



**HAL**  
open science

# Contrôle des éléments transposables et réponse aux infections virales chez *Drosophila*

Camille Mayeux

► **To cite this version:**

Camille Mayeux. Contrôle des éléments transposables et réponse aux infections virales chez *Drosophila*. Ecosystèmes. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10158 . tel-04700965

**HAL Id: tel-04700965**

**<https://theses.hal.science/tel-04700965>**

Submitted on 18 Sep 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.

**THESE de DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**École Doctorale n°341  
Évolution, Écosystème, Microbiologie, Modélisation**

**Discipline : Biologie Évolutive**

Soutenue publiquement le 26 septembre 2023, par :

**Camille Mayeux**

---

**Contrôle des éléments transposables et réponse aux  
infections virales chez *Drosophila***

---

Devant le jury composé de :

<b>BOIVIN, Antoine</b> Maître de Conférences, Sorbonne Université	Rapporteur
<b>GARCIA GUERREIRO, Maria del Pilar</b> Profesora, Universitat Autònoma de Barcelona	Rapporteuse
<b>NEGRE, Nicolas</b> Professeur, Université de Montpellier	Rapporteur
<b>GILBERT, Clément</b> Chargé de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay	Examineur
<b>LABBE, Pierrick</b> Professeur, ISEM, Université de Montpellier	Examineur
<b>VIEIRA, Cristina</b> Professeure, Université Lyon 1	Présidente
<b>VALIENTE-MORO, Claire</b> Maître de Conférences, Université Lyon 1	Membre invitée
<b>FABLET, Marie</b> Maître de Conférences, Université Lyon 1	Directrice de thèse



# REMERCIEMENTS

---

Je tiens à te remercier, **Marie**, tout d'abord pour m'avoir fait confiance tout au long de cet exercice qu'est le travail de thèse, de m'avoir donné cette opportunité alors que tout se faisait à distance à ce moment-là. Je te remercie sincèrement pour ton soutien et ta bienveillance, pour m'avoir guidé à travers ce projet tout en m'accordant une grande liberté et me poussant à toujours aller plus loin. Je te suis également reconnaissante de m'avoir fait découvrir le monde des chercheurs à travers les différents congrès auxquels j'ai pu assister. Tu as toujours été disponible et présente pour échanger et transmettre ton expertise scientifique, aussi bien dans la recherche que dans l'enseignement. Tes conseils avisés et ta rigueur me permettent aujourd'hui d'en sortir grandie après ces trois années à tes côtés.

Merci aux membres de mon jury de thèse de me faire l'honneur d'y participer. À **Antoine Boivin, Maria del Pilar Garcia Guerreiro** et **Nicolas Negre** de prendre le temps d'évaluer ce manuscrit de thèse durant les grandes vacances scolaires. Merci à **Clément Gilbert, Pierrick Labbé, Claire Valiente-Moro** et **Cristina Vieira** d'avoir accepté d'en faire partie.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, **Clément Gilbert, Rita Rebollo, Anna Zaidman** et **Feth el Zahar Haichar**, d'avoir pris le temps de suivre l'évolution de mes travaux et pour vos remarques constructives et enrichissantes qui m'ont grandement aidé lors de ma thèse.

Merci à tous les membres du **BF2i**, à **Federica Calavero** et **Aziz Heddi** de m'avoir accueilli dans vos locaux lorsqu'il fallait trouver une place pour mes manip. À **Agnès Vallier** pour tes conseils techniques, et à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion d'interagir. Surtout, merci **Rita Rebollo**, pour m'avoir accueilli chaleureusement, pour tous tes précieux conseils et m'avoir permis d'inaugurer votre Symbiotron, me permettant de continuer à faire (sur)vivre mes mouches et mes cellules !

Merci à toutes les personnes ayant permis le bon déroulement de ma thèse en m'aidant à travers les démarches administratives, aussi bien au sein du LBBE, du pôle Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1 ou de l'école doctorale E2M2. Plus particulièrement, merci à **Nathalie Arbasetti, Dhoirfya Diallo, Sahra Ferkous, Odile Mulet-Marquis** et **Aurélie Zerfass**.



Merci à toutes les personnes des **pôles informatique** et **biotechnologique**. À **Sonia Janillon** pour m'avoir initié à l'élevage de drosophile. À **Nelly Burlet** pour m'avoir aidé à me familiariser avec les techniques de biologie du LBBE. À **Corinne Regis**, pour ta gentillesse et ton sourire dès les premières heures de la journée. À toutes les autres personnes qui font également partie de cette équipe et qui nous permettent de réaliser nos beaux projets. Mais surtout merci **Hélène Henri**, tu as toujours su trouver du temps pour être là, pour me former et me partager ton expertise mais aussi pour m'aider à faire face aux aléas des manipulations expérimentales (car oui, c'est toujours trop facile si tout se passe sans embuche), notamment aux caprices de notre ami le robot !

Merci à tous les **membres du LBBE** avec qui j'ai pu interagir de près ou de loin, permettant d'échanger sur des sujets divers et d'en apprendre davantage sur des domaines variés : c'est un réel plaisir de travailler dans ce cadre de travail.

Merci à **l'équipe GEI**, je pense que nous avons la chance d'avoir une équipe aussi dynamique. Ce fût un plaisir pour moi d'organiser pendant cette dernière année nos réunions chaque semaine avec Chloé H., puis Sara, surtout avec autant de (presque) volontaires pour les présentations ! Plus particulièrement, merci **Natacha Kremer** pour tous tes précieux conseils et nos nombreuses discussions, mais également ta douceur et ta bienveillance. Je garderais en mémoire nos premiers moments d'infection dans cette 'magnifique' pièce du sous-sol du bâtiment Mendel que l'on devait partager avec d'autres petits insectes en tout genre.

Merci à notre **TE Team**, avec au cœur **Marie Fablet**, **Matthieu Boulesteix** et **Cristina Vieira**, puis les doctorants et stagiaires de plus ou moins long passage. Merci pour toutes nos discussions enrichissantes, ainsi que ces moments scientifiques et chaleureux que nous avons eu l'occasion de partager ensemble.

Merci à mes collègues de travail, aux anciens et nouveaux doctorants, à mes compagnons de route, mes ami.e.s du labo ! **Alicia**, **Anaïs**, **Benjamin**, **Chloé H.**, **Chloé G.**, **Daniel**, **Elodie**, **Marius**, **Miriam**, **Sara**, **Sylvain**, **Théo**, **Vincent**, **William**, **Zaïnab**, je pense que commencer (pour ceux qui ont eu cette 'chance') dans un magnifique open-space crée plus de liens que ce l'on peut imaginer. Mais finalement, c'est en bravant les forces de la nature, comme l'eau, le feu, ou même les animaux, tous ensemble que l'on finit par créer de belles histoires atypiques. Car oui, sans vous, cette aventure aurait été beaucoup moins palpitante ! Plus particulièrement, merci **Benjamin** pour ton humour sans faille, **Chloé H.** pour ta gentillesse et ton écoute, et **Vincent** pour nous avoir supporté lorsque tu étais toi-même en pleine rédaction de thèse. Merci **Anaïs**, ma partenaire de manip', pour ton aide si précieuse. Tu

as grandement participé à ce projet de thèse et je garderais en mémoire tous nos souvenirs passés aussi bien en élevage, en biologie moléculaire ou même biologie cellulaire pour faire face à la résistance des cellules. Merci **Zaïnab**, pour ton sourire et ta bonne humeur, pour nos moments partagés même lorsque le campus était presque désertique que ce soit durant cette étape de confinement ou lorsque nous profitons du calme des longues journées d'été (ou plutôt car tout le monde était en vacances ahah) ! Et merci **Sylvain**, pour tes nombreux conseils, aussi bien professionnels que personnels, pour ton aide en tout point. Ce fût un réel plaisir de travailler à vos côtés à tou.te.s.

Merci à vous trois, **Miriam, Daniel et Marius** : The Best Office, de son petit nom ! Ce fût un plaisir d'être avec vous dans ces nouveaux locaux, de pouvoir travailler dans le calme et le respect de chacun, mais aussi dans la bonne humeur, et même au-delà de ces murs : que ce soit autour d'un verre près des péniches, ou en vadrouilles pour découvrir de nouvelles destinations. Je reconnais avoir de la chance de pouvoir partager bien plus que du travail avec vous ! Alors gràcies, obrigada et merci !

Gràcies **Miriam**, la meva súper companya de pis, que m'acompanya cada dia, tan a l'oficina com a casa! Mai podré agrair-te prou el teu somriure, la teva amabilitat i el teu suport a qualsevol hora del dia o de la nit. Ets una persona extraordinària i sóc molt sincera quan et dic que gràcies a tu he aconseguit mantenir-me motivada: ets un autèntica lluitadora! I ara em tocarà millorar el meu català jaja

Merci à mes **ami.e.s**, cette seconde famille que l'on choisit, ce groupe de personnes aussi folles les unes que les autres qui font la beauté de notre amitié, et qui nous rappelle que la vie est pleine de moment de rire et de partage !

Merci à vous ma **famille**, vous êtes mon pilier, ma force. Merci pour votre soutien inconditionnel, votre amour et vos encouragements même si mon travail de thèse n'a pas toujours été un sujet facile à comprendre.

Merci à toi **Jules**, mon amour, pour ton soutien, ta patiente et ton écoute, il n'y a pas besoin de belles paroles pour savoir sur qui compter. Alors merci d'avoir été présent à chacune des étapes de ma thèse et d'être toujours à mes côtés, que ce soit littéralement ou même à 476 km.

Enfin, merci à toutes les personnes qui comptent encore et que j'aurais maladroitement oublié !



# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
1. Les éléments transposables.....	5
1.1. Classification des éléments transposables .....	5
1.1.1. Classe I : Retrotransposons .....	6
1.1.2. Classe II : Transposons à ADN .....	8
1.2. Diversité et abondance des éléments transposables .....	10
1.3. Éléments transposables : une source de variation génomique et phénotypique .....	12
1.3.1. Des effets bénéfiques : un rôle adaptatif .....	13
1.3.2. ... Mais aussi des effets néfastes .....	14
1.4. Mécanismes de régulation des éléments transposables .....	15
1.4.1. Interférence par l'ARN.....	15
1.4.1.1. Voie des siARN .....	18
1.4.1.2. Voie des piARN .....	19
1.4.1.3. Voie des miARN.....	22
1.4.2. Régulation par modification épigénétique.....	23
1.4.2.1. Méthylation de l'ADN .....	23
1.4.2.2. Modification des histones .....	23
2. Les virus : une menace omniprésente.....	25
2.1. Des protéines sacrifiées par le virus pour le virus ? .....	26
2.2. <i>Drosophila</i> : un modèle d'étude très bien connu.....	27
2.3. Défense immunitaire chez la drosophile .....	29
2.3.1. Voie des petits ARN interférents : siARN .....	30
2.3.2. Voie Jak/STAT .....	31
2.3.3. Voie Toll.....	32
2.3.4. Voie Imd.....	33
2.3.5. Voie de l'autophagie.....	33
3. Éléments transposables, virus et défense immunitaire : une interaction tripartite ? .....	36
3.1. Interférence entre petits ARN interférents .....	36
3.2. Production de petits ARN viraux .....	37
3.2.1. Rôle antiviral des piARN .....	37
3.2.2. Rôle antiviral des miARN .....	38
3.3. ARNi : régulation des éléments transposables et / ou virale ? .....	39
4. Objectifs de la thèse .....	41

<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>43</b>
1. <i>D. melanogaster</i> et <i>D. simulans</i> : deux espèces sœurs .....	43
1.1. <i>Drosophila</i> et éléments transposables .....	44
1.2. <i>Drosophila</i> : cortège symbiotique .....	46
2. Virus C de la Drosophile (DCV) .....	47
2.1. DCV : Cycle de réplication et transmission .....	48
2.2. DCV : Suppresseur viral versus défenses immunitaires.....	50
3. Article .....	52
3.1. Transposable elements are major players of the arms race between a virus and its <i>Drosophila</i> host .....	52
3.2. Matériels supplémentaires .....	65
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>87</b>
1. Virus : d'un point de vue biologique.....	88
1.1. Virus X de la Drosophile (DXV).....	88
1.1.1. DXV : Cycle de réplication et transmission .....	89
1.1.2. DXV : Réponses antivirales de l'hôte .....	89
1.2. Flock House Virus (FHV) .....	90
1.2.1. FHV : Structure génomique et réplication virale .....	90
1.2.2. FHV : Inhibition des défenses de l'hôte versus mécanismes antiviraux .....	92
1.3. Invertebrate Iridescente Virus 6 (IIV-6).....	94
1.3.1. IIV-6 : Génome et réplication.....	95
IIV-6 : Inhibiteur de la voie d'ARNi.....	96
1.3.2. IIV-6 : Défenses de l'hôte .....	97
2. Virus : d'un point de vue technique .....	98
3. Article .....	100
3.1. Transposable elements are modulated by various types of viruses in <i>Drosophila melanogaster</i> and <i>Drosophila simulans</i> .....	100
3.2. Matériels supplémentaires .....	120
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>135</b>
1. Réponses phénotypiques aux infections virales : variabilité selon les virus et les espèces hôtes 136	
2. DCV, DXV, FHV et IIV6 : génomes différents et réponses immunitaires variables .....	137
3. Modulation des quantités de transcrits d'ET par les infections virales .....	141
4. Modulation de la réplication virale par les éléments transposables .....	146
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>149</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>195</b>
1. Infections by Transovarially Transmitted DMelSV in <i>Drosophila</i> Have No Impact on Ovarian Transposable Element Transcripts but Increase Their Amounts in the Soma.....	195
2. <i>Curriculum Vitae</i> .....	207

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

---

## FIGURES

Figure 1 : Classification des éléments transposables chez les eucaryotes.....	7
Figure 2 : Distribution des éléments transposables dans la phylogénie des eucaryotes.....	11
Figure 3 : Dix points à connaître sur les éléments transposables (ET) : exemple des impacts directs et indirects des ET sur les génomes. ....	13
Figure 4 : Schéma de l'interférence par ARN chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	17
Figure 5 : Schéma de la production des piRNA dans la lignée germinale et dans les cellules folliculaires somatiques. ....	20
Figure 6 : Schéma du cycle de vie de <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	28
Figure 7 : Schéma de la voie antivirale d'ARN interférence (ARNi) chez les insectes.....	31
Figure 8 : Schéma des voies immunitaires innées antivirales chez les insectes diptères. ....	34
Figure 9 : Schéma des interactions étudiées au cours du projet de thèse. ....	41
Figure 10 : Schéma des principales étapes de préparation pour infection des drosophiles.....	47
Figure 11 : Schéma du génome du Virus C de la Drosophile (DCV). ....	48
Figure 12 : Schéma du cycle de réplication des Dicistroviridae. ....	49
Figure 13 : Génome à ARN double brin du Virus X de la Drosophile (DXV). ....	88
Figure 14 : Génome à ARN simple brin positif du Flock House Virus (FHV).....	91
Figure 15 : Schéma du cycle d'infection du FHV.....	92
Figure 16 : Schéma des étapes clés de l'immunité antivirale à base d'ARNi induite chez <i>D. melanogaster</i> par l'infection par le Flock House Virus (FHV). ....	93
Figure 17 : Schéma de la réplication des Iridoviridae. ....	96
Figure 18 : Heatmap des valeurs de log2 Fold Change entre les conditions infectées et contrôles (mock) pour les gènes impliqués dans les voies immunitaires chez <i>D. melanogaster</i> et <i>D. simulans</i> . ....	139
Figure 19 : Heatmap des valeurs moyennes de Log2 Fold Change de toutes les familles d'ET. ....	141

## TABLEAUX

Tableau 1 : Principales propriétés des petits ARN interférents.....	22
Tableau 2 : Principales caractéristiques du Virus C de la Drosophile (DCV), Virus X de la Drosophile (DXV), Flock House Virus (FHV) et Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6). ....	98



Les éléments transposables (ET) sont des séquences d'ADN ayant la capacité de se déplacer le long du génome, en augmentant parfois leur fréquence. Souvent considérés comme des parasites génomiques, le déterminisme qui guide leur activité et leur inhibition reste mal compris. Chez les insectes, les ET sont contrôlés par l'interférence par ARN (ARNi) : principalement par la voie des petits ARN interagissant avec les protéines PIWI (piRNA) dans les gonades, et par la voie des petits ARN interférents (siRNA) dans les tissus somatiques. Outre son rôle dans la régulation des ET, la voie des siARN est également la principale voie de réponse immunitaire contre les infections virales. Bien que les voies des siRNA et piRNA aient été précédemment décrites comme agissant de manière indépendante, il a été récemment démontré que des interactions entre ces deux classes de petits ARN interférents sont possibles en ce qui concerne la régulation des ET. L'objectif de ces travaux était de décrypter les impacts réciproques de l'infection virale sur le contrôle des ET et l'immunité antivirale chez la drosophile. Pour ce faire, nous avons généré des données RNA-seq et small RNA-seq d'ovaires et de carcasses de mouches infectées par quatre virus qui diffèrent par la structure de leur génome, leur hôte naturel et la réponse immunitaire déclenchée : Drosophila Virus C (DCV), Drosophila Virus X (DXV), Flock House Virus (FHV) et Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6). Tout d'abord, nous avons montré que l'infection par DCV affecte les quantités de transcrits d'ET de différentes manières entre espèces et tissus testés. En effet, l'infection virale est associée à une augmentation du nombre de transcrits d'ET dans les carcasses des deux espèces et dans les ovaires de *D. simulans*, tandis que l'effet inverse est observé dans les ovaires de *D. melanogaster*. En utilisant des souches transgéniques avec différents contenus génomiques d'ET dans un fond génétique constant, nous avons montré qu'une charge d'ET plus élevée était associée à une immunité antivirale plus efficace. Nous avons ainsi découvert que les ET jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire de la drosophile contre des virus naturels ayant une longue histoire co-évolutive. Ensuite, nous avons montré que les infections par DXV, FHV et IIV-6 modulent également les quantités de transcrits d'ET et impliquent d'autres voies immunitaires en plus de la voie de l'ARNi. Nous apportons une preuve supplémentaire que, comme *D. melanogaster*, *D. simulans* est un modèle pertinent pour l'étude des réponses aux infections virales, permettant d'observer des effets dépendant du tissu, du virus et de l'espèce. En lien avec DCV, nos résultats préliminaires obtenus avec DXV, FHV et IIV-6 confirment notre hypothèse selon laquelle une quantité élevée de transcrits d'ET est associée à une meilleure immunité antivirale. Dans l'ensemble, ce travail souligne l'importance d'étudier l'impact de l'infection virale dans différents fonds génétiques, par l'identification de ses conséquences sur les réponses immunitaires de l'hôte, que ce soit dans le contrôle des ET ou la réponse antivirale.

Mots-clés : élément transposable, infection virale, *Drosophila*, piRNA, siRNA





# ABSTRACT

---

Transposable elements (TEs) are DNA sequences with the ability to move along the genome, sometimes increasing in frequency. Often considered as genomic parasites, the determinism guiding their activity and silencing remains poorly understood. In insects, TEs are controlled by RNA interference (RNAi): mainly by the small RNA pathway interacting with PIWI proteins (piRNA) in gonads, and by the small interfering RNAs (siRNA) pathway in somatic tissues. In addition to its role in the regulation of TEs, the siRNA pathway is also the main pathway of the immune response against viral infections. Although the siRNA and piRNA pathways have been previously described to act independently, it has recently been shown that interactions between these two classes of small interfering RNAs are possible regarding the regulation of TEs. The aim of this work is to decipher the reciprocal impacts of viral infection on TE control and antiviral immunity in *Drosophila*. To this end, we generated RNA-seq and small RNA-seq data of ovaries and carcasses from flies infected with four different viruses that differ in their genome structure, natural host and immune response triggered: Drosophila Virus C (DCV), Drosophila Virus X (DXV), Flock House Virus (FHV) and Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6). First, we showed that DCV infection affects TE transcripts amount differently between species and tissues tested. Indeed, viral infection is associated with an increase in the number of TE transcripts in carcasses of both species and in *D. simulans* ovaries, while the opposite effect is observed in *D. melanogaster* ovaries. Using transgenic strains with different genomic TE content in a constant genetic background, we showed that a higher TE load was associated with more effective antiviral immunity. As a result, we discovered that TEs play a major role in the *Drosophila* immune response against natural viruses with a long co-evolutionary history. Moreover, we showed that DXV, FHV and IIV-6 infections also modulate TE transcript amounts and involve other immune pathways in addition to the RNAi pathway. We provide further evidence that, as *D. melanogaster*, *D. simulans* is also a relevant model for studying responses to viral infections, allowing tissue-, virus- and species-dependent effects to be observed. Regarding DCV, our preliminary results obtained with DXV, FHV and IIV-6 support our hypothesis that a high TE transcripts amount is associated with better antiviral immunity. Overall, this work highlights the importance of investigating the impact of viral infection in different genetic background, through the identification of its consequences on host immune responses, in TE control or antiviral response.

