transmembrane domain-containing protein 4	1	C:GO:0016020	C:membrane
GSSPFG00018884001.2-PA	cytochrome p450	5	F:GO:0004497; F:GO:0005506; F:GO:0020075; F:GO:0020037; P:GO:0055114	F:monooxygenase activity; F:iron ion binding; F:oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen; F:heme binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00016699001-PA	cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	10	C:GO:0005737; P:GO:0006730; F:GO:0008168; P:GO:0009058; P:GO:0009258; F:GO:0016155; F:GO:0016620; F:GO:0016742; P:GO:0032259; P:GO:0055114	C:cytoplasm; P:one-carbon metabolic process; F:methyltransferase activity; P:biosynthetic process; P:10-formyltetrahydrofolate catabolic process; F:formyltetrahydrofolate dehydrogenase activity; F:oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor; F:hydroxymethyl-, formyl- and related transferase activity; P:methylation; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00004184001-PA	dimethyladenosine transferase mitochondrial	2	F:GO:0000179; P:GO:0031167	F:rRNA (adenine-N6,N6)-dimethyltransferase activity; P:rRNA methylation
GSSPFG00019440001-PA	dna repair protein rad51 homolog 1	37	F:GO:0000150; P:GO:0000730; C:GO:0000800; P:GO:0001932; F:GO:0003684; F:GO:0003690; F:GO:0003697; F:GO:0005524; C:GO:0005730; C:GO:0005759; C:GO:0005815; P:GO:0006268; P:GO:0006312; P:GO:0007131; F:GO:0008022; P:GO:0009636; P:GO:0010165; P:GO:0010569; C:GO:0016605; P:GO:0032200; P:GO:0042493; F:GO:0042802; F:GO:0043142; P:GO:0046686; C:GO:0048471; P:GO:0051106; P:GO:0051260; P:GO:0051597; F:GO:0070182; P:GO:0070192; P:GO:0071480; P:GO:0072711; P:GO:0072719; P:GO:0072757; P:GO:1902521; P:GO:1990414; P:GO:1990426	F:recombinase activity; P:DNA recombinase assembly; C:lateral element; P:regulation of protein phosphorylation; F:damaged DNA binding; F:double-stranded DNA binding; F:single-stranded DNA binding; F:ATP binding; C:nucleolus; C:mitochondrial matrix; C:microtubule organizing center; P:DNA unwinding involved in DNA replication; P:mitotic recombination; P:reciprocal meiotic recombination; F:protein C-terminus binding; P:response to toxic substance; P:response to X-ray; P:regulation of double-strand break repair via homologous recombination; C:PML body; P:telomere organization; P:response to drug; F:identical protein binding; F:single-stranded DNA-dependent ATPase activity; P:response to cadmium ion; C:perinuclear region of cytoplasm; P:positive regulation of DNA ligation; P:protein homooligomerization; P:response to methylmercury; F:DNA polymerase binding; P:chromosome organization involved in meiotic cell cycle; P:cellular response to gamma radiation; P:cellular response to hydroxyurea; P:cellular response to cisplatin; P:cellular response to camptothecin; P:response to etoposide; P:replication-born double-strand break repair via sister chromatid exchange; P:mitotic recombination-
GSSPFG00008879001.3-PA	e3 sumo-protein ligase pias3 isoform x2	3	P:GO:0008152; F:GO:0008270; F:GO:0019789	P:metabolic process; F:zinc ion binding; F:SUMO transferase activity
GSSPFG00007904001-PA	electron transfer flavoprotein-ubiquinone mitochondrial	3	F:GO:0004174; F:GO:0051536; P:GO:0055114	F:electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase activity; F:iron-sulfur cluster binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00006413001-PA	ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase	2	P:GO:0009058; F:GO:0016779	P:biosynthetic process; F:nucleotidyltransferase activity
GSSPFG00024615001-PA	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit b	8	F:GO:0000166; P:GO:0001731; F:GO:0003743; C:GO:0005852; P:GO:0006446; C:GO:0016282; F:GO:0031369; C:GO:0033290	F:nucleotide binding; P:formation of translation preinitiation complex; F:translation initiation factor activity; C:eukaryotic translation initiation factor 3 complex; P:regulation of translational initiation; C:eukaryotic 43S preinitiation complex; F:translation initiation factor binding; C:eukaryotic 48S preinitiation complex
GSSPFG00008242001.4-PA	glutathione s-transferase delta	2	F:GO:0004364; P:GO:0008152	F:glutathione transferase activity; P:metabolic process
GSSPFG00008243001-PA	glutathione s-transferase delta	2	F:GO:0004364; P:GO:0008152	F:glutathione transferase activity; P:metabolic process
GSSPFG00010868001-PA	H+ transporting atp synthase gamma subunit	7	C:GO:0000275; C:GO:0005811; P:GO:0006909; F:GO:0008553; P:GO:0015986; F:GO:0046933; F:GO:0046961	C:mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F(1); C:lipid droplet; P:phagocytosis; F:proton-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism; P:ATP synthesis coupled proton transport; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG00023356001.1-PA	importin subunit beta-1 isoform x1	5	C:GO:0005622; P:GO:0006886; P:GO:0006913; F:GO:0008536; F:GO:0008565	C:intracellular; P:intracellular protein transport; P:nucleocytoplasmic transport; F:Ran GTPase binding; F:protein transporter activity
GSSPFG00034251001-PA	intestinal mucin	3	C:GO:0005576; P:GO:0006030; F:GO:0008061	C:extracellular region; P:chitin metabolic process; F:chitin binding
GSSPFG00032730001-PA	lipase	3	C:GO:0005576; P:GO:0008152; F:GO:0052689	C:extracellular region; P:metabolic process; F:carboxylic ester hydrolase activity
GSSPFG00023038001-PA	organic cation transporter	1	F:GO:0005215	F:transporter activity
GSSPFG00032599001-PA	paired mesoderm homeobox protein 1	3	C:GO:0005634; P:GO:0006355; F:GO:0043565	C:nucleus; P:regulation of transcription, DNA-templated; F:sequence-specific DNA binding
GSSPFG00002429001-PA	pleckstrin homology domain-containing family m member 1	3	C:GO:0005622; F:GO:0008270; P:GO:0035556	C:intracellular; F:zinc ion binding; P:intracellular signal transduction
GSSPFG00004485001-PA	presequence mitochondrial	3	P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0046872	P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:metal ion binding
GSSPFG00005884001.3-PA	protein aubergine-like isoform x1	1	F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
GSSPFG00024299001-PA	ribosomal protein l18a	3	F:GO:0003735; C:GO:0005840; P:GO:0006412	F:structural constituent of ribosome; C:ribosome; P:translation
GSSPFG00002705001.1-PA	ribosomal protein s2	4	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015935	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:small ribosomal subunit