Keywords: transposable element, viral infection, *Drosophila*, piRNA, siRNA



# INTRODUCTION

---

A la fin des années 1940, Barbara McClintock met en évidence la présence d'éléments génétiques mobiles ayant la capacité d'impacter la coloration de grains de maïs (*Zea mays*) (McClintock, 1951). Elle décrit ces facteurs génétiques comme 'mobiles' en raison de leur habilité à modifier leur position et se déplacer le long du génome en réponse à des variations environnementales, modifiant parfois l'expression de certains gènes (McClintock, 1950, 1953, 1956).

Ces premières observations ont soulevé la possibilité que ces éléments mobiles puissent être à l'origine de modifications phénotypiques importantes et donc exercer une influence majeure dans le contrôle de l'expression des gènes. Toutefois, cette hypothèse a longtemps été considérée comme spéculative, faute de cas documentés. Ce n'est qu'en 1983 que Barbara McClintock reçoit, grâce à ces travaux, le prix Nobel de Physiologie ou Médecine. Il aura fallu attendre de nombreuses années et accumuler davantage de données pour que cette idée révolutionnaire soit acceptée et introduite dans de nouveaux concepts. Aujourd'hui, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence la présence de ces éléments mobiles au sein de la majorité des organismes eucaryotes (Lidholm et al., 1993; O'Brochta et al., 1994; Romans et al., 1998) et dans presque tous les génomes procaryotes. Ils sont néanmoins absents des génomes réduits des parasites apicomplexes (Hua-Van et al., 2011; Kissinger & DeBarry, 2011).

## 1. Les éléments transposables

Le terme 'élément transposable' (ET) (ou initialement *jumping gene* en anglais) désigne l'ensemble des séquences d'ADN mobile ayant la capacité de transposer, c'est-à-dire se déplacer, le long des chromosomes (Bourque et al., 2018; Mérel et al., 2020). Ils représentent une composante importante des génomes issus d'origines diverses (Deniz et al., 2019).

### 1.1. Classification des éléments transposables

Bien qu'ils ne partagent pas d'ancêtre commun exclusif (Hayward & Gilbert, 2022), les ET sont principalement regroupés selon des caractéristiques communes variées. La première classification a été proposée en 1989 par David Finnegan (Finnegan, 1989). Elle divise les ET en deux grandes classes selon la nature de leur intermédiaire de transposition. La première, regroupe les éléments de classe I, également appelés rétrotransposons, qui se mobilisent par

l'intermédiaire d'un ARN, qui est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) puis intégré à une autre position dans le génome de l'hôte. Cette caractéristique propre aux éléments de classe I correspond au mécanisme de "copier-coller". La seconde catégorie englobe les éléments de classe II, dits transposons à ADN, qui se mobilisent à travers un mécanisme de "couper-coller" en utilisant un intermédiaire d'ADN. Elle est composée de plusieurs groupes d'ET réunis uniquement par l'absence d'intermédiaire ARN dans leurs processus de transposition

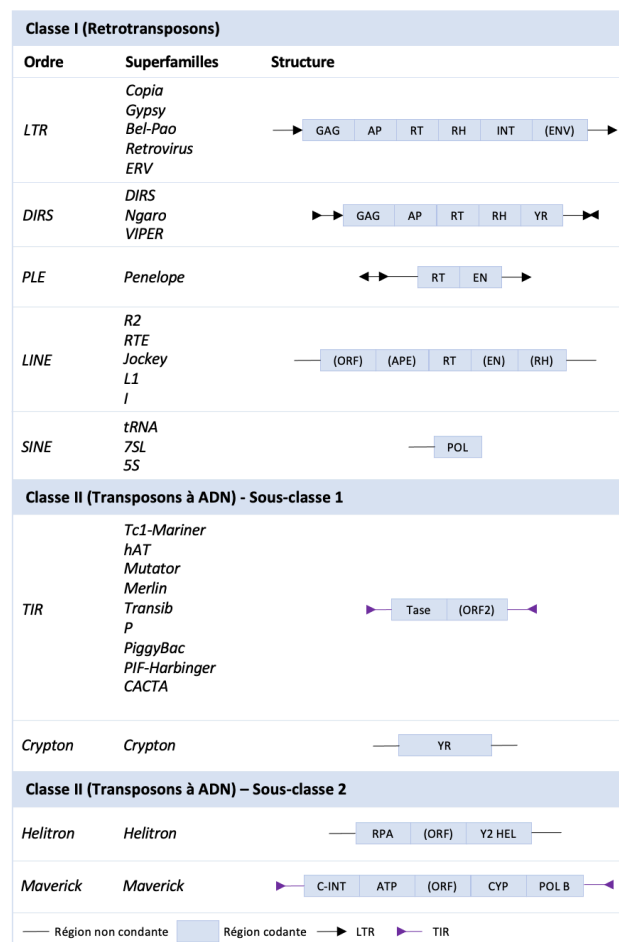
Force de débats et de nouvelles découvertes, notamment grâce au développement du séquençage, d'autres classifications ont été proposées, visant à améliorer et unifier celle initialement établie (Kapitonov & Jurka, 2008; Wicker et al., 2007). Reposant sur les critères de base de présence ou absence d'intermédiaires de transposition de l'ARN. La classification pour les ET eucaryotes tente de hiérarchiser les éléments mobiles selon des critères mécanistiques et enzymatiques (**Figure 1**). Par exemple, les superfamilles regroupent les ET selon des motifs et des signatures d'acides aminés. Une famille d'ET est quant à elle définie selon la règle 80-80-80 : les insertions sont de la même famille si elles mesurent plus de 80 pb et partagent à minima 80 % d'identité de séquence sur 80 % de leur longueur (Wicker et al., 2007). Une insertion correspond à une copie individuelle particulière, c'est-à-dire à un événement de transposition spécifique. Le génome de référence d'*Arabidopsis thaliana* compte par exemple 318 familles d'ET (Ahmed et al., 2011) ; celui *Anncaliia algerae*, un parasite microsporidien, en compte 240 différentes (Panek et al., 2014); et le génome de *Drosophila melanogaster* arbore 128 familles d'ET.

### **1.1.1. Classe I : Retrotransposons**

Cette première classe d'ET se transpose en ajoutant une copie de l'ET d'origine à un autre emplacement dans le génome de l'hôte, après conversion de l'intermédiaire ARN en molécule d'ADN par une transcriptase inverse. Les rétrotransposons sont subdivisés en cinq ordres, selon leur structure génomique, la phylogénie des transcriptases inverses et leurs mécanismes moléculaires : les rétrotransposons LTR (*Long Terminal Repeats*), les éléments de type DIRS (*Dictyostelium intermediate repeat sequence*), les éléments de type Pénélope (PLE), les LINE (*Long Interspersed Nuclear Elements*) et les SINE (*Short Interspersed Elements*) (Wicker et al., 2007).

Les rétrotransposons à LTR se caractérisent par la présence de longues répétitions terminales aux deux extrémités, où se trouvent également des séquences régulatrices. Ils se composent de deux cadres de lecture ouverte : le gène *gag* code les protéines de la capsid et le

gène *pol* code les enzymes nécessaires au cycle de réplication. Les rétrotransposons à LTR incluent également les rétrovirus endogènes (ERV) qui codent un troisième gène *env* : une glycoprotéine d'enveloppe leur permettant d'avoir un pouvoir infectieux (Weiss, 2006). Les ERV sont des séquences rétrovirales intégrées dans le génome de l'hôte. Par exemple, les éléments *17.6*, *297*, *gypsy*, *Idefix*, *nomad*, *Tom*, *rover* et *ZAM* ont été décrits dans le génome de *D. melanogaster*, qui contient environ 2% d'ERV au sein de l'euchromatine (Kaminker et al., 2002; Vidal et al., 2009). L'intégration de ces rétrovirus exogènes chez les vertébrés semblerait être en lien avec d'anciennes infections ayant franchi les barrières antivirales de l'hôte (W. E. Johnson, 2019). A l'inverse, les ERV d'insectes sont des rétrotransposons à LTR ayant acquis un gène d'enveloppe par fusion avec le gène *env* des Baculovirus, des virus à ADN double brin (ADNdb) infectant les invertébrés (Terzian et al., 2001).



**Figure 1 : Classification des éléments transposables chez les eucaryotes.**

Proposée par Wicker et al. (2007), cette classification divise les ET en deux grandes classes (classe I et classe II) selon la présence ou l'absence d'un ARN intermédiaire lors de la transposition. Les groupes sont ensuite divisés en sous-classes (uniquement la classe II), en ordres, superfamilles et familles (non représentés ici). Pour chaque ordre d'ET est représenté la structure génétique. Les éléments entre parenthèse ne sont pas communs à tous les ET d'un même ordre. AP : Protéinase aspartique, APE : Endonucléase apurinique, ATP : ATPase d'emballage, C-INT : C-intégrase, CYP : Cystéine protéase, EN : Endonucléase, ENV : Protéine d'enveloppe, GAG : Protéine de capse, HEL : Hélicase, INT : Intégrase, ORF : Cadre de lecture ouvert, POL : Promoteur de la polymérase III, POL B : ADN polymérase B, RH : RNase H, RPA : Protéine de réplication A, RT : Transcriptase inverse, Tase : Transposase, YR : Tyrosin recombinase, Y2 : YR avec motif YY. Figure adaptée de Wicker et al. (2007) et Merenciano (2020).

Les LINE sont de longs éléments nucléaires dispersés (~6 à 7 kb), ne possédant pas de LTR à leurs extrémités. Ils codent également leur propre transcriptase inverse, ce qui leur permet de transposer de manière autonome. Ils possèdent des régions non traduites (UTR : *Untranslated region*) à leurs extrémités, des séquences TSD (*Target Site Duplication*) et une queue poly(A) (Koito & Ikeda, 2013). En comparaison avec les LINE, les SINE sont des courtes séquences (80-500 pb), non codantes et donc non autonomes (Kramerov & Vassetzky, 2005, 2011). Ils dérivent de transcrits d'ARN de transfert ou d'ARN impliqués dans le spliceosome, une particule d'épissage. Ils utilisent la machinerie de transposition des LINE pour pouvoir se transposer, ayant des similitudes de séquences aux extrémités 3' et des préférences de sites d'intégration similaires chez certains mammifères (Okada & Hamada, 1997).

Les éléments de type DIRS et les éléments de type Pénélope (PLE) ont été décrits plus récemment. Les DIRS possèdent également une rétrotranscriptase, mais leur mécanisme d'intégration n'est pas le même car ils présentent des extrémités différentes des ET à LTR et des LINE. La rétrotranscriptase des PLE quant à elle est plus étroitement liée à la télomérase et ils codent pour une endonucléase.

Les familles d'ET de classe I ne sont pas distribuées de manière homogène au sein des génomes. Par exemple, les LINE-1 sont les rétrotransposons les plus abondants chez l'humain, représentant environ 17% du génome (Brouha et al., 2003). Chez *Drosophila*, ce sont les rétrotransposons à LTR qui sont les plus abondants (Kaminker et al., 2002), tandis qu'aucun DIRS et SINE n'a été détecté jusqu'à présent (Sessegolo et al., 2016). L'ordre PLE a été quant à lui découvert chez *Drosophila virilis* et a été détecté dans de nombreuses espèces eucaryotes, mais il se trouve être inégalement distribué au sein des différents génomes séquencés de drosophile (Vieira et al. 1998 ; Evgen'ev 2013).

### **1.1.2. Classe II : Transposons à ADN**

Les transposons à ADN sont répartis en deux sous-classes, chacune subdivisée en deux ordres : TIR et *Crypton* d'une part et *Helitron* et *Maverick* d'autre part. Le mécanisme "couper-coller" des ET de la classe II est généralement réalisé par une transposase, une protéine codée par le transposon qui catalyse l'extraction du transposon depuis le site donneur et sa réintégration dans un site cible du génome de l'hôte. Par ce mécanisme de transposition, la prolifération et l'augmentation du nombre de copies de transposons à ADN repose sur l'action opportune de leur transposase, utilisant les mécanismes de réplication et de réparation cellulaires (Feschotte & Pritham, 2007). Les éléments de la classe II sont largement actifs et répandus dans de nombreuses espèces d'archées, de bactéries et d'eucaryotes. En revanche, ils

sont devenus inactifs chez une grande partie des mammifères (Rodriguez-Terrones & Torres-Padilla, 2018). En comparaison avec le génome humain et celui de *D. melanogaster* qui sont majoritairement composés de rétrotransposons, le génome du poisson-zèbre (*Danio rerio*) est connu pour contenir une quantité importante d'éléments transposables de classe II (Feschotte and Pritham, 2007 ; Howe et al. 2013).

La première sous-classe regroupe des éléments codant pour une seule enzyme, la transposase DDE, délimitée par deux séquences répétitives courtes, des TIR (*Terminal Inverted Repeats*). Dû à leur simplicité et leur structure (2 à 7kb), ces éléments sont souvent comparés aux séquences d'insertions des bactéries et des archées (Siguier et al., 2015). Après reconnaissance des TIR, la transposase excise les deux brins d'ADN et insère le transposon à un nouvel endroit (Kojima & Jurka, 2011; Yuan & Wessler, 2011). La transposase des éléments TIR est un gène parmi les plus anciens et abondants sur terre, ce qui fait des éléments TIR les ET les plus diversifiés et répandus (Arkhipova, 2017; Aziz et al., 2010). Les *Cryptons* sont, eux, décrits de façon très rare chez les eucaryotes. D'autre part, en comparaison avec les SINEs, les éléments transposables miniatures à répétitions inversées (MITE) sont également de courts transposons à ADN délimités par des TIR, dépourvu de régions codantes (Bureau & Wessler, 1994).

Les ordres de la deuxième sous-classe sont composés de transposons ayant un type de réplication spécifique : ils se transposent un coupant un seul brin d'ADN. Les *Helitron* sont principalement des éléments non autonomes, dépourvus de TIR (Thomas & Pritham, 2015). Les *Helitron* autonomes semblent impliquer un mécanisme de mobilisation qui utilise un système de réplication circulaire de l'ADN (Kapitonov & Jurka, 2001). Les *Helitrons* sont les éléments de la classe II les plus abondants avec les TIR chez la drosophile (Craig, 2015), ainsi que chez *A. thaliana* (Ahmed et al., 2011). À l'inverse, ils sont généralement très peu abondants chez les mammifères (Kojima, 2018). Les éléments de la famille *Mavericks* sont exceptionnels en raison de leur grande taille (15-20 kb) : ce sont de longs transposons flanqués par de longues TIR de 400-700 pb (Haapa-Paananen et al. 2014). Ils présentent une grande complexité en comparaison avec les autres éléments : ils possèdent parfois jusqu'à vingt gènes codant pour des protéines (Feschotte & Pritham, 2005; Pritham et al., 2007). Il a également été mis en évidence qu'ils présentent des similitudes avec certains groupes de virus à ADNdb (Koonin & Krupovic, 2017; Yutin et al., 2015). Tout comme ces derniers, ils codent leur propre ADN polymérase et intégrase, créant des duplications de sites cibles lors de l'intégration chromosomique (Kapitonov & Jurka, 2006). Les *Mavericks* n'ont pas été détectés dans les génomes des mammifères (Chalopin et al., 2015; Pritham et al., 2007).



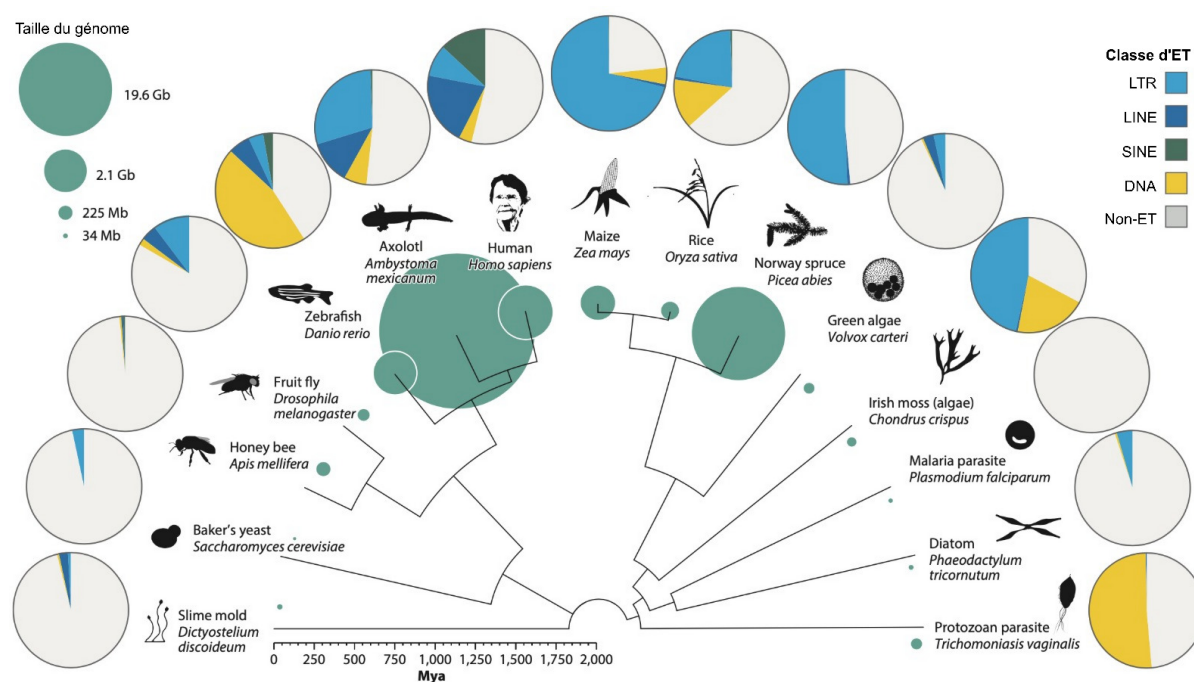
## 1.2. Diversité et abondance des éléments transposables

Globalement, les ET varient en quantité et en activité au sein d'un hôte, constituant par exemple environ 20% du génome de *D. melanogaster* et 46% du génome humain (Consortium & others, 2001; C. Vieira et al., 1999). En comparaison, aucun ET n'a été observé dans le génome de quelques protistes apicomplexes tels que les parasites *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Encephalitozoon intestinalis* ou *Theileria parva* (Corradi et al., 2010; Gardner et al., 2002; Kissinger & DeBarry, 2011). Ainsi, la part occupée par les ET et leur famille dans le génome diffère entre espèces mais peut également varier entre taxons étroitement apparentés, n'étant pas généralement conservés comme les gènes. Par exemple, le génome du maïs est occupé par plus de 80% d'ET (Schnable et al., 2009) contre 10% chez *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). D'autre part, depuis la divergence entre l'homme et le chimpanzé il y a environ six millions d'années, ces derniers possèdent deux familles de rétrotransposons supplémentaires par rapport au génome humain (Polavarapu, Bowen, et McDonald 2006).

La taille du génome et le contenu en ET sont également corrélés (Biémont & Vieira, 2006; Tenaillon et al., 2010). Il a été observé que *E. intestinalis* et *T. parva*, dépourvus d'ET, possèdent deux des plus petits génomes connus des eucaryotes (Corradi et al., 2010; X. Guo & Silva, 2008) ; tandis que certains génomes de vertébrés et végétaux sont très volumineux, du fait de l'accumulation rapide d'ET (El Baidouri & Panaud, 2013; Kapusta et al., 2017; Nowoshilow et al., 2018). L'évolution de la taille du génome semble également être associée aux taux d'élimination des éléments répétés, tel que cela a pu être observé chez les salamandres qui présentent un grand génome et un taux de délétion d'ADN non essentiel faible (Frahry et al., 2015).

La diversité des ET n'est cependant pas reliée à la proportion et la complexité de l'organisme (Wells & Feschotte, 2020) (**Figure 2**). Cette diversité peut être influencée par de nombreux facteurs tels que la structure des ET, leurs mécanismes et taux de transposition, leur taille, la structure génomique ou encore la localisation des copies. Largement distribués dans les génomes eucaryotes, il a été observé que les sites d'insertions d'ET n'étaient généralement pas définis aléatoirement. Cela peut profondément influencer le devenir et la capacité de l'ET à créer des mutations (Cai et al., 2022; Catlin & Josephs, 2022; Sultana et al., 2017). Par exemple, certains ET vont généralement se situer loin des gènes, dans des régions à faible taux de recombinaison telles que les régions hétérochromatiques, péricentrométriques et télomériques (Arkhipova, 2018; Wicker et al., 2018). Les insertions semblent parfois être

guidées par des forces sélectives opposées qui pourraient permettre d'atténuer les effets délétères des ET tout en conservant leur capacité de transcription favorisant leur propagation rapide, ou correspondre à une contre-sélection des insertions dans les autres régions (Bourgeois & Boissinot, 2019; Edger et al., 2017; X. Zhang et al., 2020). Dans le cas des espèces de moisissures et de levure de bourgeonnement, l'évolution convergente de ces dernières a permis aux rétrotransposons d'être transcrits, sans altérer l'expression du gène hôte, en ciblant les régions euchromatiques situées en amont des gènes transcrits par l'ARN polymérase III (S. Cheung et al., 2018; Spaller et al., 2016). De même, certaines familles d'ET semblent être préférentiellement situées dans les régions 5' de régulation des gènes ; c'est notamment le cas de l'élément P chez la drosophile (Spradling et al., 2011), des rétrotransposons L1 dans le génome humain (Sultana et al., 2019) ou des éléments Mutator (*Mu*) chez le maïs (S. Liu et al., 2009).



**Figure 2 : Distribution des éléments transposables dans la phylogénie des eucaryotes.**

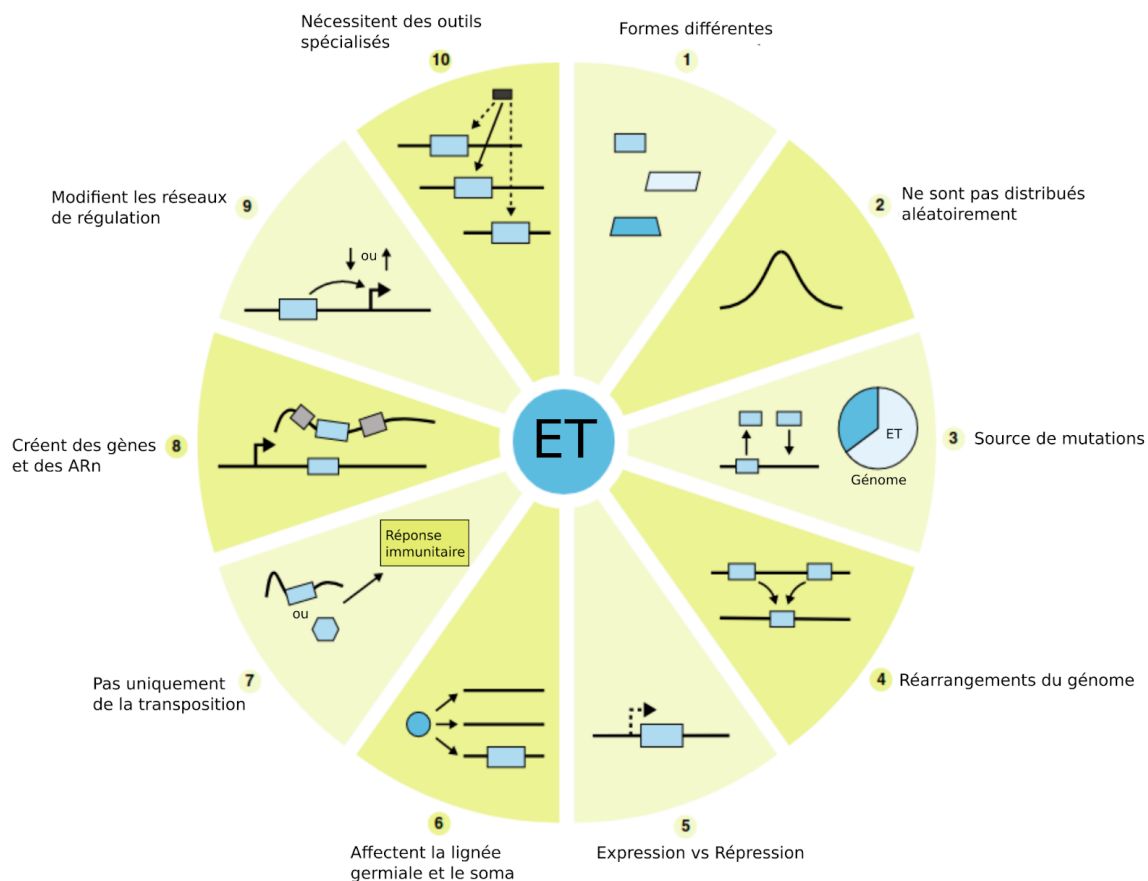
Les cercles verts représentent la taille du génome de référence. Les rétroéléments YR (tyrosine recombinase) ont été inclus avec les LTR et tous les éléments de classe II sont inclus dans la classe ADN. Les données proviennent des fichiers de sortie RepeatMasker du génome. LINE : long interspersed nuclear element ; LTR : long terminal repeat ; SINE : short interspersed nuclear element ; TE : transposable element. Figure adaptée de Wells & Feschotte (2020).

Plusieurs génomes tels que celui de la drosophile, du maïs ou du blé présentent une corrélation positive entre les taux de recombinaison et la distance du centromère (Akhunov et al., 2003; Begun & Aquadro, 1992; Schnable et al., 2009). Cependant, cette corrélation n'est pas toujours présente et les ET ne suivent pas toujours le même schéma d'insertion. Ils peuvent par exemple cibler les centromères, comme il a été décrit chez *Arabidopsis lyrata* avec

l'élément *Tall* (Tsukahara et al., 2012). Les sites d'insertion des ET peuvent également être contrastés selon le type d'ET. Par exemple chez l'homme, les éléments *Alu* s'accumulent davantage dans les régions à forte recombinaison et riches en gènes (Witherspoon et al., 2009) ; alors que l'abondance en éléments L1 LINES est décrite comme étant négativement corrélées avec le taux de recombinaison (Jensen-Seaman et al., 2004). L'insertion dans des points chauds de recombinaison (hotspot), c'est-à-dire de courtes régions (50 à 100 kb) où le taux de recombinaison est plus élevé que dans les régions environnantes, a également été décrit chez des organismes tels que les oiseaux du genre *Ficedula* et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Duret, Marais, et Biémont 2000 ; Myers et al. 2008 ; Kawakami et al. 2017 ; Laricchia et al. 2017). Quoi qu'il en soit, le type, la localisation et le nombre d'insertions de séquences répétées au sein du génome de l'hôte font des ET une source de variations génomiques, pouvant avoir des conséquences majeures sur la régulation, l'expression et la fonction des gènes (Bourgeois & Boissinot, 2019).

### **1.3. Éléments transposables : une source de variation génomique et phénotypique**

Depuis leur découverte, l'impact que les ET peuvent avoir sur leurs hôtes à divers niveaux demeure un sujet controversé au sein de la communauté scientifique (**Figure 3**). Les ET sont la cible de contrôles très stringents, par exemple, via des modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ADN ou modification des histones selon l'organisme (Lister et al. 2008 ; Rebollo et al. 2011 ; Sienski, Dönertas, et Brennecke 2012). Ces modifications épigénétiques sont sensibles à l'environnement qui peut altérer et influencer la structure ainsi que les réseaux d'expression des gènes à travers l'induction ou la répression de l'activité de mobilisation des ET (Fablet & Vieira, 2011). Le spectre des effets dû à ces modifications est ainsi très variable (fonctionnels, régulateurs et structuraux) grâce à leur capacité à influencer des caractéristiques importantes, étant impliqués dans l'évolution d'un grand nombre de processus biologiques des eucaryotes (Almojil et al., 2021). Ils peuvent être à la fois moteurs de l'évolution et des mutagènes potentiellement nocifs (Biémont, 2010; Bourque et al., 2018).



**Figure 3 : Dix points à connaître sur les éléments transposables (ET) : exemple des impacts directs et indirects des ET sur les génomes.**

Les éléments transposables (ET) sont représentés par des boîtes bleues, les exons par des boîtes grises, et une lecture de séquençage par une boîte noire. Les flèches à angle droit symbolisent les promoteurs des gènes ou des ET. Figure adaptée de Bourque et al. (2018).

### 1.3.1. Des effets bénéfiques : un rôle adaptatif

Les premières preuves d'effets bénéfiques des ET ont été rapportées dans les années 90. En effet, les ET furent décrits comme des éléments régulateurs de gènes chez les primates (Samuelson et al., 1990) ou protecteur des extrémités des chromosomes cassés chez la drosophile (Biessmann et al., 1992). Par la suite, de nombreuses études ont apporté d'autres éléments mettant en évidence le rôle bénéfique pour l'hôte des ET dans la régulation des gènes ainsi que dans le maintien de l'intégrité des centromères et des télomères chez certaines espèces (Ali et al., 2021; Pardue & DeBaryshe, 2003; L. H. Wong & Choo, 2004).

La modification de l'expression des gènes et l'altération épigénétique qu'induisent les ET font d'eux des acteurs de la variation et de la diversité phénotypique et adaptative (Brosh et al., 2022; Cai et al., 2022; Domínguez et al., 2020; Lisch, 2013; Merenciano et al., 2016; Niu et al., 2019; Quadrana et al., 2016; Rech et al., 2019; Schrader & Schmitz, 2019). Un exemple connu est le phénotype dit "mélanisme industriel" de la phalène du bouleau, un polymorphisme

de couleur ayant été induit par l'insertion intronique d'un transposon ADN ayant entraîné une augmentation des quantités de transcrit du gène *cortex* (Hof et al., 2016). Certaines souches de *D. melanogaster* ont par exemple acquis une résistance accrue aux insecticides, dû à l'insertion du rétrotransposon à LTR *Accord* dans la région régulatrice 5' du gène *Cyp6g1* (H. Chung et al., 2007; Daborn et al., 2002). De nouvelles insertions d'ET peuvent également conduire à l'apparition de nouvelles fonctions ou de nouveaux gènes (X. Song & Cao, 2017; Sundaram & Wysocka, 2020), notamment en modulant la régulation en jouant le rôle de promoteur (Fablet et al., 2009; Ullastres et al., 2021). Chez les mammifères, un exemple très célèbre est celui du gène de la *syncytine* qui est essentiel à formation du placenta et qui correspond à un ancien gène d'ET (Mi et al., 2000). Chez les plantes, la transition des fleurs femelles aux fleurs mâles des melons est due à l'insertion d'un ET dans le promoteur d'un facteur de transcription qui propage la méthylation de l'ADN : l'expression du gène (*CmWIP1*) conduit au développement de fleurs mâles unisexuées (A. Martin et al., 2009). Chez *Drosophila miranda*, la détermination de nouveaux chromosomes sexuels est également dirigée par des ET et les marques épigénétiques associés au chromosome néo-Y (Zhou & Rana, 2013). Un autre exemple est celui d'un ancien ERV humain, *MER41.AIM2*, qui semble se comporter comme un 'enhancer', c'est-à-dire un activateur, et fournir une susceptibilité aux interférons, des protéines produites à la suite d'une infection virale (Chuong et al., 2016). Les découvertes liées aux ET montrent donc qu'ils peuvent avoir des effets bénéfiques potentiels.

### **1.3.2. ... Mais aussi des effets néfastes**

Néanmoins, la grande majorité des insertions d'ET a toujours été décrite comme neutre ou délétère pour l'hôte (Doolittle & Sapienza, 1980; Hickey, 1982; Orgel & Crick, 1980; Strobel et al., 1979). Découverte dans les années 70 chez la drosophile, la dysgénésie hybride est un des phénomènes ayant permis d'apporter des preuves aux théories de McClintock, qui visait notamment à expliquer l'expression ou la répression de gènes transmise d'une génération à l'autre par des phénomènes de transposition. La descendance issue d'un croisement où, le père possède l'élément P et non la mère, présente un certain nombre d'anomalies, telles que la stérilité par dysgénésie gonadique ou des mutations et taux de recombinaison élevées (Hill et al., 2016). Cette dysgénésie hybride est due à des dommages causés à l'ADN par la transposition active de l'élément P dans la lignée germinale (Bregliano et al., 1980; Kidwell et al., 1977). Lors de ce phénomène, l'absence de régulation par une sous-classe spécifique de petits ARN non codants, décrit plus en détail en partie 1.4.2., entraîne un taux élevé de

mobilisation de cet élément P (Chambeyron et al., 2008; Jensen et al., 2008; Todeschini et al., 2010).

Actuellement, l'étude de la transposition d'ET est un domaine de recherche actif chez l'humain car ils sont liés à plus de 124 maladies humaines, dont la mucoviscidose et le développement de certains cancers (Burns, 2017; J.-M. Chen et al., 2005; Hancks & Kazazian, 2016; Lannoy & Hermans, 2016; Machado et al., 2007). Par exemple, Kazazian Jr et al. (1988) ont découvert que l'hémophilie A avait été provoquée par l'insertion d'une copie d'un ET au sein d'un gène. Récemment, Lapp et Hunter (2019) ont démontré l'association entre des maladies psychiatriques liées au stress et au développement neurologique et la régulation des ET ; cette dernière étant spécifique au stade de développement et sensible aux facteurs personnels et environnementaux. Il a également été observé que l'activation d'un rétrovirus endogène serait capable d'activer des proto-oncogènes dans les lymphomes humains (Babaian et al., 2016) ; ou de déclencher la sénescence cellulaire et le vieillissement des tissus chez l'homme lors d'une inactivation (X. Liu et al., 2023).

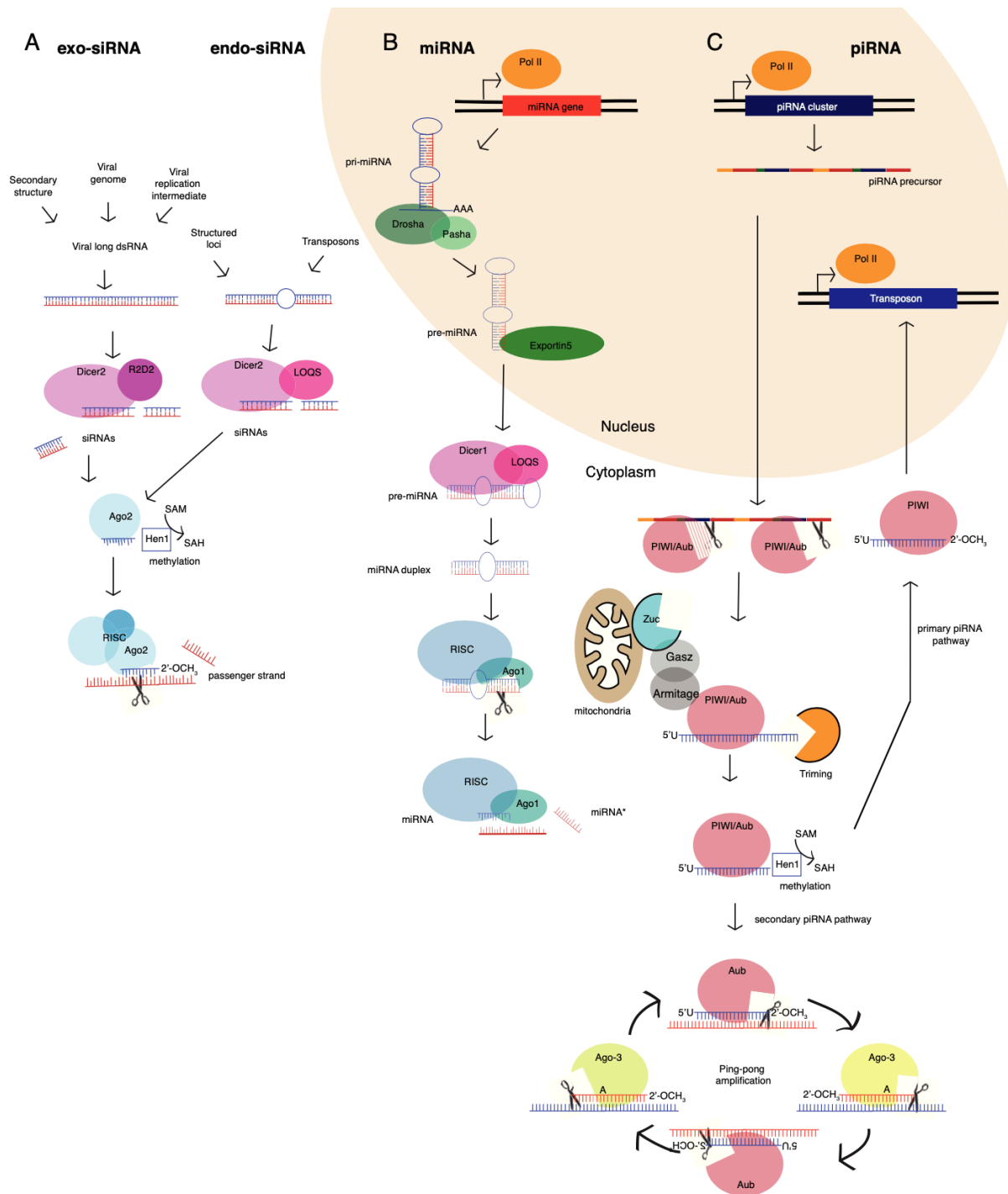
#### **1.4. Mécanismes de régulation des éléments transposables**

Du fait de leur prévalence et leurs effets délétères, et pouvant être également considéré comme de potentiel pathogène, il est crucial de comprendre comment la mobilisation des ET est régulée dans les organismes eucaryotes et comment l'hôte assure le maintien de la stabilité de son génome. En effet, les ET génèrent en permanence de nouvelles copies, une activité incontrôlée des éléments pourrait donc compromettre l'intégrité du génome de l'hôte et sa survie. Ainsi, différents mécanismes de régulation de la transposition des ET ont été sélectionnés, par l'hôte, mais aussi par les éléments eux-mêmes (P.-S. Hsu et al., 2021; Skvortsova et al., 2018; Slotkin & Martienssen, 2007). Ces mécanismes, agissant aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, sont variables selon les espèces et remplissent également d'importantes fonctions cellulaires, faisant intervenir un grand nombre de facteurs (Almeida et al., 2022; Tie & Rowe, 2017).

##### **1.4.1. Interférence par l'ARN**

L'interférence par ARN (ARNi) est un mécanisme essentiel assurant la régulation et le contrôle des ET. L'ARNi, initialement décrite chez les plantes puis chez *D. melanogaster* et *C. elegans* (Fire et al., 1998; X.-H. Wang et al., 2006), agit chez tous les organismes eucaryotes uni- et multicellulaires (Ghildiyal & Zamore, 2009). Elle repose sur la production de petites molécules d'ARN non codantes régulant l'expression ou la traduction des gènes en ciblant de

manière complémentaire les molécules d'ARN (Fablet, 2014; Mussabekova et al., 2017). L'ARNi comprend trois voies, associées à trois catégories de petits ARN : les petits ARN interférents (siARN), les ARN interagissant avec les protéines PIWI (piRNA) et les microARN (miARN). Leur action passe par une liaison à une protéine de la famille Argonaute (Ago) et elles peuvent agir de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Elles se différencient par leur taille (entre 20 et 30 nt), l'origine de leurs guides ARN ou également leur machinerie de production (Ghildiyal & Zamore, 2009) (**Figure 4** et **Tableau 1**).



**Figure 4 : Schéma de l'interférence par ARN chez *Drosophila melanogaster*.**

Représentation schématique de la voie des exo- et endo-siARN (A), de la voie des miARN (B), et la voie des piARN (C). D'après Petit (2016).