GSSPFG00004056001-PA	serine protease 115 isoform x1	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00030758001-PA	serine proteinase stubble-like	1	F:GO:0008233	F:peptidase activity
GSSPFG00031520001-PA	succinate dehydrogenase assembly factor 2- mitochondrial-like	5	F:GO:0005507; C:GO:0005739; P:GO:0006121; P:GO:0018293; P:GO:0055070	F:copper ion binding; C:mitochondrion; P:mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone; P:protein-FAD linkage; P:copper ion homeostasis
GSSPFG00031375001-PA	thioredoxin domain-containing protein 17-like	6	F:GO:0004197; C:GO:0005764; P:GO:0006508; P:GO:0006726; P:GO:0035071; C:GO:0045169	F:cysteine-type endopeptidase activity; C:lysosome; P:proteolysis; P:eye pigment biosynthetic process; P:salivary gland cell autophagic cell death; C:fusome
GSSPFG00035519001.3-PA	trypsin-like serine proteinase t26	3	F:GO:0004252; F:GO:0005515; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; F:protein binding; P:proteolysis

Annexe 2

Tableau supplémentaire 3 : Annotation des protéines des RL communes interagissant avec JcDV en Far WB

SeqName	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00022879001-PA	14-3-3 protein zeta isoform x1	2	C:GO:0005737; F:GO:0019904	C:cytoplasm; F:protein domain specific binding
GSSPFG00015351001-PA	60s ribosomal protein l8	4	F:GO:0003735; P:GO:0006412; C:GO:0015934; F:GO:0019843	F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:large ribosomal subunit; F:rRNA binding
GSSPFG00033000001-2-PA	abc transporter family c protein abcc2	5	F:GO:0005524; P:GO:0008152; C:GO:0016021; F:GO:0042626; P:GO:0055085	F:ATP binding; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:transmembrane transport
GSSPFG00001046001-PA	alkaline phosphatase	3	F:GO:0004035; P:GO:0006470; C:GO:0016020	F:alkaline phosphatase activity; P:protein dephosphorylation; C:membrane
GSSPFG00025752001.1-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00012682001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00004595001-PA	aminopeptidase n	2	F:GO:0046872; F:GO:0070011	F:metal ion binding; F:peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
GSSPFG0002692001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00019131001-PA	aminopeptidase n	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270; C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00002605001-PA	aminopeptidase n1	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00004594001-PA	aminopeptidase n4	5	F:GO:0004177; P:GO:0006508; P:GO:0007165; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; P:signal transduction; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00002604001-PA	aminopeptidase n4	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00006479001.1-PA	aminopeptidase n5	4	F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00022331001.1-PA	apolipoporphins	7	F:GO:0005488; P:GO:0006810; P:GO:0009987; P:GO:0033036; C:GO:0044464; P:GO:0051179; F:GO:0065007	F:binding; P:transport; P:cellular process; P:macromolecule localization; C:cell part; P:localization; P:biological regulation
GSSPFG00020440001-PA	apolipoprotein d-like	1	F:GO:0005488	F:binding
GSSPFG00020046001-PA	arginine kinase	3	F:GO:0004054; F:GO:0005524; P:GO:0016310	F:arginine kinase activity; F:ATP binding; P:phosphorylation
GSSPFG00010096001-PA	atp synthase subunit mitochondrial	6	F:GO:0005524; P:GO:0015986; P:GO:0015991; C:GO:0045261; F:GO:0046933; F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP synthesis coupled proton transport; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F1; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG00012836001-PA	atp synthase subunit mitochondrial	6	F:GO:0005524; P:GO:0015986; P:GO:0015991; C:GO:0045261; F:GO:0046933; F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP synthesis coupled proton transport; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting ATP synthase complex, catalytic core F1; F:proton-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG00031214001-PA	beta- partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsoleter MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00026444001-PA	beta- partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsoleter MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00030477001.4-PA	catalase	29	F:GO:0000981; F:GO:0001158; P:GO:0003007; F:GO:0004096; F:GO:0004102; C:GO:0005634; C:GO:0005777; C:GO:0005891; P:GO:0007274; P:GO:0007517; P:GO:0008292; F:GO:0008332; P:GO:0008340; P:GO:0016339; F:GO:0020037; P:GO:0035206; P:GO:0038001; P:GO:0042542; P:GO:0042673; P:GO:0042682; P:GO:0042744; P:GO:0045471; P:GO:0045676; P:GO:0045944; F:GO:0046872; P:GO:0048813; P:GO:0055114; P:GO:0070509; P:GO:0070588	F:DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific; F:enhancer sequence-specific DNA binding; P:heart morphogenesis; F:catalase activity; F:choline O-acetyltransferase activity; C:nucleus; C:peroxisome; C:voltage-gated calcium channel complex; P:neuromuscular synaptic transmission; P:muscle organ development; P:acetylcholine biosynthetic process; F:low voltage-gated calcium channel activity; P:determination of adult lifespan; P:calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules; F:heme binding; P:regulation of hemocyte proliferation; P:paracrine signaling; P:response to hydrogen peroxide; P:regulation of retinal cone cell fate specification; P:regulation of compound eye cone cell fate specification; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:response to ethanol; P:regulation of R7 cell differentiation; P:positive regulation of transcription by RNA polymerase II; F:metal ion binding; P:dendrite morphogenesis; P:oxidation-reduction process; P:calcium ion import; P:calcium ion transmembrane transport
GSSPFG00016500001-PA	charged multivesicular body protein 2a	2	C:GO:0005622; P:GO:0007034	C:intracellular; P:vacuolar transport
GSSPFG00016343001-PA	charged multivesicular body protein 2a	2	C:GO:0005622; P:GO:0007034	C:intracellular; P:vacuolar transport
GSSPFG00021371001-PA	cytochrome heme mitochondrial dehydrogenase reductase sdr family member 4	5	C:GO:0005750; C:GO:0005811; P:GO:0006122; F:GO:0020037; F:GO:0045153	C:mitochondrial respiratory chain complex III; C:lipid droplet; P:mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c; F:heme binding; F:electron transporter, transferring electrons within CoQH2-cytochrome c reductase complex activity
GSSPFG00005891001-PA	cytochrome heme mitochondrial dehydrogenase reductase sdr family member 4	2	F:GO:0016491; P:GO:0055114	F:oxidoreductase activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00001439001-PA	dihydropolipamide dehydrogenase	6	F:GO:0004148; C:GO:0005739; P:GO:0006096; P:GO:0045454; F:GO:0050660; P:GO:0055114	F:dihydropolipamide dehydrogenase activity; C:mitochondrion; P:glycolytic process; P:cell redox homeostasis; F:flavin adenine dinucleotide binding; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00024564001-PA	dihydropolipamide dehydrogenase mitochondrial	3	F:GO:0004742; P:GO:0006090; C:GO:0045254	F:dihydropolipamide dehydrogenase activity; P:pyruvate metabolic process; C:pyruvate dehydrogenase complex
GSSPFG00032793001-PA	dihydropolipamide dehydrogenase mitochondrial	3	F:GO:0004742; P:GO:0006090; C:GO:0045254	F:dihydropolipamide dehydrogenase activity; P:pyruvate metabolic process; C:pyruvate dehydrogenase complex
GSSPFG00014405001-PA	dipeptidyl peptidase 4	6	P:GO:0006508; F:GO:0008236; C:GO:0016020	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; C:membrane
GSSPFG00006764001-PA	eh domain-containing protein 3	6	F:GO:0003993; F:GO:0005509; F:GO:0005525; C:GO:0005622; P:GO:0006470; P:GO:0032456	F:acid phosphatase activity; F:calcium ion binding; F:GTP binding; C:intracellular; P:protein dephosphorylation; P:endocytic recycling
GSSPFG00002766001-PA	elongation factor 1 alpha	9	F:GO:0003746; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005811; C:GO:0005829; C:GO:0005853; C:GO:0005875; P:GO:0006414; P:GO:0008340	F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:lipid droplet; C:cytosol; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; C:microtubule associated complex; P:translational elongation; P:determination of adult lifespan

GSSPFG00027742001-PA	elongation factor 1 alpha	F:GO:0003746; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005811; C:GO:0005829; C:GO:0005853; 9 C:GO:0005875; P:GO:0006414; P:GO:0008340	F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:lipid droplet; C:cytosol; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; C:microtubule associated complex; P:translational elongation; P:determination of adult lifespan
GSSPFG000003392001-PA	farnesoic acid o-methyl transferase	2 F:GO:0008168; P:GO:0032259	F:methyltransferase activity; P:methylation
GSSPFG00011246001-PA	farnesoic acid o-methyl transferase	2 F:GO:0008168; P:GO:0032259	F:methyltransferase activity; P:methylation
GSSPFG00026492001.1-PA	glucosylceramidase-like	3 P:GO:0006665; F:GO:0016787; P:GO:0050794	P:sphingolipid metabolic process; F:hydrolase activity; P:regulation of cellular process
GSSPFG000302202001.1-PA	glutamate mitochondrial	3 P:GO:0006520; F:GO:0016639; P:GO:0055114	P:cellular amino acid metabolic process; F:oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors. NAD or NADP as acceptor; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00031044001-PA	imaginal disc growth factor	F:GO:0004568; C:GO:0005576; P:GO:0005975; 4 P:GO:0006032	F:chitinase activity; C:extracellular region; P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process
GSSPFG00018393001-PA	insulin-like growth factor 2 mrna-binding protein 1 isoform x1	2 F:GO:0000166; F:GO:0003723	F:nucleotide binding; F:RNA binding
GSSPFG00004635001.1-PA	lipid storage droplets surface binding protein 2	F:GO:0005515; C:GO:0005811; C:GO:0005875; P:GO:0007476; P:GO:0030730; P:GO:0031887; 8 P:GO:0050995; P:GO:0051049	F:protein binding; C:lipid droplet; C:microtubule associated complex; P:imaginal disc-derived wing morphogenesis; P:sequestering of triglyceride; P:lipid droplet transport along microtubule; P:negative regulation of lipid catabolic process; P:regulation of transport
GSSPFG00002044001-PA	lipamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase mitochondrial	3 C:GO:0005739; P:GO:0008152; F:GO:0016746	C:mitochondrion; P:metabolic process; F:transferase activity, transferring acyl groups
GSSPFG00004453001-PA	maltase a1-like	3 P:GO:0005975; F:GO:0016787; F:GO:0043169	P:carbohydrate metabolic process; F:hydrolase activity; F:cation binding
GSSPFG00009148001-PA	maternal protein exuperantia	1 F:GO:0003676	F:nucleic acid binding
GSSPFG000025143001-PA	moesin ezrin radixin homolog 1 isoform x2	P:GO:0000132; P:GO:0000912; F:GO:0003779; F:GO:0003924; F:GO:0005200; F:GO:0005525; F:GO:0005546; C:GO:0005634; C:GO:0005874; C:GO:0005884; C:GO:0005912; C:GO:0005938; P:GO:0007052; P:GO:0007091; P:GO:0007318; P:GO:0007368; P:GO:0008284; P:GO:0016057; C:GO:0016324; P:GO:0016336; C:GO:0019898; P:GO:0030866; C:GO:0032154; P:GO:0032956; C:GO:0035003; P:GO:0035149; P:GO:0042048; C:GO:0045169; P:GO:0045197; P:GO:0045313; P:GO:0045433; P:GO:0045807; P:GO:0051258; 35 P:GO:0072499; C:GO:1990023	P:establishment of mitotic spindle orientation; P:assembly of actomyosin apparatus involved in cytokinesis; F:actin binding; F:GTPase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:GTP binding; F:phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding; C:nucleus; C:microtubule; C:actin filament; C:cadherens junction; C:cell cortex; P:mitotic spindle organization; P:metaphase/anaphase transition of mitotic cell cycle; P:pole plasm protein localization; P:determination of left/right symmetry; P:positive regulation of cell proliferation; P:regulation of membrane potential in photoreceptor cell; C:apical plasma membrane; P:establishment or maintenance of polarity of larval imaginal disc epithelium; C:extrinsic component of membrane; P:cortical actin cytoskeleton organization; C:cleavage furrow; P:regulation of actin cytoskeleton organization; C:subapical complex; P:lumen formation. open tracheal system; P:olfactory behavior; C:fusome; P:establishment or maintenance of epithelial cell apical/basal polarity; P:rhabdomere membrane biogenesis; P:male courtship behavior. veined wing generated song production; P:positive regulation of endocytosis; P:protein polymerization; P:photoreceptor cell axon guidance; C:mitotic spindle midzone
GSSPFG00029215001.5-PA	multidrug resistance protein 1a	F:GO:0005524; P:GO:0008152; C:GO:0016021; 5 F:GO:0042626; P:GO:0055085	F:ATP binding; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:transmembrane transport
GSSPFG00007022001-PA	muscle	F:GO:0004452; F:GO:0005200; F:GO:0005524; C:GO:0005737; C:GO:0005884; P:GO:0006909; P:GO:0008299; P:GO:0014866; F:GO:0016787; 10 P:GO:0071689	F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:ATP binding; C:cytoplasm; C:actin filament; P:phagocytosis; P:isoprenoid biosynthetic process; P:skeletal myofibril assembly; F:hydrolase activity; P:muscle thin filament assembly
GSSPFG00002079001-PA	muscle	F:GO:0004452; F:GO:0005524; C:GO:0005737; 6 C:GO:0005856; P:GO:0008299; F:GO:0016787	F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity; F:ATP binding; C:cytoplasm; C:cytoskeleton; P:isoprenoid biosynthetic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00006011001.1-PA	myosin heavy chain 95f isoform x1	F:GO:0003774; F:GO:0003779; F:GO:0005524; 5 P:GO:0008152; C:GO:0016459	F:motor activity; F:actin binding; F:ATP binding; P:metabolic process; C:myosin complex
GSSPFG00024806001.1-PA	myosin heavy chain 95f isoform x2	F:GO:0003774; F:GO:0003779; F:GO:0005524; 5 P:GO:0008152; C:GO:0016459	F:motor activity; F:actin binding; F:ATP binding; P:metabolic process; C:myosin complex