Pour maintenir une stabilité génomique et transcriptomique, ces petites molécules ont la capacité de guider les protéines Argonautes et cibler les transcrits et la chromatine avec une complémentarité de séquence. Au niveau transcriptionnel, les complexes ARN/Argo façonnent un environnement chromatinien répressif en favorisant le recrutement de complexes DNMT ou de remodelage de la chromatine, et en reconnaissant les transcrits complémentaires de manière



co-transcriptionnel et spécifique (Czech et al., 2018). D'un autre côté, la dégradation des transcrits au niveau post-transcriptionnel se fait préférentiellement dans le cytoplasme, ce qui semble empêcher aux transcrits d'ET de terminer leur cycle répliatif et de générer de nouvelles copies au sein du génome hôte (Czech & Hannon, 2016). Un point majeur de la voie des petits ARN est qu'elle représente également un mécanisme de défense antivirale chez de nombreux organismes, tels que chez les invertébrés, les plantes et les champignons (Bronkhorst et al., 2014; Ding & Voinnet, 2007).

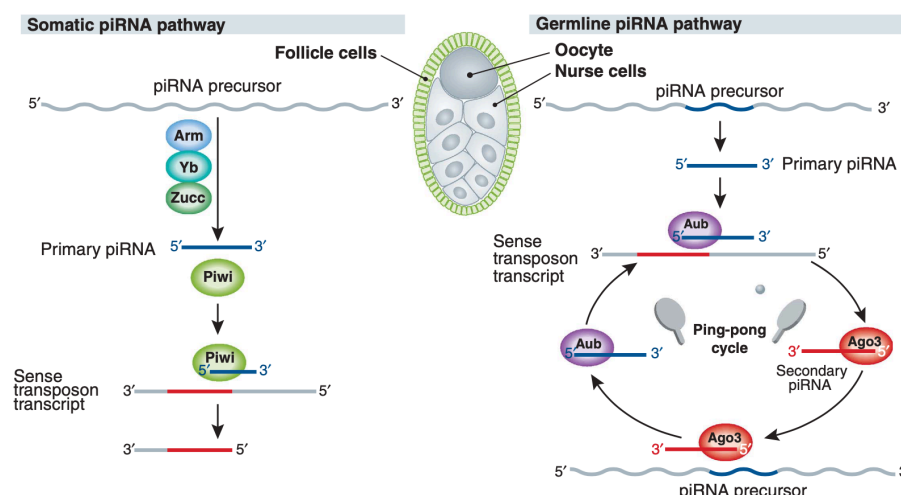
#### 1.4.1.1. Voie des siARN

La voie des siARN représente l'une des deux voies contrôlant les ET chez la drosophile dans les tissus somatiques majoritairement (W.-J. Chung et al., 2008; Kawamura et al., 2008; Okamura et al., 2008), et l'une des principales réponses immunitaires systémiques contre les infections virales chez les insectes (van Mierlo et al. 2012; Kemp et al. 2013 ; Karlikow, Goic, et Saleh 2014). Ainsi, les précurseurs des siARN peuvent être d'origine endogène (endo-siARN), tels que des ET, et être impliqués dans la répression des ET et la régulation des gènes (W.-J. Chung et al., 2008; Claycomb, 2014; Czech et al., 2008; Ghildiyal et al., 2008; Kawamura et al., 2008; Okamura et al., 2008), ou produits à partir de sources exogènes d'ARN double brin (ARNdb), tels que des virus à ARN ou ADN (Gammon & Mello, 2015) (**Figure 4.A**). L'activation de cette voie commence par la reconnaissance d'un ARNdb. Il est détecté par la ribonucléase Dicer-2 (Dcr-2) dans le cytoplasme et clivé en duplex de siARN de 21 nt (Bernstein et al., 2001). L'un des brins de siARN, le brin 'guide', est chargé sur la protéine argonaute-2 (Ago2) pour former un complexe pré-RISC (RISC : complexe de répression d'ARN interférence) avec l'aide des cofacteurs de liaison R2D2 et *Loquacious*, Loqs-PD ou Loq-S (pour les endo-siARN ou exo-siARN respectivement) (X. Liu et al., 2006; Marques et al., 2010; Nayak et al., 2013; S. Yamaguchi et al., 2022). Le second brin du duplex, le brin 'passager', est éjecté et dégradé, permettant la stabilisation du brin guide par la 2'-O-méthylation à l'extrémité 3' du petit ARN par la méthyltransférase Hen1 (Horwich et al., 2007). Une fois mature, le complexe RISC cible les fragments ARN. Le clivage est réalisé par Ago2 par complémentarité de séquence au siARN chargé, de manière spécifique et avec un appariement parfait des bases (Ding, 2010). La dégradation des molécules d'ARN clivées est finalement réalisée par l'activité de l'exoribonucléase XRN1 et de l'exosome (Orban & Izaurralde, 2005).

### 1.4.1.2. Voie des piARN

Initialement décrite dans les gonades de *D. melanogaster*, la voie des piARN est la principale voie contrôlant les ET chez la drosophile dans les cellules germinales, et la seconde dans certaines cellules somatiques (Aravin et al., 2001; Malone et al., 2009; M. C. Siomi et al., 2011) (**Figure 4.C. et 5**). Elle se différencie des voies des miARN et siARN par son processus de biogenèse qui est associé au clade PIWI de la famille des protéines Ago, et un mécanisme indépendant de Dicer (Czech et al., 2018). Les petits ARN sont produits à partir de précurseurs monocaténaire et sont plus longs, entre 23 et 30 nt chez *Drosophila*, pouvant être compris entre 20 et 35 nt chez d'autres organismes (Brennecke et al., 2007). La réduction de l'expression des transposons peut avoir lieu au niveau transcriptionnel en ciblant les transcrits naissants d'ET par le biais de mécanismes de modification de la chromatine, c'est-à-dire en déclenchement l'hétérochromatisation des séquences d'ET correspondantes par le biais de H3K9me3 (Iwasaki et al., 2016; Le Thomas et al., 2013; Sienski et al., 2012) (ou au niveau post-transcriptionnel (Yamashiro & Siomi, 2018). La biogénèse de cette voie a initialement été décrite en une voie dite primaire avec des piARN primaires d'une part, et une voie d'amplification avec des piARN secondaires (ou boucle ping-pong) d'autre part.

L'initiation de la voie primaire des piARN se fait par de longues molécules d'ARN simple brin transcrites à partir de clusters de piARN qui correspondent à des loci génomiques spécifiques, enrichi en séquences dérivées d'ET (Haase, 2022). De ce fait, ils représentent une source de données pour la reconnaissance et le contrôle des ET. Toutefois, la transposition d'un nouvel ET dans le génome ne semble pouvoir avoir lieu qu'après intégration de sa séquence dans un cluster piARN afin d'avoir les piARN nécessaires pour cibler cet ET. Une fois les longs transcrits précurseurs de piARN transportés dans le cytoplasme, ils sont clivés en pré-piARN par l'endonucléase Zucchini (Zuc) qui forme également l'extrémité 5', et sont chargés sur les protéines PIWI Aubergine (Aub) ou *piwi* (Izumi et al., 2020). Une fois chargés, l'extrémité 3' des précurseurs clivés va être coupée et méthylée en 2'-O pour former les piARN matures et augmenter leur stabilité (Hayashi et al., 2016; Yashiro et al., 2018). Par la suite, le complexe RISC chargé de piARN mature va être importé dans le noyau et inhiber la transcription des ET au niveau transcriptionnel.



**Figure 5 : Schéma de la production des piRNA dans la lignée germinale et dans les cellules folliculaires somatiques.** Dans la lignée germinale, les piARN sont générés par un cycle d'amplification des piARN dépendant de Aub et Ago3, tandis que dans les cellules somatiques, la biogenèse se produit par une voie dépendante de Piwi et indépendante de Aub et Ago3. D'après de Zamore et al. (2010).

La voie d'amplification des piARN est activée par la protéine Aub chargée qui va cliver l'ARN cible au niveau du dixième nucléotide du brin d'ARN sens. Le fragment piARN sens clivé va être chargé sur la protéine Ago3 qui va pouvoir être guidé par le piARN et cibler l'ARN antisens par complémentarité de 10 nt (B. W. Han et al., 2015; Mohn et al., 2015). Les piARN antisens produits vont par la suite se lier à *piwi* ou Aub et vont à nouveau entrer dans la boucle d'amplification. La transmission maternelle de piRNA secondaires liés à Aub représente aussi des substrats pour la boucle de ping-pong. La voie des piARN secondaires présente une "signature ping-pong" caractéristique, qui correspond à un enrichissement des chevauchements de 10 nt entre les brins sens et antisens des piARN (Antoniewski, 2014). De plus, les piARN dépendants de la boucle ping-pong liés à Aub et *piwi* présentent un biais de séquence pour une uridine à l'extrémité 5' (U1), tandis que ceux liés à Ago3 présentent préférentiellement une adénosine en position 10 (A10) (Gunawardane et al., 2007). La voie des piARN secondaires est donc une série de clivages réciproques qui amplifie la production de piARN et ainsi la réponse basée sur ces petits ARNs contre les ET au niveau post-transcriptionnel (Czech & Hannon, 2016; W. Wang et al., 2015).

Bien que considérées comme gardiennes du génome du fait de leur rôle conservé dans les cellules germinales, les protéines PIWI auraient pu avoir des fonctions indépendantes du maintien de la stabilité génomique de la lignée germinale et de la formation des cellules germinales (Harris & Macdonald, 2001; Ross et al., 2014). En effet, l'intervention de la voie des piARN dans les cellules somatiques a été décrite chez de nombreux organismes mais reste un sujet controversé, pouvant correspondre à des phénomènes d'adaptations spécifiques et individuelles à certaines espèces (Horjales et al., 2023; Rozhkov et al., 2013). Par exemple, des

études indiquent que des piARN sont exprimés de manière spécifique au sein de nombreux tissus somatiques humains, participant à divers cancers, en inhibant l'apoptose et en favorisant la prolifération cellulaire (Jiang et al., 2017; J. H. Lee et al., 2006) et diverses maladies neurologiques, cardio-vasculaires, et des voies urinaires (Chavda et al., 2022; J. Zhang et al., 2023). Le rôle essentiel de PIWI a notamment été décrit dans la pathogenèse et la communication intracellulaire de la maladie de Chagas, induite par le parasite *Trypanosoma cruzi* (Garcia-Silva et al., 2014; Moreira et al., 2019). Outre ces études, Yao et al. (2023) tentent d'examiner le rôle émergent des piARN dans certaines maladies humaines respiratoires. Chez les arthropodes, l'étude de l'expression de différents gènes PIWI retrouvés dans les tissus somatiques dans 16 espèces différentes suggère que cette voie soit répandue chez les arthropodes, étant fortement associée à la présence de piARN somatiques (Lewis et al., 2018). Ces mêmes auteurs proposent que la distribution phylogénétique des piARN somatiques soit d'origine ancestrale pour tous les arthropodes ou que leur acquisition soit indépendante selon les différentes lignées.

Chez *D. melanogaster*, aucun piARN n'a été retrouvé dans le thorax (Lewis et al. 2018), mais leur présence avait été observée dans les tissus adipeux (Jones et al., 2016) et cérébraux (Beek et al., 2018 ; Perrat et al., 2013). En plus de l'inhibition des transposons dans les cellules somatiques, les piARN semblent être impliqués dans la régulation de gènes au niveau épigénétique et post-transcriptionnel, et être essentiels pour le maintien de l'hétérochromatine et l'intégrité de l'ADN (Brower-Toland et al., 2007; Fagegaltier et al., 2016; Sousa-Victor et al., 2017). Par exemple, il a été décrit que *piwi* pouvait jouer un rôle dans la formation de la structure de l'hétérochromatine durant l'embryogenèse, agissant comme un puissant suppresseur épigénétique (Gu & Elgin, 2013; Pal-Bhadra et al., 2004; Yin & Lin, 2007). Récemment, Tang et al. (2023) ont constaté, avec l'utilisation de drosophiles mutantes pour le gène *piwi*, que ce dernier présentait des fonctions épithéliales dans l'intestin, dont la répression de certains ET et le maintien de l'homéostasie de l'intestin des drosophiles adultes. Par ailleurs, ils ont également observé qu'à l'inverse de *piwi*, les gènes *Aub* et *Ago3* n'étaient pas nécessaires pour inhiber les ET dans l'intestin. Cependant, tout comme Siudeja et al. (2021), ces mêmes auteurs n'ont pas détecté de piARN dans les données de séquençage des petits ARN, et émettent l'hypothèse que l'expression de ces petits ARN soit trop faible pour être détectée ou que *piwi* ait une fonction indépendante de la voie des piARN dans l'intestin. Étudier les mécanismes biologiques et évolutifs sous-jacents à la voie des piARN chez la drosophile, aussi bien dans les cellules germinales que somatiques, permettrait d'élucider les nombreuses fonctions des protéines PIWI, aussi bien néfastes que bénéfiques.

### 1.4.1.3. Voie des miARN

La voie des miARN est principalement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes endogènes au niveau post-transcriptionnel chez tous les eucaryotes (Carthew & Sontheimer, 2009; Du & Zamore, 2005). Les miARN ont une longueur de 20 à 22 nucléotides (nt). Les précurseurs de cette voie sont des miARN primaires (pri-miARN) d'origine endogène, formant des structures d'ARN double brin en épingle à cheveux (**Figure 4.B.**). Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II et clivés par l'enzyme nucléaire RNase III *Drosha* et son cofacteur de liaison aux ARNdb, *Pasha*. Cette étape permet la formation de miARN précurseurs (pré-miARN) qui vont être transportés du noyau vers le cytoplasme (Y. Lee et al., 2003, 2004). Une fois exportés, Dicer-1 (Dcr-1), une seconde enzyme RNase III, clive les pré-miARN en duplex d'ARN, d'une longueur de de 20 à 22 nt. Les miARN matures sont chargés sur la protéine Argonaute-1 (Ago1) à l'aide du co-facteur *Loqs* (Marques et al., 2010; Saito et al., 2005), formant un complexe RISC chargé après libération d'un des deux brins d'ARN dans le cytoplasme (Lund et al. 2004 ; Förstemann et al. 2007). La liaison et le clivage de l'ARNm cible peut avoir lieu sans nécessiter de parfaite homologie, et ainsi inhibe la traduction et la dégradation de l'ARNm (Asgari, 2013).

**Tableau 1 : Principales propriétés des petits ARN interférents.**

Données issues d'études sur *D. melanogaster*. Ago1 : Argonaute 1 ; Ago2 : Argonaute 2 ; Ago3 : Argonaute 3 ; Aub : Aubergine ; Dcr-1 : Dicer-1 ; Dcr-2 : Dicer-2 ; Piwi : *P-element induced wimpy testis* ; pri-miARN : *MicroRNA primary-miRNA* ; Zuc : Zucchini. D'après Fablet (2014).

Propriétés	siARN	piARN	miARN
Taille (nt)	21	23-30	20-22
Modifications chimiques	Extrémité 3', Méthylation 2'-O	Extrémité 3', Méthylation 2'-O	-
Biais de séquençage	Pas de préférence à l'uracile	1U (lié à Piwi et Aub) ou 10A (lié à Ago3)	Commence préférentiellement par un uracile
Orientation	Proportion identique de brin sens et anti-sens	Anti-sens (lié à Piwi et Aub) plus abondant que les sens (lié à Ago3)	Sens (relatif au locus miARN)
Précurseurs	longs ARN double brin	Simple brin, transcrits à partir des clusters	Pri-miARN simple brin, organisé en épingle à cheveux
Effecteurs de biogénèse	Dcr-2	Voie primaire : Zuc, Voie secondaire : Ago3 et Aub	Dcr-1
Effecteur de répression	Ago2	Voie primaire : piwi, Voie secondaire : Ago3 et Aub	Ago1

### **1.4.2. Régulation par modification épigénétique**

Les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et l'hétérochromatine sont également des mécanismes de contrôle important des ET, qui sont liés à des états répressifs de la chromatine (Deniz et al., 2019).

#### **1.4.2.1. Méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN contribue à la régulation et l'intégrité du génome chez de nombreuses espèces en ajoutant des groupes méthyles (CH<sub>3</sub>) aux cytosines, sans modifier la séquence d'ADN. Chez les vertébrés et les plantes, elle se trouve dans tout le génome à l'exception des zones riches en dinucléotides CpG (Cytosine-Phosphate-Guanine) près des promoteurs de gènes, et est considérée comme un processus fondamental pour la régulation des gènes et le maintien cellulaire (Bourc'his & Bestor, 2004; Cedar & Bergman, 2009; Lyko, 2018). À l'inverse, la méthylation de l'ADN est un phénomène marginal chez les invertébrés. Par exemple, chez les insectes, elle est limitée aux régions transcrites des gènes (Lyko et al., 2010). Par ailleurs, certaines espèces d'invertébrés semblent être dépourvues d'ADN méthyltransférases (DNMT), des enzymes qui catalysent le transfert des groupes méthyles, tels *C. elegans* et *Saccharomyces cerevisiae*, ou ne présentent qu'un seul gène candidat, tel que *Dnmt2* chez *D. melanogaster* (Bewick et al., 2017; Engelhardt et al., 2022; Kunert et al., 2003; Zemach et al., 2010).

#### **1.4.2.2. Modification des histones**

L'hétérochromatine se caractérise par la présence de marques répressives, c'est-à-dire des modifications post-traductionnelles (PTM) des histones (Janssen et al., 2018). Chez la drosophile ainsi que de nombreux eucaryotes, les marques chromatiniennes retrouvées sont par exemple la méthylation de la lysine 9 (H3K9), de la lysine 27 (H3K27) et de la lysine 4 (H3K4) de l'histone H3 (Di Stefano et al., 2011; Nicetto & Zaret, 2019; Pan et al., 2018). Ces dernières sont généralement situées dans les domaines péricentromériques et télomériques des chromosomes et marquent l'hétérochromatine riche en répétitions (Martens et al., 2005). Les modifications sont réalisées par des histones méthyltransférases spécifiques, comme *G9a* qui catalyse les marques H3K9me<sub>2</sub> essentielles pour la mise en place de l'hétérochromatine et la régulation des gènes, et qui est associée à l'extinction de gènes euchromatiques chez la drosophile (Hublitz et al., 2009; Tachibana et al., 2001, 2002, 2005).

L'hétérochromatine représente une part importante du génome des eucaryotes multicellulaires, variant de 25 à 90% (Consortium & others, 2001; Vicient & Casacuberta,

2017). Elle est, par exemple, distribuée de manière hétérogène au sein et entre les chromosomes dans les cellules de *D. melanogaster* (Pimpinelli et al., 1975). L'hétérochromatine exerce des fonctions génomiques essentielles, notamment dans l'inhibition des ET, du maintien de la stabilité génomique ainsi que dans le contrôle de l'expression des gènes. Par exemple, la mutation de gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN chez *A. thaliana* conduit à une augmentation importante de l'expression des ET et à la mobilisation de certaines familles spécifiques comme *gypsy*, *copia* et *Mutator* (Lippman et al., 2003; Tsukahara et al., 2009).

Les ET ayant co-évolué avec leur hôte depuis plusieurs millions d'années, l'action conjointe de la méthylation de l'ADN, la modification des histones et la régulation médiée par les petits ARN interférents permet ainsi une protection à plusieurs niveaux contre l'invasion des ET qui peuvent potentiellement moduler la séquence et la stabilité génomique.

*Cette première partie nous a permis d'éclaircir la notion d'élément génétique mobile introduite par Barbara McClintock et de comprendre que leur devenir est soumis à une multitude de voies épigénétiques et processus de régulation. Afin d'analyser plus en détails les mécanismes sous-jacents au contrôle des ET, la suite des études va porter sur un modèle d'étude spécifique et très bien connu en génétique : les mouches du vinaigre du genre *Drosophila*, ou plus communément appelées 'drosophiles'. En plus des ET, l'hôte interagit avec de nombreux micro-organismes divers et variés tout au long de sa vie, et tout comme pour ces éléments, des processus de défense et de régulation sont mis en place par la drosophile pour vivre, pour se maintenir. De ce fait, un troisième 'acteur' va être pris en compte tout au long de mon manuscrit : les virus, car le cœur de mon projet de thèse porte sur l'étude des effets réciproques du contrôle des ET et de l'immunité antiviral.*

## 2. Les virus : une menace omniprésente

Parmi les différents agents pathogènes, les virus sont les plus abondants et diversifiés (Bonning, 2019; Wasik & Turner, 2013). Ubiquitaire, ils menacent tous les organismes vivants (Prangishvili et al., 2006). Ils sont responsables d'un grand nombre de pathologies ce qui fait d'eux des enjeux de santé publique et de recherche majeurs, notamment en termes de détection, de traitement et de prévention face aux maladies virales (Harvey & Holmes, 2022). De plus, leur capacité à infecter de nouveaux hôtes, notamment à travers des transmissions inter-espèces, représente la principale cause des maladies infectieuses émergentes (Baxter et al., 2017; Sironi et al., 2020). Les virus sont des agents pathogènes intracellulaires qui, pour se répliquer, doivent faire face aux différentes voies immunitaires de l'hôte, notamment celles décrites précédemment.

Constitué d'ADN ou d'ARN, le matériel génétique des virus est protégé par une enveloppe protéique, appelée capsid, de forme et de taille variables selon la famille à laquelle le virus appartient. Selon les virus, la capsid peut également être entourée par une couche externe de nature lipidique, appelée enveloppe, qu'ils développent en bourgeonnant à travers la membrane de la surface cellulaire : ces virus sont dits "enveloppés". Pour infecter leur hôte, les virus non enveloppés utilisent d'autres stratégies, tels que des polypeptides spécialisés associés à la capsid, ce qui permet de moduler les interactions et franchir les barrières membranaires. Initialement établie en 1971, la classification de Baltimore a été le premier rapport officiel sur la classification taxonomique des virus (Wildy, 1971). Elle est à ce jour utilisée comme base par l'ICTV (*International Committee For Taxonomy of Viruses* ou Comité International de Taxonomie des Virus) et permet de distinguer l'espèce, le genre, l'ordre et la famille des virus. Bien que les virus puissent être caractérisés par la composition moléculaire de leur génome, la structure de la capsid, la présence d'une enveloppe, la gamme d'hôtes qu'ils infectent, leur pathogénicité ou encore la similarité des séquences, les trois critères essentiels sont le type de génome viral et son organisation (ADN ou ARN, simple brin ou double brin ; polarité positive ou négative), les mécanismes de réplication, et la structure du virus. En comparaison avec les virus à ADN, les virus à ARN présentent un taux de mutation plus élevé dû à l'absence d'ADN polymérase, qui détecte et corrige les erreurs pouvant avoir lieu lors de la réplication.

Bien que les connaissances soient davantage portées sur les invertébrés et puissent être limitées par certaines méthodologies, les insectes sont majoritairement infectés par des virus à ARN et ont vraisemblablement une tolérance à des charges virales plus élevée que les vertébrés (Shi et al., 2016). Une étude ciblant les virus à ARN négatif a permis d'identifier des séquences



dérivées de 112 nouveaux virus au sein d'un séquençage de 70 espèces d'arthropodes ayant la particularité de causer des maladies chez les vertébrés et les plantes (C.-X. Li et al., 2015). Les auteurs suggèrent que certains virus d'arthropodes puissent être des ancêtres de virus pathogènes infectant les plantes et les vertébrés, car les arthropodes semblent contenir des virus qui se situent à la base des principaux groupes de virus (C.-X. Li et al., 2015). Pour se répliquer, les virus à ARN codent leur propre machinerie de réplication : ils utilisent une RdRp, une enzyme conservée chez les virus à ARN. Cependant, cette dernière engendre des taux d'erreur élevés lors du processus de copie, n'ayant pas d'activité de relecture (Duffy, 2018; Sanjuán et al., 2010; Venkataraman et al., 2018). Les taux de mutations élevés des virus sont corrélés avec une diversité et une capacité d'évolution accrue, et conduisent à des changements de tailles, de structure et de segmentation des génomes (Shi et al., 2015). De ce fait, les invertébrés représentent un modèle clé en tant que réservoirs et vecteurs viraux pour la recombinaison et l'échange génétique des virus.

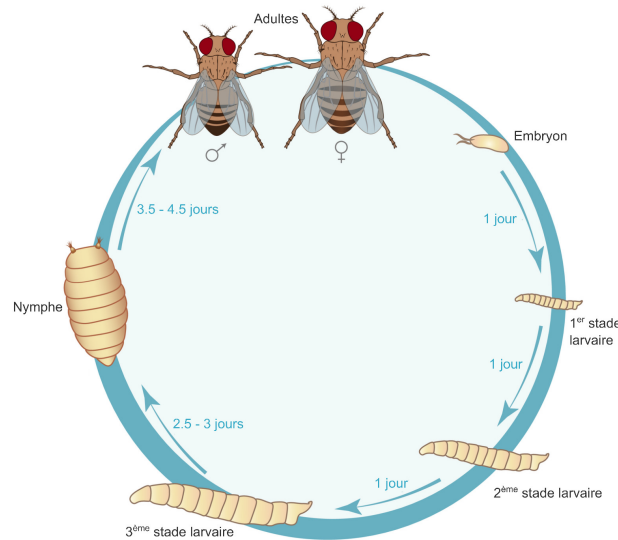
## 2.1. Des protéines sacrifiées par le virus pour le virus ?

Parmi les différents systèmes immunitaires qui seront évoqués en partie 2.3., la voie des siARN joue un rôle central dans la réponse antivirale aussi bien chez les insectes, les plantes ainsi que les mammifères (Iwama & Moran, 2023; Wein & Sorek, 2022). D'un point de vue évolutif, les principaux facteurs de défense antivirale des drosophiles tels que Dcr-2, R2D2 et Ago2, présentent des taux d'évolution d'acides aminés largement plus élevés que ceux de leurs paralogues de la voie des miARN (Dcr-1, R3D1, Ago1), et font partis des 3% évoluant le plus rapidement chez la drosophile (Obbard et al., 2006). La présence de suppresseur de l'ARNi (VSR : *Viral Suppressors of RNA Silencing*) chez de nombreux virus suggère une capacité à façonner les fonctions antivirales de l'hôte pour contourner les mécanismes de défense, se répliquer et se propager (Bronkhorst & van Rij, 2014). Selon les virus, les VSR peuvent intervenir à différentes étapes de la voie en inhibant ou supprimant l'activité de l'ARNi, faisant probablement varier la sévérité et la pathogénicité de l'infection en conséquence (Gammon & Mello, 2015; Y.-H. Han et al., 2011). Par exemple, une stratégie commune entre un grand nombre de virus correspond à séquestrer les siARN par l'intermédiaire des VSR permettant d'éviter aux protéines AGO de cibler le génome viral (Galiana-Arnoux et al., 2006; H. Li et al., 2002; X.-H. Wang et al., 2006; Zambon et al., 2006). Les VSR pourraient faciliter la transmission virale à la descendance, participer à l'accumulation de particules virales et à la propagation du virus (Berry et al. 2009 ; Schnettler et al. 2012 ; van Rij et al. 2006). De ce fait, il existe une sorte de course aux armements entre virus et hôtes : les virus exercent une forte

pression sur leurs hôtes ce qui entraîne l'émergence de résistance du côté de l'hôte. L'ensemble des propos vont être focalisés sur les quatre virus phares de mon projet de thèse, qui diffèrent par la nature de leur génome, leur hôte naturel et le suppresseur viral qu'ils codent.

## **2.2. *Drosophila* : un modèle d'étude très bien connu**

Les insectes représentent le plus large et diversifié groupe d'organismes multicellulaires (Mora et al., 2011; Stork, 2018). Quasiment omniprésents sur la planète, ils ont contribué de manière importante et variée au fonctionnement de nombreux écosystèmes. Certains insectes peuvent être bénéfiques pour l'environnement et l'activité humaine en assurant, par exemple, un service écosystémique comme la pollinisation des plantes (Engel & Moran, 2013), tandis que d'autres peuvent avoir des effets néfastes en étant vecteurs d'agents pathogènes ou ravageurs de culture (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Depuis sa première utilisation expérimentale, la drosophile s'est placée au cœur de nombreuses études pionnières, notamment celles ayant permis de mettre en lumière les règles qui déterminent le développement embryonnaire (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980), l'association entre le phénomène de dysgénésie hybride et le transposon P (Kidwell et al., 1977) également la présence indispensable à l'immunité innée du récepteur de la voie Toll (Lemaitre et al., 1996). Après plus de 100 ans, la drosophile est un organisme modèle bien établi (M. Yamaguchi & Yoshida, 2018) et toujours largement utilisé, tel que dans l'étude de maladies humaines comme les épilepsies génétiques par exemple (Bergman et al., 2017; F. P. Fischer et al., 2023). Le génome de ce modèle d'étude a également été l'un des premiers parmi les organismes multicellulaires à être séquencé, et est l'un des mieux annotés (Adams et al. 2000). Un aspect non négligeable qui fait de la drosophile un modèle génétique d'étude intéressant et pertinent est aussi la facilité d'entretien et d'élevage, étant peu coûteux et rapide (Rosch et al., 2019). La drosophile est une espèce d'insecte holométabole, c'est-à-dire qui réalise une métamorphose complète, faisant partie de l'ordre des diptères, de la famille des *Drosophilidae*. Son cycle de vie se déroule en six étapes : embryon, trois stades larvaires, nymphe et imago ou adulte (**Figure 6**) ; et le temps de génération est rapide (une dizaine de jours à 25°C).



**Figure 6 : Schéma du cycle de vie de *Drosophila melanogaster*.**

Représentation schématique des six étapes du cycle de vie de *Drosophila*. Le temps de développement écrit est établi selon des conditions d'élevage à 25°C. Figure adaptée de Walter (2020).

*D. melanogaster* est un modèle largement utilisé pour étudier les interactions hôtes-pathogènes (Bonning & Saleh, 2021; Schneider & Imler, 2021). De nombreuses études ont permis de décrire une trentaine de virus infectant naturellement cette dernière et plus de 100 virus ayant la capacité de se répliquer bien qu'étant non pathogène naturel, avec différents tropismes tissulaires, pathogénicité et stratégies de répllication (Brun & Plus, 1980; Longdon et al., 2015; Medd et al., 2018; Webster et al., 2015a, 2016; Wu, Luo, et al., 2010). Par exemple, plusieurs arbovirus, c'est-à-dire des virus transmis par la piqûre d'arthropodes, de l'Homme sont capables de se répliquer chez la drosophile, tels que le virus Sindbis (SINV), le virus de la Dengue (DENV), et le virus du Nil occidental (WNV) (Chotkowski et al., 2008; Kemp et al., 2013a; Mukherjee & Hanley, 2010). Contrairement à cette richesse de virus à ARN, seuls quelques virus à ADN ont été identifiés chez *D. melanogaster* à ce jour, comme le virus Kallithea, le virus Vesento ou très récemment le virus Tomelloso (Unckless, 2011; Wallace et al., 2021; Webster et al., 2015b, 2016).

Globalement, 40% des drosophiles de populations sauvages sont infectées par des virus, entraînant des cycles d'évolution et des mécanismes de restriction antivirale uniques mais parfois communs entre différentes espèces (Webster et al., 2015b). En parallèle des virus présents chez la drosophile, des séquences dérivées de virus ont également été retrouvées de manière abondante au sein des génomes de leur hôte. Elles peuvent provenir de séquences génomiques partielles (Suzuki et al., 2017) ou de génomes de virus à ADN endogénéisés, c'est-à-dire intégrés dans le génome de l'hôte ou convertis en ADN circulaire extra-chromosomal (Blair et al., 2019). Chez les insectes, la présence de forme circulaire d'ADN viral peut

participer à rendre persistantes les infections et contribuer à la tolérance virale, parfois variable entre populations (Goic et al., 2013; Schultz et al., 2018).

### 2.3. Défense immunitaire chez la drosophile

Lors d'une infection, les mécanismes de défense de l'hôte diffèrent selon l'identité du pathogène, mais aussi d'autres facteurs tels que la voie d'exposition, le mode d'infection ou la charge virale. L'infection peut être systémique, c'est-à-dire qu'elle va se répandre dans l'ensemble de l'organisme, ou locale et rester proche du point d'inoculation du pathogène (Venes, 2017). En laboratoire, il existe un certain nombre de modes d'infections utilisés chez la drosophile : par injection (piqûre), par application topicale (dépôt sur la cuticule), par voie orale (ingestion), par transmission sexuelle ou dépôt dans la plaque génital du mâle (Mondotte & Saleh, 2018). Les deux méthodes les plus utilisées sont l'administration de l'agent pathogène par voie orale (Ferreira et al., 2014; Z. S. Wong et al., 2016) ou par injection (Neyen et al., 2014). Au cours de mon projet de thèse, l'infection expérimentale par injection a été privilégiée. En effet, bien que l'infection par voie orale soit plus naturelle, l'introduction d'un agent pathogène par injection permet de contrôler la zone d'entrée du pathogène et la charge injectée.

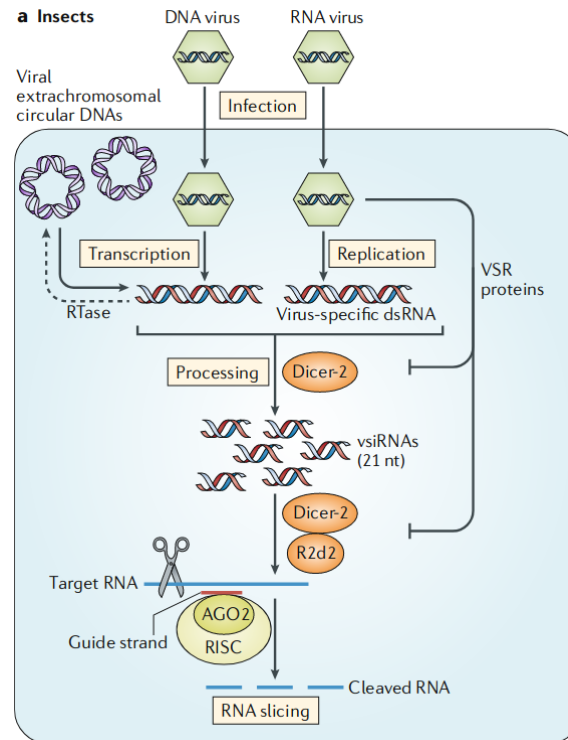
Pour se défendre et survivre face aux micro-organismes et parasites qui les menacent tels que des bactéries, des champignons et des virus, les insectes ont acquis des mécanismes de défense immunitaire (Hoffmann, 1995; Lemaitre & Hoffmann, 2007; Sheehan et al., 2018). Le système immunitaire inné constituant une première ligne de défense, les voies de signalisation, processus biologiques et gènes, sont fortement conservés chez la drosophile (Buchon et al., 2014; Nainu et al., 2015; Wein & Sorek, 2022). La réponse immunitaire innée est initiée par des récepteurs de type PRR (*Pattern Recognition Receptors*) qui reconnaissent des motifs moléculaires conservés et associés aux différents pathogènes (PAMPs : *pathogen-associated molecular patterns*) (Bilak et al., 2003). En comparaison avec les vertébrés, les insectes ne présentent pas d'immunité adaptative ni de réponse immunitaire innée basée sur les interférons pour propager le signal d'alerte et stimuler les réponses effectrices de l'hôte (Flajnik & Du Pasquier, 2004; Negishi et al., 2018). Ce sont par exemple des peptides antimicrobiens (AMP) codé par des gènes antibactériens et antifongiques qui sont produits par le corps gras, ou le foie chez les mammifères, et exportés vers l'hémolymphe à la suite d'une infection (Lamiable & Imler, 2014). Chez les insectes, le système immunitaire inné agit à travers un ensemble de facteurs cellulaires tels que la phagocytose, l'encapsulation et l'apoptose par les hémocytes, et de facteurs humoraux tels que les AMP, étroitement liés pour se défendre face aux agents pathogènes envahissants (Lavigne & Strand, 2002; Strand, 2008; Younes et al., 2020).

Les voies de transduction du signal entraînent des modifications dans l'expression des gènes au niveau cellulaire. Parmi cette composante du système immunitaire inné antiviral, il est possible de distinguer les voies canoniques NF- $\kappa$ B dont les voies Toll et Imd (*Immune Deficiency*), connu pour leur rôles antibactériens et antifongiques (Valanne et al., 2011; Myllymäki, Valanne, et Rämetsä 2014) ; et la voie *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (Jak/STAT) activée par les cytokines (Lemaître & Hoffmann, 2007). Dans cette partie, seuls les principaux mécanismes impliqués dans la réponse antivirale chez la drosophile seront principalement décrits, la réponse antivirale étant au cœur de mon projet de thèse.

### 2.3.1. Voie des petits ARN interférents : siARN

En plus d'être impliquée dans le contrôle et la régulation des ET comme évoqué en partie 1.4.1., la voie des siARN représente un mécanisme majeur de défense antiviral chez les drosophiles et n'est pas virus-spécifique : elle est capable de cibler des virus à ARN simple ou double brin et à ADN double brin (Galiana-Arnoux et al. 2006 ; H. Li, Li, et Ding 2002 ; van Rij et al. 2006a ; H. Siomi et Siomi 2009). Tout comme pour la régulation des gènes et la répression des ET, la voie est activée après reconnaissance de l'ARNdb d'origine virale dans le cytoplasme par Dcr-2 à la suite d'une infection virale (Bernstein et al. 2001) (**Figure 7 et 8**). Pourtant, de récents travaux ont observé chez des insectes infectés par des virus à ARN la présence d'ADN viral (ADNv) sous forme linéaire ou circulaire (Goic et al., 2013, 2016). Il semblerait que cette ADNv soit formée par l'action des transcriptases inverses codées par les rétrotransposons à LTR, capables de transcrire l'ARN viral, au lieu d'une enzyme ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) codé par le virus (Poirier et al., 2018). Bien que les mécanismes restent à approfondir, la présence de ces formes d'ADNv permettrait de générer des transcrits ARN simple et double brins pouvant être pris en charge par le domaine hélicase DExD/H de *Dcr-2*, selon un mécanisme distinct de son rôle dans la production de siARN, et ainsi favoriser la réponse immunitaire antivirale (Deddouche et al., 2008; Poirier et al., 2018). Pour conférer une protection contre l'infection, Tassetto et al. (2017) ont montré que les ARNdb viraux libérés par les cellules infectées s'accumulent dans les hémocytes, et sont libérés dans les exosomes après avoir été transcrits. Ils suggèrent que l'immunité antivirale systémique serait par la suite permise par leur sécrétion dans le milieu extracellulaire et leur propagation dans l'ensemble du corps de l'insecte. Un deuxième mécanisme de transfert des ARNdb et des composants de la machinerie d'ARNi pourrait avoir lieu par le biais de structures de nanotubes entre les cellules (Karlikow et al., 2016). Il est également intéressant de noter que le domaine hélicase de *Dcr-2* a été décrit comme responsable de l'activation de la protéine *Vago*, connue pour activer la voie

antiviral Jak/STAT, de manière indépendante à la voie d'ARNi (Paradkar et al., 2012). Il sera donc intéressant d'observer comment une infection par des virus présentant des différences génomiques (ARN et ADN, simple brin et double brin) pourrait éventuellement promouvoir l'expression de *Vago* à travers l'ARNi.



**Figure 7 : Schéma de la voie antivirale d'ARN interférence (ARNi) chez les insectes.**

A la suite d'une infection par des virus à ARN, *Dicer-2* produit deux types distincts de petits ARN interférents de 21 nt dérivés de virus (vsmRNA). Ils sont produits à partir de (i) précurseurs d'ARN double brin (ARNdb) synthétisés par des ARN polymérases ARN-dépendantes (RdRp) virales ou (ii) par transcription bidirectionnelle à partir d'ADN circulaires extrachromosomiques viraux qui sont transcrits en sens inverse à partir de modèles d'ARN viraux indéfinis. Les virus à ADN des insectes déclenchent également le traitement dépendant de *Dicer-2* d'ARNdb spécifiques du virus à partir de transcrits sens et antisens issus d'une transcription convergente. Lors d'une infection, l'ARNi de la drosophile nécessite *R2d2*, mais pas *Loqs-*PD** (essentiel pour la biogenèse endogène des siRNA). D'après Z. Guo et al. (2019).