GSSPFG00030827001-PA	myosin-ib isoform x2	1 F:GO:0000166	F:nucleotide binding
GSSPFG00022265001-PA	myosin-viia	F:GO:0003774; F:GO:0005524; P:GO:0006457; 4 C:GO:0016459	F:motor activity; F:ATP binding; P:protein folding; C:myosin complex
GSSPFG00000408001-PA	nadh dehydrogenase	2 F:GO:0008137; P:GO:0055114	F:NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00003289001-PA	nadh dehydrogenase	C:GO:0005747; P:GO:0006120; F:GO:0008137; 5 F:GO:00046872; F:GO:0051537	C:mitochondrial respiratory chain complex 1; P:mitochondrial electron transport. NADH to ubiquinone; F:NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity; F:metal ion binding; F:2 iron. 2 sulfur cluster binding
GSSPFG00014193001-PA	nadh-cytochrome b5 reductase 2 isoform x1	P:GO:0002121; F:GO:0004128; C:GO:0012505; 4 P:GO:0055114	P:inter-male aggressive behavior; F:cytochrome-b5 reductase activity, acting on NAD(P)H; C:endomembrane system; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00013433001-PA	neuroplastin	P:GO:0032501; P:GO:0032989; P:GO:0048468; C:GO:0048786; P:GO:0051640; P:GO:0051704; 7 C:GO:0071944	P:multicellular organismal process; P:cellular component morphogenesis; P:cell development; C:presynaptic active zone; P:organelle localization; P:multi-organism process; C:cell periphery
GSSPFG00030261001.3-PA	peroxiredoxin 1	F:GO:0004602; C:GO:0005829; C:GO:0005875; P:GO:0006974; P:GO:0006979; P:GO:0007155; P:GO:0007281; P:GO:0008340; P:GO:0008354; F:GO:0008379; P:GO:0042594; P:GO:0042744; 13 P:GO:0045454	F:glutathione peroxidase activity; C:cytosol; C:microtubule associated complex; P:cellular response to DNA damage stimulus; P:response to oxidative stress; P:cell adhesion; P:germ cell development; P:determination of adult lifespan; P:germ cell migration; F:thioredoxin peroxidase activity; P:response to starvation; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:cell redox homeostasis
GSSPFG00013063001-PA	peroxisomal multifunctional enzyme type 2	F:GO:0004303; C:GO:0005777; C:GO:0005811; 4 P:GO:0055114	F:estradiol 17-beta-dehydrogenase activity; C:peroxisome; C:lipid droplet; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00024353001-PA	protein mesh isoform x1	C:GO:0005918; P:GO:0007160; C:GO:0016021; 4 C:GO:0016328	C:septate junction; P:cell-matrix adhesion; C:integral component of membrane; C:lateral plasma membrane
GSSPFG00026523001-PA	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit mitochondrial	3 F:GO:0004739; P:GO:0006086; P:GO:0055114	F:pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; P:acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00021433001-PA	pyruvate dehydrogenase e1 component subunit mitochondrial	3 F:GO:0004739; P:GO:0006086; P:GO:0055114	F:pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity; P:acetyl-CoA biosynthetic process from pyruvate; P:oxidation-reduction process
GSSPFG00001568001-PA	ribosomal protein l7	1 C:GO:0005840	C:ribosome
GSSPFG00001649001.1-PA	ribosomal protein s3	F:GO:0003723; F:GO:0003735; P:GO:0006412; 4 C:GO:0015935	F:RNA binding; F:structural constituent of ribosome; P:translation; C:small ribosomal subunit
GSSPFG00028610001.3-PA	serine protease 33	1 F:GO:0008236	F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00027555001-PA	thymus-specific serine protease	3 F:GO:0004180; P:GO:0006508; F:GO:0008236	F:carboxypeptidase activity; P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00032513001-PA	trypsin-like protease	1 F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00012077001.4-PA	trypsin-like serine partial	2 F:GO:0004252; P:GO:0006508	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00023291001.1-PA	tubulin alpha-1 chain	F:GO:0003924; F:GO:0005200; F:GO:0005524; F:GO:0005525; C:GO:0005737; C:GO:0005874; P:GO:0007017; P:GO:0008152; C:GO:0016021; 12 F:GO:0042626; P:GO:0051258; P:GO:0055085	F:GTPase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:ATP binding; F:GTP binding; C:cytoplasm; C:microtubule; P:microtubule-based process; P:metabolic process; C:integral component of membrane; F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:protein polymerization; P:transmembrane transport
GSSPFG00027141001-PA	v-type proton atpase catalytic subunit a	F:GO:0005524; P:GO:0015991; C:GO:0033180; 5 P:GO:0046034; F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting V-type ATPase. V1 domain; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG0000927001-PA	v-type proton atpase subunit b	C:GO:0000221; F:GO:0005524; C:GO:0005769; C:GO:0005829; C:GO:0005903; P:GO:0007035; P:GO:0015991; C:GO:0033181; P:GO:0046034; 11 F:GO:0046961; C:GO:0048471	C:vacuolar proton-transporting V-type ATPase. V1 domain; F:ATP binding; C:early endosome; C:cytosol; C:brush border; P:vacuolar acidification; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:plasma membrane proton-transporting V-type ATPase complex; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism; C:perinuclear region of cytoplasm
GSSPFG00006580001-PA	v-type proton atpase subunit c	3 F:GO:0015078; P:GO:0015991; C:GO:0033180	F:proton transmembrane transporter activity; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting V-type ATPase. V1 domain
GSSPFG00034061001-PA	v-type proton atpase subunit d	2 F:GO:0042626; P:GO:0055085	F:ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances; P:transmembrane transport
GSSPFG00014231001-PA	v-type proton atpase subunit e	P:GO:0008152; P:GO:0015991; C:GO:0033178; 4 F:GO:0046961	P:metabolic process; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting two-sector ATPase complex, catalytic domain; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism

GSSPFG00012720001-PA	v-type proton atpase subunit h isoform x1	3	C:GO:0000221; P:GO:0015991; F:GO:0046961	C:vacuolar proton-transporting V-type ATPase. V1 domain; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; F:proton-transporting ATPase activity. rotational mechanism
GSSPFG00011291001.1-PA	venom serine carboxypeptidase	2	F:GO:0004185; P:GO:0006508	F:serine-type carboxypeptidase activity; P:proteolysis
			C:GO:0005741; C:GO:0005811; C:GO:0005875; P:GO:0006839; P:GO:0007291; P:GO:0007602; F:GO:0008308; C:GO:0016006; P:GO:0030382;	C:mitochondrial outer membrane; C:lipid droplet; C:microtubule associated complex; P:mitochondrial transport; P:sperm individualization; P:phototransduction; F:voltage-gated anion channel activity; C:Nebenkern; P:sperm mitochondrion organization; P:regulation of anion transmembrane transport
GSSPFG00008691001.3-PA	voltage-dependent anion-selective channel	10	P:GO:1903959	F:DNA binding; P:regulation of transcription. DNA-templated
GSSPFG00021981001-PA	γ-box protein	2	F:GO:0003677; P:GO:0006355	F:carboxypeptidase activity
GSSPFG00018804001.1-PA	zinc carboxypeptidase-like	1	F:GO:0004180	F:carboxypeptidase activity
GSSPFG00017650001-PA	zinc carboxypeptidase-like	2	F:GO:0004180; F:GO:0046872	F:carboxypeptidase activity; F:metal ion binding

Annexe 3

Tableau supplémentaire 4 : Annotation des protéines de la MP et des RL communes interagissant avec JcDV en Far WB

Name	Description	#GO	GO IDs	GO Names
GSSPFG00022879001-PA	14-3-3 protein zeta isoform x1	2	C:GO:0005737; F:GO:0019904 F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270;	C:cytoplasm; F:protein domain specific binding
GSSPFG00025752001,1-PA	aminopeptidase n	5	C:GO:0016020	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00004595001-PA	aminopeptidase n	2	F:GO:0046872; F:GO:0070011 F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270;	F:metal ion binding; F:peptidase activity, acting on L-amino acid peptides
GSSPFG00026992001-PA	aminopeptidase n	5	C:GO:0016020 F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270;	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00019131001-PA	aminopeptidase n	5	C:GO:0016020 F:GO:0004177; P:GO:0006508; F:GO:0008237; F:GO:0008270	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding; C:membrane
GSSPFG00002605001-PA	aminopeptidase n1	4	F:GO:0008237; F:GO:0008270 F:GO:0004177; P:GO:0006508;	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00002604001-PA	aminopeptidase n4	4	F:GO:0008237; F:GO:0008270 F:GO:0004177; P:GO:0006508;	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding
GSSPFG00006479001,1-PA	aminopeptidase n5	4	F:GO:0008237; F:GO:0008270 F:GO:0005488; P:GO:0006810; P:GO:0009987; P:GO:0033036; C:GO:0044464; P:GO:0051179;	F:aminopeptidase activity; P:proteolysis; F:metallopeptidase activity; F:zinc ion binding F:binding; P:transport; P:cellular process; P:macromolecule localization; C:cell part; P:localization;
GSSPFG00022331001,1-PA	apolipoporphins	7	P:GO:0065007 F:GO:0004054; F:GO:0005524;	P:biological regulation
GSSPFG00020046001-PA	arginine kinase	3	P:GO:0016310 C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	F:arginine kinase activity; F:ATP binding; P:phosphorylation
GSSPFG00031214001-PA	beta-partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsoleted MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00026444001-PA	beta-partial	24	C:GO:0000790; F:GO:0000978; F:GO:0000980; P:GO:0001895; F:GO:0005524; C:GO:0005829; C:GO:0005886; C:GO:0005925; F:GO:0019894; P:GO:0021762; C:GO:0030863; F:GO:0030957; F:GO:0031492; C:GO:0035267; C:GO:0036464; F:GO:0042802; P:GO:0043044; C:GO:0043209; F:GO:0050998; C:GO:0070062; P:GO:0070527; C:GO:0070688; C:GO:0072562; C:GO:0097433	C:nuclear chromatin; F:RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding; F:RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding; P:retina homeostasis; F:ATP binding; C:cytosol; C:plasma membrane; C:focal adhesion; F:kinesin binding; P:substantia nigra development; C:cortical cytoskeleton; F:Tat protein binding; F:nucleosomal DNA binding; C:NuA4 histone acetyltransferase complex; C:cytoplasmic ribonucleoprotein granule; F:identical protein binding; P:ATP-dependent chromatin remodeling; C:myelin sheath; F:nitric-oxide synthase binding; C:extracellular exosome; P:platelet aggregation; C:obsoleted MLL5-L complex; C:blood microparticle; C:dense body
GSSPFG00030477001,4-PA	catalase	29	F:GO:0000981; F:GO:0001158; P:GO:0003007; F:GO:0004096; F:GO:0004102; C:GO:0005634; C:GO:0005777; C:GO:0005891; P:GO:0007274; P:GO:0007517; P:GO:0008292; F:GO:0008332; P:GO:0008340; P:GO:0016339; F:GO:0020037; P:GO:0035206; P:GO:0038001; P:GO:0042542; P:GO:0042673; P:GO:0042682; P:GO:0042744; P:GO:0045471; P:GO:0045676; P:GO:0045944; F:GO:0046872; P:GO:0048813; P:GO:0055114; P:GO:0070509; P:GO:0070588	F:DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific; F:enhancer sequence-specific DNA binding; P:heart morphogenesis; F:catalase activity; F:choline O-acetyltransferase activity; C:nucleus; C:peroxisome; C:voltage-gated calcium channel complex; P:neuromuscular synaptic transmission; P:muscle organ development; P:acetylcholine biosynthetic process; F:low voltage-gated calcium channel activity; P:determination of adult lifespan; P:calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules; F:heme binding; P:regulation of hemocyte proliferation; P:paracrine signaling; P:response to hydrogen peroxide; P:regulation of retinal cone cell fate specification; P:regulation of compound eye cone cell fate specification; P:hydrogen peroxide catabolic process; P:response to ethanol; P:regulation of R7 cell differentiation; P:positive regulation of transcription by RNA polymerase II; F:metal ion binding; P:dendrite morphogenesis; P:oxidation-reduction process; P:calcium ion import; P:calcium ion transmembrane transport