### 2.3.2. Voie Jak/STAT

Fortement conservée, la voie Jak/STAT a initialement été décrite chez la drosophile et est reconnue pour son rôle important dans la régulation du développement et la prolifération des hémocytes des insectes, ainsi que de l'homme (Arbouzova & Zeidler, 2006; Bang, 2019; Merklings & van Rij, 2013; Trivedi & Starz-Gaiano, 2018). En comparaison avec les vertébrés qui possèdent de multiples composants de la voie Jak/STAT, la drosophile code une seule kinase JAK (codé par le gène *hopscotch*) et un seul facteur de transcription STAT (codé par *Stat92E*) (**Figure 8**). L'activation de la voie se fait après la liaison d'une des trois cytokines de la famille Unpaired (*Upd*) au récepteur Domeless (*Dome*), entraînant sa dimérisation et son activation, ainsi que la trans-phosphorylation des kinases *hop* (Brown et al., 2003; Saadin &

Starz-Gaiano, 2016). Ces dernières vont trans-phosphoryler *Dome*. Cela va créer des sites de liaison pour *Stat92E* et lui permet d'être recruté et dimérisé pour être, par la suite, transporté vers le noyau. Une fois transloqué, il va induire et réguler l'expression des gènes effecteurs tels que *vir-1* (*virus-induced RNA-1*), connu comme marqueur de la régulation virale, les gènes de la famille *Tot* (*Turandot*), impliqué dans la réponse au stress (Agaïsse et al., 2003; Dostert et al., 2005; Saadin & Starz-Gaiano, 2016; West & Silverman, 2018a). En effet, les gènes *vir-1* et *Turandot* ont déjà été décrits comme étant induits à la suite de divers stress comme la déshydratation, des températures élevées, des irradiations UV ou des infections bactériennes (Ekengren et al., 2001). Par ailleurs, *SOCS36E* (*Suppressor of cytokine signaling at 36E*) et *PIAS* (*Protein inhibitor of activated STAT*) ont été décrits lors d'infections virales comme étant des régulateurs négatifs de la voie (Betz et al., 2001; Stec et al., 2013). D'autre part, la protéine *Vago* a également été identifiée et permettrait de déclencher la voie Jak/STAT à la suite d'infection virale chez moustique ainsi que chez la drosophile, bien que l'initiation soit faite par un autre récepteur que *Dome* (Paradkar et al., 2012). En effet, l'induction de *Vago* semble dépendante de *Dcr-2*, le facteur permettant la production de siARN comme décrit plus haut en partie 2.3.1.

### 2.3.3. Voie Toll

La voie Toll est généralement activée lors d'une infection fongique ou bactérienne (bactéries Gram-positives) (Lemaitre et al., 1996; Lindsay & Wasserman, 2014). Chez la drosophile, la reconnaissance du pathogène est assurée par des  $\beta$ -glucanes (GNBP) et des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP : *peptidoglycan recognition protein*) (**Figure 8**). La cascade protéolytique qui s'ensuit permet d'activer la cytokine *Spätzle* qui circule dans l'hémolymphe sous forme de précurseur inactif (Levashina et al., 1999) et qui va pouvoir se lier sur le récepteur *Toll* (Valanne et al., 2011). Cette liaison implique les protéines adaptatrices *dMyD88* (*myeloid-differentiation primary response 88*), *Tube* et la kinase *Pelle* et permet à cette dernière de phosphoryler *Cactus*, qui régule négativement la voie de signalisation. Les deux facteurs de transcription de *Drosophila*, *Dorsal* et *Dif* (*Dorsal-related immune factor*), vont ainsi pouvoir être exportés du cytoplasme vers le noyau et réguler la transcription des gènes effecteurs à la voie, tels que la *drosomycine* (Y. P. Cheung et al., 2022). Par ailleurs, outre son rôle lors d'activité antivirale, la voie Toll semble être plus spécifiquement active lors d'une infection orale et très limitée lors d'infection systémique (Ferreira et al., 2014; Nakamoto et al., 2012; Zambon et al., 2005).

### 2.3.4. Voie Imd

La voie Imd est activée lors d'une infection par des bactéries Gram-négatives, après reconnaissance du pathogène par les récepteurs PGRP transmembranaires (PGRP-LC) et intracellulaires (PGRP-LE) (Choe et al., 2002; Kaneko et al., 2006; Naitza et al., 2002). Lors de l'entrée d'un pathogène, le signal d'alerte va être transmis à la molécule adaptatrice *imd* qui va pouvoir recruter et activer *dFADD* (*Drosophila Fas-associated death domain*). Cette dernière va interagir avec la caspase *Dredd* (*Death-related ced-3/Nedd2-like protein*), activé par un inhibiteur de l'apoptose (IAP2), lui permettant de cliver et activer *imd*. La liaison de IAP2 à *imd* va favoriser l'activation de cette dernière par ubiquitination, permettre le recrutement de *TAK1* (*transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1*) et activer le complexe I $\kappa$ B-Kinase (*IKK*) qui va phosphoryler la protéine NF- $\kappa$ B *Relish* (Paquette et al. 2010 ; Ertürk-Hasdemir et al. 2009). Enfin, *Dredd* va cliver *Relish*, lui permettant de se déplacer dans le noyau et d'induire l'expression de AMP, tel que *diptéricine* et *metchnikowin* (Myllymäki, Valanne, et Rämetsä 2014 ; Stöven et al. 2003 ; Kingsolver, Huang, et Hardy 2013) .

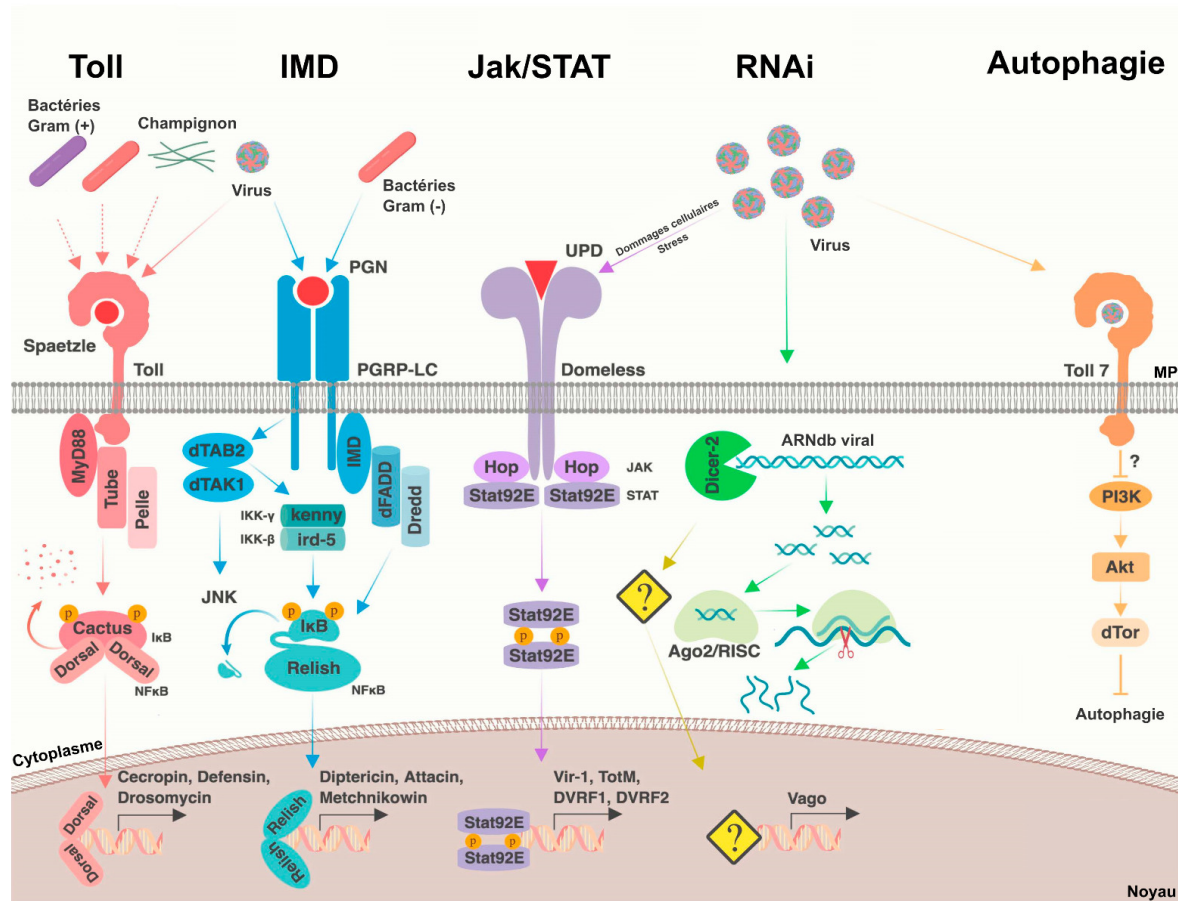
### 2.3.5. Voie de l'autophagie

Hautement conservée, l'autophagie est un mécanisme qui permet aux cellules de décomposer le matériel cytoplasmique, par la voie de dégradation lysosomale, y compris les organites pour les recycler (Lum et al., 2005). Pour cela, les organites endommagés ou de petites parties du cytoplasme sont entourés par des autophagosomes, des vésicules à double membrane, qui fusionnent avec des lysosomes (**Figure 8**). Le matériel est ensuite décomposé par des enzymes présentes dans le lysosome (Hansen et al., 2018). Les principaux gènes de ce processus sont les gènes liés à l'autophagie (*Atgs*) et interviennent tout au long du mécanisme (Érdi et al., 2012; Yordy et al., 2013). Bien que les connaissances soient encore limitées, il a été décrit que des cascades de signalisation sont à l'origine de la régulation de ce processus, comme le facteur 6 associé au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF6) ou la kinase activé par l'AMP (AMPK) (Hansen et al., 2018; Moy et al., 2014). Concernant les mécanismes de l'autophagie, il semblerait que le gène *Toll7* agisse comme un récepteur permettant d'activer la voie de la liaison avec le virus (Nakamoto et al., 2012). Ceci permettrait d'inhiber la voie PI3K-Akt qui réprime initialement l'autophagie à travers l'activation de la kinase *TOR* (*Target of Rapamycin*) (Palmer et al., 2018).

Il a été montré que ce processus était essentiel dans l'immunité et la défense de l'hôte, notamment à travers son implication dans la limitation de la réplication et sa capacité à promouvoir l'élimination de divers pathogènes tels que les bactéries et les virus (T. Chen et al.,



2023; Levine et al., 2011; Levine & Kroemer, 2009; Shelly et al., 2009). Le rôle antiviral joué par l'autophagie a également été démontré chez la drosophile par plusieurs études (Moy et al., 2014; Nakamoto et al., 2012; Shelly et al., 2009). Toutefois, les mécanismes impliqués par la réponse antivirales cellulaires semblent spécifiques au virus chez la drosophile (Lamiable et al., 2016; Rosendo Machado et al., 2021).



**Figure 8 : Schéma des voies immunitaires innées antivirales chez les insectes diptères.**

Les principales étapes des voies Toll, Imd, Jak/STAT, de l'ARNi et de l'autophagie sont représentés. MP : Membrane plasmique. Figure adaptée de Palmer et al. (2018).

Ainsi, probablement en soutien à la voie des siARN, les voies Toll et Imd sont impliquées dans les réponses antivirales, mais leur rôle reste secondaire. Concernant la voie Jak/STAT, de nombreuses études ont suggéré son rôle dans l'induction de l'expression de gènes ayant un effet antiviral. Le mode d'administration du virus peut également induire une réponse variable en réponse à l'infection, et il a été suggéré que les voies Imd et Jak/STAT impliquent des mécanismes virus-spécifique (Mondotte & Saleh, 2018). Cependant, les mécanismes précis de leur activation et des effecteurs à la suite d'une infection virale restent à approfondir. Bien que la voie Jak/STAT n'a pas été décrite comme étant impliquée en réponse à une infection par DXV (*Drosophila X Virus*) et IIV-6 (*Invertebrate Iridescent Virus 6*) (Xu & Cherry, 2014),

deux des quatre virus utilisés dans mon projet de thèse, il sera intéressant d'étudier si cette voie peut jouer un rôle selon les conditions expérimentales spécifiques utilisées, telles que la charge virale et le mode d'inoculation par exemple.

*Au cours de l'évolution, les différents phénomènes de stress auxquels sont confrontés les drosophiles leur ont permis de façonner leur mécanisme de réponses immunitaires antivirales pour se défendre face aux parasites génomiques et aux pathogènes. Cette seconde partie nous a permis de décrire les réponses principales déclenchées par ce modèle en réponse à une infection virale plus spécifiquement. Sachant que la voie des siARN se retrouve au cœur des interactions ET-virus-hôte, ayant pour rôle de réguler les ET et de pallier l'infection virale, la drosophile doit-elle prioriser ses processus de contrôle ? Des mécanismes de 'renfort' sont-ils mis en place ? Quels mécanismes sont activés ou réprimés ?*

### 3. Éléments transposables, virus et défense immunitaire : une interaction tripartite ?

Dans l'ensemble, de nombreux processus immunitaires sont activés par la drosophile lors d'une infection par un pathogène viral, pouvant varier selon le type de virus. Sachant que la voie d'ARNi est commune avec la régulation des éléments transposables, il s'avère donc essentiel de comprendre le lien qui peut exister entre ces derniers et les virus, et comment l'hôte peut en être impacté.

#### 3.1. Interférence entre petits ARN interférents

La voie des siARN est un mécanisme essentiel pour la régulation des ET dans les tissus somatiques et représente l'une des principales voies de la réponse immunitaire lors d'une infection virale chez les insectes. En parallèle, la voie des piARN contrôle l'abondance des transcrits d'ET dans les cellules ovariennes. Dirigées par des effecteurs moléculaires distincts, la voie des siARN et des piARN sont décrites comme indépendantes, et les gènes de ces deux voies varient beaucoup dans la séquence et l'expression au sein des espèces (Fablet, 2014). Toutefois, de nombreuses études ont essayé de mettre en lumière les interactions possibles entre ces deux voies. D'un côté, une étude a observé que la production de siARN pouvait être saturée (Durdevic et al., 2013), suggérant qu'il puisse y avoir un compromis entre le contrôle des ET et l'immunité antivirale. A l'inverse, bien que les mécanismes restent à éclaircir, une étude récente a démontré l'existence d'une compensation possible entre ces deux classes de petits ARN dans le contrôle des ET (Barckmann et al., 2018). En utilisant une lignée mutante de *D. melanogaster* où *piwi* est réprimé, Barckmann et al. (2018) ont montré que l'inhibition de la voie des piARN dans les cellules folliculaires somatiques des ovaires était corrigée par la voie des siARN, bien que moins efficace : la voie des siARN seraient capable de compenser une voie des piARN défailante. Ils ont observé que la délétion de *piwi* entraînait une augmentation de la production de siARN ciblant certains ET, permettant de prendre le relais de la voie des piARN et d'atténuer l'augmentation du taux de transcrits des ET. De manière intéressante, ils décrivent également que l'absence partielle du contrôle des ET par les piARN conduit à une augmentation exponentielle du nombre de copies d'ET dans les génomes des générations suivantes.

Récemment, Luo et al. (2022) ont détecté une étroite coopération entre la voie des siARN et des piARN. Ils suggèrent que les siARN transmis par la mère permettraient à la descendance de former de nouveaux clusters de piARN après plusieurs générations. Une fois

établi, la voie des siARN ne semble pas être nécessaire à la production de piARN issu de ce nouveau cluster (Luo et al., 2022). Selvaraju et al. (2022) ont également observé une augmentation du nombre de copies d'un ET, l'élément P, lorsqu'aucun cluster piARN n'avait été transmis maternellement, ne permettant pas la formation de piARN ciblant cet ET.

Décrite brièvement dans la partie 1.4.1.2., quelques études ont mis en évidence la fonction somatique du gène *piwi* en dehors des cellules germinales. L'étude réalisée par Beek et al. (2018) montre également une fonction complémentaire et en relais entre les siARN et les piARN ciblant les ET au niveau des têtes des drosophiles : l'expression de la majorité des transcrits d'ET est augmentée uniquement lorsque les drosophiles sont mutées à la fois pour les deux gènes *piwi* et *Dcr-2*, n'était quasiment pas affecté lorsque l'individu présente une seule mutation. Les auteurs suggèrent que l'inhibition des gènes médié par *piwi* durant l'embryogenèse représente la première ligne de défense pour le contrôle des ET, tandis que les siARN qui dépendent de *Dcr-2* n'interviendrait qu'en mécanisme de secours dans la régulation des ET, lorsque ces derniers échappent à l'inhibition par *piwi*.

## 3.2. Production de petits ARN viraux

En plus des preuves décrivant le lien potentiel entre les différentes voies des petits ARN dans le contrôle des ET, des similitudes en termes de structures et de mécanismes de contrôle entre les ET et les virus suggèrent la possibilité d'une interaction entre ces derniers. Des études ont montré que les piARN ciblant les ET *gypsy* et *ZAM* dans les cellules folliculaires peuvent empêcher la production de particule semblable à des virus (VLP), qui ne peuvent alors pas infecter la lignée germinale femelle, ni s'insérer dans le génome de la descendance (Brasset et al., 2006; Chalvet et al., 1999; Lécher et al., 1997). De nos jours, quelques études ont permis de fournir des preuves quant à l'intervention des deux voies des piARN et miARN face à la menace d'un virus.

### 3.2.1. Rôle antiviral des piARN

Le rôle joué par les piARN dans la réponse antivirale n'est pas encore totalement élucidé (Horjales et al., 2023; Santos et al., 2023). En effet, des piARN dérivés de virus (vpiARN) ont été observés chez de nombreux arthropodes protégeant notamment les tissus somatiques contre les transposons et les virus (Kolliopoulou et al., 2019; Lewis et al., 2018; M. C. Siomi et al., 2011). Par exemple, des vpiARN ont été détectés chez des moustiques à la suite de l'acquisition d'arbovirus (Miesen et al., 2016; Morazzani et al., 2012; Y. Wang et al., 2018). Bien que les

mécanismes permettant de transformer les séquences virales exogènes ne soient toujours pas clairs, il a été observé que les vpiARN générés à la suite d'une l'infection chez les moustiques du genre *Aedes* présentaient les caractéristiques d'amplification par la boucle ping-pong, avec comme marque le biais nucléotidique de 1U/10A (Z. Wang et al., 2022). Il a été suggéré que l'évolution des protéines PIWI leur ait permis d'acquérir un mécanisme de biogenèse distinct de celui des piARN dérivés d'ET pour traiter les ARN de sources exogènes tels que les virus (Lewis et al., 2016; Walsh et al., 2022; Y. Wang et al., 2018). Dans ce sens, d'autres études menées sur *C. elegans* ont montré que la voie des piARN était capable de réguler l'expression des gènes hôtes et des ET par l'intermédiaire d'un mécanisme semblable à celui des miARN (Dai et al., 2019; E.-Z. Shen et al., 2018; Weick & Miska, 2014).

Chez *Drosophila*, la présence de vpiARN a été observée au niveau somatique de cellules ovariennes de drosophiles, infectées de manière persistante par plusieurs virus à ARN (Wu, Wang, et al., 2010). Il apparaît que seuls des vpiARN sens ont été détectés avec un biais U1 et uniquement avec la protéine Piwi, ne permettant pas l'amplification par la voie secondaire, ce qui est en lien avec l'absence de signature ping-pong (C. Li et al., 2009; Malone et al., 2009). De plus, la voie des piARN est bien active dans le contrôle des ET lors d'une infection virale mais la sensibilité aux infections d'individus mutants pour *Piwi* et *Aub* semble variable selon le virus (Chotkowski et al., 2008; Zambon et al., 2006). A l'inverse, aucun vpiARN n'a été détecté après une infection systémique chez des mouches adultes présentant des fonds génétiques différents (Petit et al., 2016), ni décrite dans d'autres tissus de drosophiles jusqu'à présent (Lewis et al., 2018). Il semblerait que de nombreux facteurs puissent fortement influencer le devenir d'une infection virale ainsi que son analyse, notamment le fond génétique de l'hôte, la charge et la réplication virale. La réponse antivirale des drosophiles par la voie des piRNA après une infection reste donc à approfondir.