GSSPFG00014405001-PA	dipeptidyl peptidase 4	3	P:GO:0006508; F:GO:0008236; C:GO:0016020	P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity; C:membrane
GSSPFG00002766001-PA	elongation factor 1 alpha	9	F:GO:0003746; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005811; C:GO:0005829; C:GO:0005853; C:GO:0005875; P:GO:0006414; P:GO:0008340	F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:lipid droplet; C:cytosol; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; C:microtubule associated complex; P:translational elongation; P:determination of adult lifespan
GSSPFG00027742001-PA	elongation factor 1 alpha	9	F:GO:0003746; F:GO:0003924; F:GO:0005525; C:GO:0005811; C:GO:0005829; C:GO:0005853; C:GO:0005875; P:GO:0006414; P:GO:0008340	F:translation elongation factor activity; F:GTPase activity; F:GTP binding; C:lipid droplet; C:cytosol; C:eukaryotic translation elongation factor 1 complex; C:microtubule associated complex; P:translational elongation; P:determination of adult lifespan
GSSPFG00003392001-PA	farnesoic acid o-methyl transferase	2	F:GO:0008168; P:GO:0032259	F:methyltransferase activity; P:methylation
GSSPFG00011246001-PA	farnesoic acid o-methyl transferase	2	F:GO:0008168; P:GO:0032259 P:GO:0006665; F:GO:0016787;	F:methyltransferase activity; P:methylation
GSSPFG00026492001,1-PA	glucosylceramidase-like	3	P:GO:0050794 F:GO:0004568; C:GO:0005576;	P:sphingolipid metabolic process; F:hydrolase activity; P:regulation of cellular process
GSSPFG00031044001-PA	imaginal disc growth factor	4	P:GO:0005975; P:GO:0006032 F:GO:0004452; F:GO:0005200; F:GO:0005524; C:GO:0005737; C:GO:0005884; P:GO:0006909; P:GO:0008299; P:GO:0014866; F:GO:0016787; P:GO:0071689	F:chitinase activity; C:extracellular region; P:carbohydrate metabolic process; P:chitin catabolic process
GSSPFG0000722001-PA	muscle	10	F:GO:0004452; F:GO:000524; C:GO:0005737; C:GO:0005856; F:GO:0008299; F:GO:0016787	F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity; F:structural constituent of cytoskeleton; F:ATP binding; C:cytoplasm; C:actin filament; P:phagocytosis; P:isoprenoid biosynthetic process; P:skeletal myofibril assembly; F:hydrolase activity; P:muscle thin filament assembly
GSSPFG00002079001-PA	muscle	6	P:GO:0008299; F:GO:0016787	F:isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity; F:ATP binding; C:cytoplasm; C:cytoskeleton; P:isoprenoid biosynthetic process; F:hydrolase activity
GSSPFG00030827001-PA	myosin-1b isoform x2	1	F:GO:0000166	F:nucleotide binding
GSSPFG00028610001,3-PA	serine protease 33	1	F:GO:0008236 F:GO:0004180; P:GO:0006508;	F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00027555001-PA	thymus-specific serine protease	3	F:GO:0008236	F:carboxypeptidase activity; P:proteolysis; F:serine-type peptidase activity
GSSPFG00012077001,4-PA	trypsin-like serine partial	2	F:GO:0004252; P:GO:0006508 F:GO:0005524; P:GO:0015991; C:GO:0033180; P:GO:0046034;	F:serine-type endopeptidase activity; P:proteolysis
GSSPFG00027141001-PA	v-type proton atpase catalytic subunit a	5	F:GO:0046961	F:ATP binding; P:ATP hydrolysis coupled proton transport; C:proton-transporting V-type ATPase, V1 domain; P:ATP metabolic process; F:proton-transporting ATPase activity, rotational mechanism
GSSPFG00018804001,1-PA	zinc carboxypeptidase-like	1	F:GO:0004180	F:carboxypeptidase activity
GSSPFG00017650001-PA	zinc carboxypeptidase-like	2	F:GO:0004180; F:GO:0046872	F:carboxypeptidase activity; F:metal ion binding

Résumé

Les produits phytosanitaires de synthèse semblent désormais caducs et des solutions alternatives sont nécessaires pour contrôler les populations d'arthropodes ravageurs et vecteurs de maladies. Notre équipe s'intéresse dans ce cadre aux interactions entre le virus *Junonia coenia* densovirus (JcDV, ambidensovirus 1) et le lépidoptère ravageur de culture *Spodoptera frugiperda*. Nous avons montré dans ce modèle d'étude que JcDV une fois ingéré par la larve, traverse par transcytose l'épithélium intestinal (Wang *et al.*, J Virol, 2013) avant de se répliquer dans ses tissus cibles (trachées, hémocytes). En amont de l'épithélium intestinal, la première barrière que le virus doit franchir est la matrice péritrophique (MP), polymère d' α -chitine associée à des protéines glycosylées qui protège l'insecte de l'abrasion et des pathogènes à l'instar du mucus chez d'autres organismes. Les particules virales ingérées par la larve se trouvent concentrées sur cette matrice. Notre premier objectif a été de comprendre comment le virus franchit la MP. En basant notre stratégie sur la compétition entre le virus et des glycannes libres, essentiellement la N-acétylglucosamine (GlcNAc) composant majeur de la chitine, nous avons montré *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* que l'interaction du virus avec les glycannes est indispensable à l'infection, celle-ci étant toutefois plus efficace lorsque le virus n'est que semi-purifié. Ceci nous a conduits à rechercher des ligands du virus spécifiques de la MP. Les protéines hautement glycosylées aussi quelques protéines peu ou pas glycosylées qui sont reconnues par le virus sont en cours d'analyse protéomique. Nous chercherons à identifier en particulier la ou les protéines de la MP dont l'interaction avec JcDV peut expliquer la déstructuration de la MP observée lors de l'infection. Nous avons en outre entamé une analyse transcriptomique de l'intestin infecté vs. Non-infecté afin de comprendre l'arrêt de synthèse de la GlcNAc 24h post-infection. Enfin, nous avons entamé un travail comparable sur l'interaction entre JcDV et les radeaux lipidiques de la bordure en brosse de l'intestin moyen de la larve de *S. frugiperda*.

Mots Clés

Biocontrôle, Ravageur, Insecte, Glycannes, Matrice péritrophique, Bordure en brosse

Abstract

Synthetic pesticides are now obsolete and alternative solutions are needed to control arthropod populations that are pests and disease vectors of. Our team is interested in the interactions between the *Junonia coenia* densovirus (JcDV, ambidensovirus 1) and the plant-eating Lepidoptera *Spodoptera frugiperda*. We have shown in this study model that JcDV, when ingested by the larva, crosses by transcytosis the intestinal epithelium (Wang *et al.*, J. Virol, 2013) before replicating in its target tissues (tracheae, hemocytes). Upstream of the intestinal epithelium, the first barrier that the virus must cross is the peritrophic matrix (PM), chitin polymer associated with glycosylated proteins that protects the insect from abrasion and pathogens like mucus in other organisms. The viral particles ingested by the larva are concentrated on this matrix. Our first goal was to understand how the virus crosses the PM.

By basing our strategy on the competition between the virus and free glycans, essentially the major component of chitin N-acetylglucosamine (GlcNAc), we have shown *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* that the interaction of the virus with glycans is essential to the infection, which is however more effective when the virus is only semi-purified. This led us to look for specific PM virus ligands. The highly glycosylated proteins, also some low glycosylated proteins that are recognized by the virus, are undergoing proteomic analysis. In particular, we will try to identify the PM protein (s) whose interaction with JcDV may explain the destruction of the PM observed during the infection. We also started a transcriptomic analysis of the infected vs. uninfected gut to understand GlcNAc synthesis arrest 24h post-infection.

Finally, we began a similar work on the interaction between JcDV and the lipid rafts of the midgut brush border of the *S. frugiperda* larva.

Keywords

Biocontrol, Pest, Insect, Glycans, Peritrophic matrix, Brush border