### **3.2.2. Rôle antiviral des miARN**

La drosophile compte des centaines de miARN qui semblent réguler presque la moitié du génome codant (Carthew et al., 2017). Les miARN jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaire (Bonning & Saleh, 2021). Par ailleurs, quelques travaux ont décrit le potentiel antiviral de ces petits ARNs non codants chez les insectes, en plus de leur rôle dans la défense contre divers types de pathogènes (Bruscella et al., 2017; M. Y. Lu & Chtarbanova, 2022; Monsanto-Hearne & Johnson, 2019). En effet, quelques virus seraient la cible de miARN

codés par l'hôte (Skalsky & Cullen, 2010). Par opposition, certains virus à ADN, tel que le virus Kallithea, expriment également des miARN, leur permettant de réguler l'expression de leur génome ou celui de la cellule hôte (Hussain & Asgari, 2014; Webster et al., 2015b). Les effets antiviraux des miARN chez les mammifères entraînent des changements transcriptionnels permettant de minimiser la réplication du virus et semblent également être capables de cibler directement l'ARN viral (Cullen, 2011). Chez la drosophile, peu d'études ont exploré le potentiel antiviral des miARN mais, récemment, Monsanto-Hearne et Johnson (2018) ont montré que l'abondance de certains miARN peut être modifiée selon le type d'infection et le tissu chez cette dernière.

### 3.3. ARNi : régulation des éléments transposables et / ou virale ?

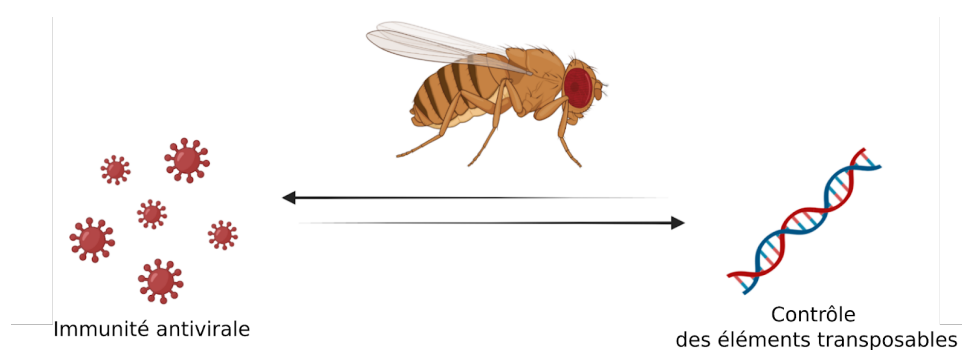
L'implication des différentes voies d'ARNi face à l'entrée d'un pathogène viral ainsi que les liens décrits entre ces voies concernant le contrôle des ET ont ainsi mené aux premières preuves décrivant l'effet des virus sur les transcrits d'ET. Une première étude visant à infecter des *D. simulans* avec l'arbovirus (Arthropod-Borne virus) non pathogène naturel Sindbis (SINV, *Togaviridae*) a observé que lors d'une infection par ce dernier, les quantités de transcrits d'ET étaient modulées à la baisse, associant également des changements au sein des répertoires de petits ARN dérivés d'ET (Roy et al., 2020). En effet, Roy et al. (2020) suggère que les taux de mobilisation des ET peuvent être affectés par les infections virales. En utilisant un virus naturel de la drosophile ayant la particularité d'être transmis verticalement, le virus Sigma (DMelSV, *Rhabdoviridae*), Roy et al. (2021) ont observé une augmentation des quantités de transcrits d'ET dans les tissus somatiques à la suite d'une infection par ce virus. Dans les ovaires, seul un très faible effet sur les quantités de transcrit d'ET a été détecté tandis que les petits ARN dérivés d'ET étaient significativement plus abondants. Ils proposent ainsi que le contrôle des ET peut varier mais que cela mène à une protection accrue contre les modulations des quantités de transcrits d'ET dans ce tissu, potentiellement en raison de leur apport matériel génétique à la prochaine génération. Dans les tissus somatiques, une méta-analyse de données de séquençage ARN a permis à ces mêmes auteurs de découvrir que le sens de la modulation des ET était spécifique au virus, suggérant que la direction dépende des voies immunitaires déclenchées à la suite de l'infection (Roy et al., 2021)

Comme évoqué en partie 2.3.1., lors d'une infection virale, Goic et al. (2013) ont constaté que la transcriptase inverse de certains ET était capable de faire des copies d'ADN de virus à ARN, ce qui stimule la production de siRNA antiviraux et permet une réponse

immunitaire plus forte. Ceci a été rapporté à la suite d'infection par les virus SINV, DCV et FHV chez la drosophile (Goic et al., 2013; Poirier et al., 2018). Lorsque la rétrotranscription est inhibée, l'ADNv ne peut plus être formé, bloquant la production de siARN dérivé de cette source : cela suggère que les ET peuvent participer à la tolérance et la persistance virale aussi bien chez la drosophile (Goic et al., 2013), que chez les moustiques (Goic et al., 2016). Récemment, Wang et al. (2022) ont révélé que l'activation développementale de certains ET permettait à l'hôte de façonner une réponse antivirale protectrice qui confère un avantage à long terme dans la lutte contre les pathogènes. Plus précisément, ils rapportent que l'expression du gène *Env* de l'ET *mdg4* au stade nymphal, dans l'intestin postérieur de *D. melanogaster*, induit des changements transcriptomiques qui entraîne une augmentation de l'immunité antivirale à l'état adulte contre des infections par ingestion. Leurs expériences indiquent également que *Relish*, un gène de la voie Imd, agirait comme un partenaire de *mdg4* dans la diminution du titre viral, soit directement, soit via un intermédiaire (L. Wang et al., 2022).

## 4. Objectifs de la thèse

Mon projet de recherche a permis de poursuivre les travaux précédemment publiés dans Roy et al. (2020) et Roy et al. (2021), auquel j'ai eu l'opportunité de participer en réalisant l'extraction des petits ARN (**Annexe 1**), et d'approfondir plus spécifiquement l'étude des effets réciproques de l'immunité antivirale et du contrôle des ET chez deux modèles d'insectes, les mouches *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans* (**Figure 9**). Afin d'identifier le plus largement possible les caractéristiques de l'interaction entre l'infection virale et l'activité des ET, quatre virus différents ont été utilisés : le Virus C de la Drosophile (DCV), le Virus X de la Drosophile (DXV), le 'Flock House Virus' (FHV) et le Virus Iridescent des Invertébrés 6 (IIV-6). Ces virus diffèrent par la nature de leur génome (ADN ou ARN, double brin ou simple brin, brin positif ou négatif) et leur hôte naturel. En comparaison avec les précédentes études menées par Roy et al. (2020; 2021), ces pathogènes viraux ont la particularité de coder des suppresseurs de la voie d'ARNi. Les infections virales ayant été identifiées comme un facteur biotique influençant l'hôte, cela m'a amené à étudier plus en profondeur les modulations du contenu en ET et la dynamique virale à la suite d'infections expérimentales au sein de différentes populations et espèces de drosophile, et pour deux types de tissu : les ovaires et les carcasses, c'est-à-dire le reste du corps sans les ovaires.



**Figure 9 :** Schéma des interactions étudiées au cours du projet de thèse.

Depuis plusieurs années, les similitudes et différences ont fait l'objet de nombreuses études entre *D. melanogaster* et *D. simulans* en termes de physiologie, de morphologie, de comportement sexuel, de phylogénie, de contenu en éléments transposables et d'autres caractéristiques. Par ailleurs, un aspect majeur à prendre en considération dans l'étude des interactions est celui du fond génétique. De ce fait, l'utilisation de différentes lignées et espèces *Drosophila* nous a permis d'élargir notre compréhension dans l'analyse de la réponse immunitaire antivirale.



Le premier chapitre se concentre sur l'analyse détaillée des effets d'un virus naturel de drosophile codant un suppresseur de la voie d'ARNi et comment il peut être capable d'affecter les quantités de transcrits en ET au sein de deux tissus différents, chez différentes espèces *Drosophila*. Au préalable, le point de temps correspondant à la phase exponentielle de la réplication virale a été caractérisé. Les données de séquençage d'ARN et de petits ARN de *D. melanogaster* et *D. simulans* et de deux lignées transgéniques de *D. melanogaster* présentant des quantités de transcrit d'ET initialement différent ont permis de mettre en évidence les effets de DCV sur l'immunité antivirale et le contrôle des ET.

Le deuxième chapitre de mes travaux de recherche porte sur la caractérisation des propriétés de la réponse immunitaire qui induisent une modulation à la hausse ou à la baisse des quantités de transcrit d'ET en utilisant DXV, FHV et IIV6 : trois virus ayant un génome différent et codant un VSR. Au préalable, des expériences phénotypiques sur la mortalité liée à l'infection ont été réalisées. La dynamique virale a été évaluée par RT-qPCR et qPCR. Enfin, l'analyse du transcriptome après extraction des ARN et petits ARN a permis de tester si et comment les virus impactent l'activité de la voie d'ARNi dans le contrôle des ET et dans la réponse antivirale, au sein des ovaires et des carcasses chez *D. melanogaster* et *D. simulans*.

Enfin, mon manuscrit se termine par une discussion générale qui vise à intégrer les résultats présentés dans les deux chapitres, notamment les données présentées dans les articles qui sont en cours de préparation. Les hypothèses envisagées y sont également abordées, de manière à proposer des perspectives quant à l'influence que des infections virales peuvent avoir sur le contrôle et l'activité des ET, et sur la défense antivirale de l'hôte.

## Avant-propos

La première partie de ce chapitre présente rapidement les caractéristiques des deux espèces phares de *Drosophila* de mon projet de thèse, en abordant de manière globale les points communs, les différences ainsi que leurs caractéristiques propres et notamment la place des éléments transposables au sein de ces espèces.

La deuxième partie se concentre sur une description détaillée des caractéristiques du virus C de la Drosophile (DCV), un virus à ARN simple brin positif (ARNsb (+)), largement utilisé dans l'étude des fondements génétiques de la résistance antivirale chez la drosophile. En effet, après avoir analysé les effets de l'arbovirus Sindbis (SINV, ARNsb (+)), du virus sigma de la drosophile (DMelSV, ARNsb (-)), connu pour son tropisme dans les ovaires afin d'étudier l'impact d'une infection virale sur le contrôle gonadique des ET, nous avons choisi d'utiliser DCV, connu pour avoir une longue histoire co-évolutive avec *Drosophila melanogaster*.

Enfin, la troisième partie porte sur l'étude de l'infection par DCV sur le contrôle des ET. Nous avons combiné ce travail avec les analyses réalisés sur une souche transgénique de *D. melanogaster* fournie par Séverine Chambeyron (Institut de Génomique Humaine, CNRS, Montpellier), qui permettent d'étudier la réactivation des ET dans un fond génétique constant grâce à une mutation inductible de la voie des piRNA (Barckmann et al. 2018). Dans cette analyse, nous montrons que l'infection interfère avec le contrôle des ET et qu'une charge en ET plus élevée dans le transcriptome est associée à une immunité antivirale plus efficace. Cette étude souligne également le rôle majeur des ET dans la réponse immunitaire de la drosophile face à des virus naturels associés depuis longtemps. Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis prochainement dans le journal *Science*.

## 1. *D. melanogaster* et *D. simulans* : deux espèces sœurs

Parmi les 1 600 espèces différentes de *Drosophila* (O'Grady & DeSalle, 2018), *D. melanogaster* (ou la mouche du vinaigre) et *D. simulans* sont les deux espèces sœurs qui ont été utilisées tout au long de mon projet de thèse. Originaires d'Afrique subtropicale (H. Li & Stephan, 2006), l'espèce *D. melanogaster* a été décrite pour la première fois par Johann Wilhelm Meigen en 1830. Ce n'est qu'en 1919 que Sturtevant a décrit l'espèce *D. simulans*. La taille de leur génome est très proche (entre 160 et 180 Mb) et la divergence entre ces deux espèces aurait eu lieu il n'y a qu'environ 1,5 millions d'années (Obbard et al., 2012; Suvorov et al., 2022).

Malgré le fait qu'elles aient divergé relativement récemment, elles sont décrites comme des espèces différentes car elles sont sexuellement incompatibles, donnant lieu à des progéniture stérile ou non viable (Seeholzer et al., 2018). Elles sont décrites comme 'cosmopolites' avec une distribution géographique comparable, bien que *D. simulans* ait colonisé le monde plus récemment que *D. melanogaster* (Lachaise et al., 1988). Néanmoins, elles ont des systèmes écologiques très différents : *D. simulans* se retrouve uniquement dans des environnements forestiers, tandis que *D. melanogaster* est proche des habitations humaines et semble être mieux adapté à diverses conditions environnementales (Capy & Gibert, 2004; Coughlan et al., 2022; Lachaise & Silvain, 2004).

### 1.1. *Drosophila* et éléments transposables

Une différence majeure entre ces deux espèces a été décrite par Vieira et al. (1999; 2002) qui explique que l'accumulation d'ET représente un facteur important de variation de la taille du génome, correspondant à la colonisation mondiale de *D. melanogaster* mais pas à celle de *D. simulans*. Toutefois, des variations intraspécifiques du contenu en ET ont été observées, allant de 16% à 21%, entre plusieurs populations européennes de *D. melanogaster* (Kapun et al., 2020). Globalement, le génome de *D. melanogaster* compte environ 19% d'ET contre 12% pour celui de *D. simulans* (Mérel et al., 2020) : cette dernière contient donc moins de copies de famille d'ET au sein de son génome en comparaison avec celui de *D. melanogaster* (Dowsett & Young, 1982; Sessegolo et al., 2016). Cela suggère que les contenus en ET peuvent également varier entre espèces de drosophiles. Par exemple, des différences quantitatives ont démontré que l'élément P, lié au phénomène de dysgénésie hybride, avait été acquis par *D. simulans* par transfert horizontal à partir de *D. melanogaster* (Kofler, Hill, et al., 2015). D'autre part, les virus de la drosophile sont communs et largement distribués au sein des populations naturelles. Webster et al. (2015; 2016) ont notamment montré que *D. melanogaster* et *D. simulans* présentaient des différences de distributions et de prévalences concernant les virus présents dans la nature.

La différence de contenu entre ces deux espèces est également en lien avec des effets épigénétiques plus importants des ET chez *D. simulans*, dû à la présence d'un nombre plus élevé de marques épigénétiques répressives H3K9me2 proche des ET (Y. C. G. Lee & Karpen, 2017). Récemment, une étude portant sur 89 mouches issus de ces deux espèces sœurs et de trois populations différentes provenant d'Afrique de l'Ouest et d'Europe a permis d'estimer des taux de transposition, de recombinaison et de mutation, peu d'estimation de ces paramètres étant disponible (Y. Wang et al., 2023). Les auteurs ont par exemple observé que les populations

européennes de *D. simulans* et *D. melanogaster* avaient un taux de mutation similaire bien que cette dernière ait un taux de recombinaison significativement plus faible et un taux de transposition plus élevé mais non significativement différent.

D'autres études avaient précédemment constaté que ces deux espèces présentaient une hétérogénéité en termes de taux de transposition : *D. simulans* arbore davantage de sites d'insertion de séquences décrites comme anciennes et dégradées au sein de son génome tandis que *D. melanogaster* possède des copies complètes, donc éventuellement plus actives et pouvant créer davantage de mutations spontanées (Goubert et al., 2015; Guerreiro, 2012; Lerat et al., 2011). Kofler et al. (2015) ont constaté que, parmi les différentes classes d'ET, les transposons à ADN sont les plus actifs chez *D. simulans* tandis que ce sont les rétrotransposons chez *D. melanogaster*. Ces mêmes auteurs ont également observé que plus de 80% des copies d'ET de ces deux espèces ont des fréquences d'insertion inférieures à 0,2, et ont estimé qu'il y avait eu environ 200 insertions fixes chez *D. melanogaster* depuis sa divergence avec *D. simulans*. Un exemple très bien connu d'adaptation associée à des ET porte sur deux insertions différentes dans le même gène *cyp6g1* chez ces deux espèces différentes, impliquées dans la réponse au stress oxydatif (H. Chung et al., 2007). En comparaison avec des phénomènes d'adaptation dus à des insertions individuelles de copies d'ET, les ET peuvent aussi impacter les processus cellulaires de manière collective, du fait de leur nature répétitive. Il a été rapporté chez *D. simulans* et *D. melanogaster* que deux rétrotransposons, G2 et Joker-3, semblaient participer à la structuration et au fonctionnement des centromères (Chang et al., 2019). Récemment, l'analyse de 20 clusters piARN chez 4 espèces différentes, dont *D. melanogaster* et *D. simulans*, n'a montré aucune similarité de séquence entre ces deux espèces sœurs tandis que 70 à 80 % des clusters se trouvent être conservés au sein des espèces : les auteurs suggèrent une évolution rapide des clusters de piARN, probablement dû à l'insertion d'ET actifs et la suppression de certains ET plus anciens (Wierzbicki & Kofler, 2023). En se focalisant sur *D. simulans*, Kofler et al. (2018) avait précédemment observé qu'au cours de la première période d'invasion, le taux de transposition de l'élément P était élevé chez cette espèce.

*D. simulans* représente également un modèle d'étude puissant pour l'étude de l'impact des ET sur le génome hôte, notamment du fait de la variabilité intraspécifique qui existe concernant le rétrotransposon *tirant*. En effet, les différentes souches sauvages de cette espèce présentent un nombre variable de copies et de sites d'insertion de *tirant*, et d'expression de gènes (Akkouche et al., 2012; Fablet et al., 2019; C. Vieira et al., 1999). Une seule étude réalisée

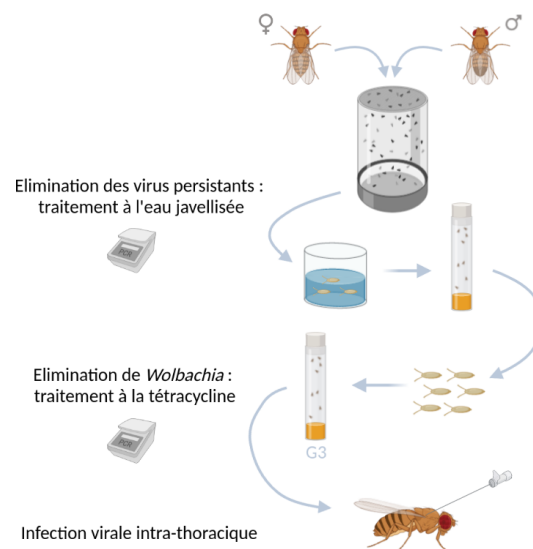
chez *D. simulans* a également établi un lien direct entre l'activité somatique de l'élément *Mariner* et une variable géo-climatique (Giraud & Capy, 1997).

## 1.2. *Drosophila* : cortège symbiotique

Les espèces *Drosophila* sont infectées par de nombreux micro-organismes et représentent pour ces derniers un réservoir de biodiversité (Olmo et al., 2019). Par exemple, la bactérie symbiotique intracellulaire *Wolbachia* infecte 40% des arthropodes (Zug & Hammerstein, 2012). Chez de nombreux arthropodes comme chez la drosophile, *Wolbachia* a notamment la capacité de manipuler la reproduction de son hôte en favorisant la sélection de femelles infectées, ayant une transmission vectorielle maternelle, ce qui permet l'invasion du symbiote dans la population (Turelli et al., 2022). *Wolbachia* a également été décrite comme ayant un effet protecteur lors d'une infection par des virus à ARN pathogènes naturels (Chrostek et al., 2013; Martinez et al., 2019; Teixeira et al., 2008) ou non (Bhattacharya et al., 2017) chez la drosophile, mais également chez le moustique face à des pathogènes humains (Caragata et al., 2019). Récemment, une étude portant sur 25 géotypes d'hôte différents de *D. melanogaster* a montré que la présence de cette bactérie pouvait impacter l'activité des ET de manière variable selon le génome de l'hôte et du type d'ET (Eugénio et al., 2023).

Au cours des dernières années, un grand nombre d'études portant sur les interactions hôte-pathogène a permis d'éclaircir les aspects fondamentaux des mécanismes de défense de l'hôte (Buchon et al., 2014; Dionne & Schneider, 2008; Hoffmann, 2003; Stuart & Ezekowitz, 2008). Toutefois, une étape essentielle à mon projet de thèse a été de s'affranchir de tout micro-organismes ou virus persistants pouvant interférer et perturber l'analyse des résultats, et ceci d'après le protocole de (Merkling & van Rij, 2015a). Pour chacune des différentes lignées de drosophiles, les œufs ont été immergés dans des bains d'eau javellisée, ce qui permet de déchorioner les embryons et d'éliminer les infections persistantes. Il convient de noter que toutes les lignées sont maintenues à 25°C, sauf les différentes générations de la lignée transgénique qui doivent être maintenues à 18°C, ce qui allonge considérablement leur cycle de développement à environ 1 mois. Après émergence des adultes, le traitement a été validée par PCR à l'aide des primers de virus souvent retrouvés dans les drosophiles de laboratoire tel que DCV, le virus A de la Drosophile (DAV), le virus Nora (NV) ou le virus Sigma (DMelSV) (Carpenter et al., 2007; Habayeb et al., 2006; Plus et al., 1975; Webster et al., 2015b). Pour éliminer *Wolbachia*, des traitements de tétracycline ont été appliqués sur les œufs. Enfin, après trois générations sans traitement et après s'être assurée de l'absence de l'absence de *Wolbachia*, j'ai pu procéder aux infections des drosophiles grâce aux stocks viraux de DCV fournis par

Natacha Kremer (**Figure 10**). Les différentes générations de la lignées transgéniques ont également été incluses dans nos expérimentations. Brièvement, la lignée initiale a été obtenue après plusieurs croisements, permettant de sélectionner une lignée possédant trois transgènes spécifiques : tubuline-Gal80 thermosensible, sh Piwi et *traff/c/jam*. A 18°C, la protéine Gal80ts inhibe l'activité de la protéine Gal4, l'empêchant de se fixer à la séquence régulatrice UAS (Upstream Activation Sequence) et d'activer l'expression du sh Piwi. A 25° (*heat shift*), la protéine Gal80ts est dénaturée, rendant la protéine Gal4 capable d'activer l'ARNi. Cela conduit à la déplétion de la protéine piwi dans les cellules somatiques.



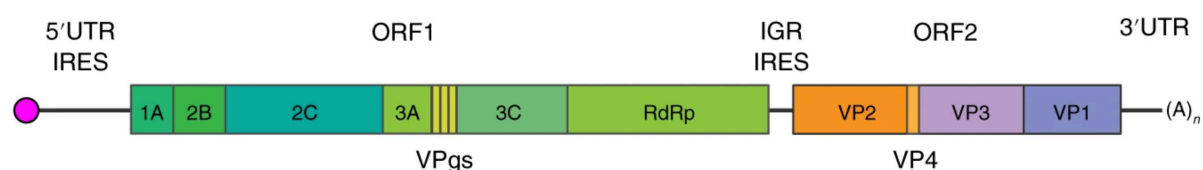
**Figure 10 : Schéma des principales étapes de préparation pour infection des drosophiles.**

La première étape consiste à placer des individus mâles et femelles dans une boîte d'élevage afin de pouvoir récupérer les œufs pondus dans les six heures suivant la ponte. Après l'étape de javellisation, les œufs sont déposés sur du milieu frais. Après émergence des adultes, un traitement à la tétracycline a été appliqué sur les œufs durant deux générations puis trois générations ont évolué sur un milieu standard, sans traitement, avant de vérifier l'absence des bactéries sur cette dernière génération (G3). D'après le protocole de Merkgling and van Rij (2015).

## 2. Virus C de la Drosophile (DCV)

Décrit pour la première fois en France par Jousset et al. (1972), le virus C de la drosophile (DCV) est un pathogène naturel des diptères (Kapun et al., 2010). Il est présent dans plus d'un tiers des populations de drosophiles sauvages et de laboratoire du monde entier (Plus et al., 1975; Wu, Luo, et al., 2010). Il est également capable de persister dans les lignées cellulaires de drosophile (Kapun et al., 2010). Son génome relativement petit, de 9 264 pb, a pu être séquencé en 1998 (Gateff, 1982; K. N. Johnson & Christian, 1998). DCV fait partie du genre *Cripavirus*, de la famille des *Dicistroviridae* et partage de nombreuses propriétés avec l'ordre *Picornavirales* auquel il appartient (Christian & Scotti, 1998). C'est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive et non enveloppé, dont les particules virales icosaédriques ont un diamètre de 25-30 nm. Le génome de DCV contient deux cadres de lecture (ORF)

(**Figure 11**) et leur traduction dépend des deux sites d'entrée ribosomique interne (IRES) situés à l'extrémité 5' pour l'ORF1 et dans la région intergénique pour l'ORF2. Le premier ORF code les protéines non structurales : le suppresseur ARNi A1, l'hélicase ARN C2, la protéine VPg liée au génome virale la protéase C3, l'enzyme RdRp, ainsi que les protéines d'assemblage du complexe de réplication virales B2 et A3. Le second ORF code les protéines structurales VP1 à VP4 qui forment la capsid du virus (Bonning & Miller, 2010; Huszar & Imler, 2008; van Rij et al., 2006). La molécule d'ARN est liée à la protéine virale VPg, qui sert d'amorce à la réplication de l'ARN viral, à son extrémité 5' et est polyadénylée à son extrémité 3'UTR (King & Moore, 1988; Paul & Wimmer, 2015).



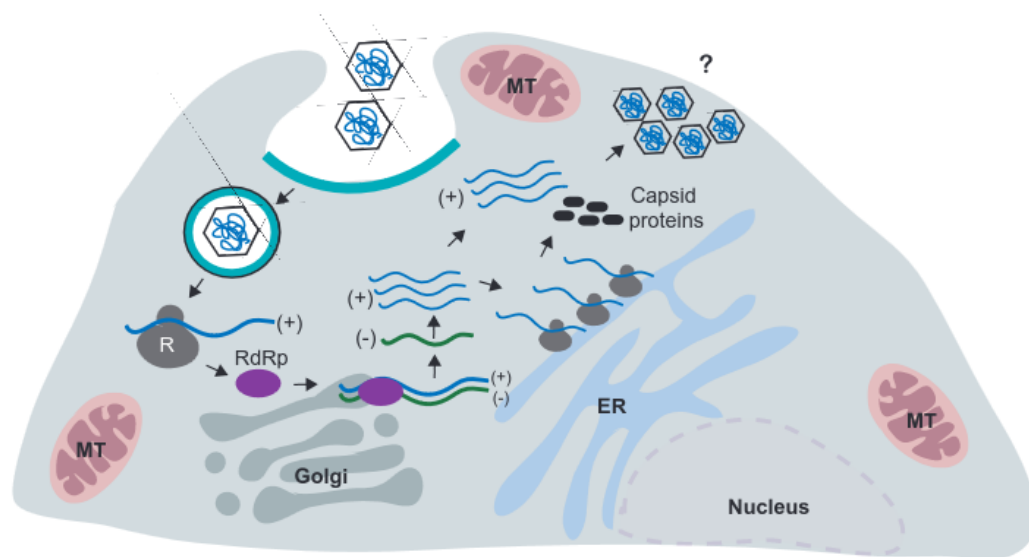
**Figure 11 : Schéma du génome du Virus C de la Drosophile (DCV).**

Composé d'un ARN positif simple brin, le génome viral contient deux cadres de lecture ouverts (ORF). L'ORF1 code pour les protéines virales non structurales : 1A, un suppresseur viral de la voie ARNi ; 2C, une hélicase à ARN ; VPg, une protéine liée au génome viral ; 3C, une protéase ; RdRp, ARN polymérase ARN-dépendante ; 2B et 3A, un assemblage du complexe de réplication virale. Les protéines structurales VP1 à VP4 constituent la capsid virale et sont codés par l'ORF2. IGR : Région intergénique ; IRES : Site d'entrée interne indépendant du ribosome. D'après Mongelli et al. (2022).

## 2.1. DCV : Cycle de réplication et transmission

Largement étudié par Cherry et Perrimon, le cycle de réplication viral de DCV est initié par endocytose, c'est à dire internalisation, des particules virales médiée par la clathrine dans un compartiment à faible pH (Cherry & Perrimon, 2004; Yang et al., 2018) (**Figure 12**). Cependant, le récepteur nécessaire à l'entrée du virus n'a pas encore été identifié. Une fois dans la cellule, le virus se libère de sa capsid et libère l'ARN génomique dans le cytoplasme qui va pouvoir être traduit puis répliqué. Le génome de DCV sert d'ARN messenger pour permettre la traduction des deux ORF qui est médiée par le ribosome hôte, produisant deux polyprotéines (Cherry et al., 2005; Moore et al., 1980, 1981). La réplication est réalisée par le biais de la RdRp qui synthétise le brin négatif de l'ARN et transcrit par la suite le brin positif de l'ARN. La synthèse de l'ARN déclenche le remodelage de l'appareil de Golgi et la production de vésicules cytosoliques par l'intermédiaire du complexe protéique d'enveloppe I (COPI), qui vont s'associer au complexe de réplication virale ; ainsi que la biosynthèse des acides gras nécessaire à la réplication (Cherry et al., 2006). COPI est nécessaire au cycle de réplication de DCV : il est responsable du transport intra-Golgi et rétrograde vers le réticulum endoplasmique. Ce n'est pas le cas des vésicules COPII qui assurent le transport rétrograde du réticulum endoplasmique vers le golgi (V. W. Hsu et al., 2009). A la fin du cycle, les particules virales matures

s'assemblent pour former des réseaux para-cristallins dans les cellules infectées, et la cytolysse permet de libérer les virions pour des infections futures.



**Figure 12 : Schéma du cycle de réplication des Dicistroviridae.**

L'entrée des particules virales dans la cellule se fait par endocytose médiée par la clathrine. Après la désenrobage, l'ARN viral est traduit et la réplicase virale s'associe à des vésicules dérivées du Golgi. La réplication se fait par l'intermédiaire d'ARN double brin sur ces vésicules. La production des brins (+) se fait à partir des brins négatifs (-). Par la suite, les brins (+) permettent la traduction des protéines de la capsid. Les virus sont ensuite assemblés et s'accumulent en réseaux paracrystallins dans les cellules infectées. La libération du virus nouvellement formé se produit par un mécanisme inconnu. ER : réticulum endoplasmique, MT : mitochondrie, R : ribosome, RdRp : ARN polymérase dépendante de l'ARN viral. D'après Chtarbanova (2011).

La transmission du virus se fait uniquement de manière horizontale, par ingestion de nourriture contaminée à tout stade du développement (Plus et al., 1975). Bien que les effets soient doses-dépendants et varient selon le mode d'infection, une infection par DCV peut être persistante ou aiguë, et impacter le comportement notamment induire des modifications sur la capacité de reproduction des drosophiles ou la viabilité des descendants (N. E. Martins et al., 2013). En effet, il a été décrit que les individus infectés produisaient davantage d'œufs ; et que ces derniers avaient un développement accéléré lors d'une contamination au stade larvaire, produisant alors un nombre plus important de descendants que les femelles non infectées (Gomariz-Zilber et al., 1995). Par opposition, l'infection peut induire des symptômes importants et conduire à une mort rapide de l'hôte, notamment lors de l'injection du virus. Le tropisme tissulaire de DCV est majoritairement le même entre les différents modes d'infection bien que moins limité au corps gras dans les premiers stades d'une infection systémique (Ferreira et al., 2014). Il est capable de se propager dans divers organes tels que dans le jabot (organe musculaire, similaire à l'estomac des mammifères), les muscles viscéraux de l'intestin moyen, le corps gras, les testicules ou également la gaine épithéliale entourant la chambre à œufs chez les femelles (Cherry & Perrimon, 2004; Deddouche et al., 2008; Ferreira et al., 2014;



Lautié-Harivel & Thomas-Orillard, 1990; Merklings & van Rij, 2015a; Sabatier et al., 2003). En raison des symptômes observés, il a été suggéré que la mort prématurée des drosophiles infectées serait causée par la malnutrition et la déshydratation induites par l'incapacité du jabot à se contracter ; ou par la production et/ou accumulation de composés toxiques (Arnold et al., 2013; Chtarbanova et al., 2014). Une variance génétique de la résistance et de la tolérance au DCV a également été décrite et associée au facteur de restriction *pastrel* (*pst*), ayant un effet protecteur (Cao et al., 2017; Kutzer et al., 2023; Magwire et al., 2012).

## 2.2. DCV : Suppresseur viral versus défenses immunitaires

La capacité du virus à être hautement pathogène lorsqu'il est injecté démontre une capacité à contourner les défenses antivirales, notamment à l'aide du suppresseur d'ARNi (A1) qu'il code (van Rij et al., 2006; X.-H. Wang et al., 2006). Plus précisément, le VSR de DCV ne se lie pas à l'ARNsb mais cible un large set d'ARNdb long à partir de 31 pb, n'étant donc pas spécifique à la séquence. De cette manière, l'interaction moléculaire entre le VSR et l'ARNdb pourrait être d'autant plus stable que la molécule d'ARN est longue. DCV-A1 empêche ainsi la reconnaissance et le clivage par Dcr-2 en se liant avec l'ARNdb, ce qui permet de réduire l'accumulation de siARN dérivées de DCV (Bonning & Miller, 2010; Sabin et al., 2013). De plus, il a été démontré que malgré la présence du VSR, l'activité générale de Dcr-2 et de Ago-2 ne sont pas totalement affectées : la régulation médiée par l'ARNi semble être spécifique au substrat, le contrôle des ET étant toujours fonctionnel.

Par ailleurs, (Berry et al., 2009) suggèrent que le VSR A1 n'affecte pas la voie des piARN dans les ovaires malgré un effet modeste observé. Ils montrent par ailleurs que la quantité de transcrits de ZAM et 297, deux familles d'ET, est affectée par A1. Il a été récemment démontré que certaines séquences de miARN pouvaient être affectées lors d'une infection par DCV (Monsanto-Hearne et al., 2017). De manière intéressante, une étude a montré que l'exposition à une faible dose de DCV ne permet pas de créer une protection contre une exposition ultérieure à une dose plus élevée (Longdon et al., 2013). Néanmoins, l'ARNi semble pouvoir être déclenché dans des cellules éloignées par le biais d'ARNdb libéré par les cellules infectées (Saleh et al., 2006, 2009).

En plus d'activer la voie d'ARNi, l'infection par DCV entraîne l'implication d'autres systèmes de défense immunitaire, plus précisément les voies Jak/STAT, Toll et Imd, avec une réponse variable selon le mode d'infection (Y. P. Cheung et al., 2022; Mondotte & Saleh, 2018; Rosendo Machado et al., 2021). De nombreuses études ont mis en évidence l'activation de divers gènes de la voie Jak/STAT dans la régulation de l'infection dont *vir-1*, *hopscotch*, *vago*,

*Upd2* et *Upd3*, ou les gènes *Turandot* de réponse au stress (Deddouche et al., 2008; Dostert et al., 2005; Kemp et al., 2013; Myllymäki & Rämet, 2014). Par exemple, il a été décrit que *vago* limite l'infection dans le corps gras en codant un peptide riche en cystéine, permettant une amplification de la réponse immunitaire (Deddouche et al., 2008). Un rôle de la protéine G9a dans la régulation de cette voie a également été rapporté par (Merkling et al., 2015) : elle modulerait l'action de cette voie à la suite d'infection par des virus à ARN. Par ailleurs, l'implication de la voie Jak/STAT se trouve être spécifique au virus (Kemp et al., 2013). Bien que le rôle de la voie Toll ait été rapporté, il a été spécifiquement observé lors d'une infection de DCV par voie orale, et non systémique (Zambon et al., 2005). Il a été observé que l'infection induit la translocation nucléaire du facteur *Dorsal*, dépendant de *Pelle* (Ferreira et al., 2014). Concernant la voie Imd, (Goto et al., 2018) ont par exemple révélé que l'inhibition de la kinase IKK $\beta$  et *Relish* conduisait à une augmentation significative de la réplication de DCV, par l'intermédiaire de gènes antiviraux comme dSTING et Nazo. A travers ces résultats, ces mêmes auteurs suggèrent que l'activation des composants en aval de la voie pouvait avoir lieu indépendamment de la voie Imd. Enfin, des gènes de la réponse au choc thermique sont activés par l'infection, probablement en lien avec le stress ou des altérations de la physiologie de l'hôte provoquées par l'infection (Merkling et al., 2015).

### 3. Article

#### 3.1. Transposable elements are major players of the arms race between a virus and its *Drosophila* host

En préparation

Camille A Mayeux<sup>a</sup>, Anaïs Larue<sup>b</sup>, Daniel S. Oliveira<sup>a</sup>, Hélène Henri<sup>a</sup>, Rita Rebollo<sup>b</sup>,  
Natacha Kremer<sup>a</sup>, Séverine Chambeyron<sup>c</sup>, Marie Fablet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, Laboratoire de Biométrie et Biologie   volutive, UMR 5558, F-69622 Villeurbanne, France

<sup>b</sup> Univ Lyon, INRAE, INSA Lyon, BF2I, UMR 203, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>c</sup> Institut de Génétique Humaine, CNRS, 34396 Montpellier CEDEX 5, France

#### INTRODUCTION

Transposable elements (TEs) are DNA sequences that are considered as genomic parasites because they have the ability to move and multiply along chromosomes at the expense of the host. They are very diverse in structure (number of genes, length, presence of repeats, *etc.*) and abundance (from a few percents in the honeybee *Apis mellifera* (Honeybee Genome Consortium, 2006) to ~ 80% of the recently sequenced arctic krill genome (Shao et al., 2023). Tolerance to TEs is possible thanks to epigenetic mechanisms that inhibit their activity, and there is a strong selective pressure for these mechanisms to be particularly efficient in gonads, where next generation genomes lie. In Insects, this control is essentially achieved through RNA interference (RNAi) pathways, and *via* the piRNA pathway in particular. piRNAs are 23-30 nt long single stranded RNAs that target TE sequences through sequence complementarity and that form complexes with proteins displaying RNase activity or tethering silencing heterochromatin machinery (Czech et al., 2018; Huang et al., 2017; Iwasaki et al., 2015; Yamashiro & Siomi, 2018).

RNAi is also the first line of defense against viruses in invertebrates (Nayak et al., 2013; Ghildiyal and Zamore, 2009; Galiana-Arnoux et al., 2006). Anti-viral immunity is achieved by siRNAs, which are 21 nt long single stranded RNAs, produced by Dicer-2 from double-stranded RNA matrices. Although siRNAs are described as involved in the somatic control of TE activity (W.-J. Chung et al., 2008; Kawamura et al., 2008; Okamura et al., 2008), the analysis of the cross-talks between TE control and antiviral immunity through RNAi has scarcely been studied. It was demonstrated that viral RNA genomes are converted to DNA by TE reverse

transcriptases, which allows the amplified production of viral siRNAs and the setup of a persistent infection (Goic et al., 2013; Tassetto et al., 2017). Moreover, a recent work showed that activation of the *mdg4* TE at the pupal stage was able to prime the anti-viral immunity for the adult (L. Wang et al., 2022). In addition, using the Sindbis virus (SINV), which naturally infects mosquitoes, we previously demonstrated that the host antiviral response led to an amplification of the production of TE-derived small RNAs, ending up in a reduction of TE transcript amounts (Roy et al., 2020). In the present study, we investigate the more complex, intimate cross-talk between the *Drosophila* host and *Drosophila* C virus (DCV), a natural pathogen with a long-lasting co-evolution.

DCV is a non-enveloped virus that belongs to the Dicistroviridae family. It has a 9.2 kb-long, single-stranded RNA (positive polarity) genome (K. N. Johnson & Christian, 1998). DCV is a natural pathogen of *Drosophila* that is horizontally transferred through oral infection. A few days after infection, and whatever the route of infection –either oral or systemic through experimental injections–, DCV viral particles can be detected in the fat body, trachea and visceral muscle of the crop, midgut, hindgut, and gonads (Ferreira et al., 2014). Systemic DCV infection causes intestinal obstruction that leads to fly death (Chtarbanova et al., 2014). DCV was first described in *D. melanogaster* but it can also naturally infect *D. simulans* (Kapun et al., 2010). The 99 most N-terminal residues of DCV ORF1 –encoding non-structural proteins– correspond to 1A, a viral suppressor of RNA interference (VSR) that binds long double-stranded RNAs (dsRNAs) and therefore prevents Dicer2-mediated production of siRNAs (Nayak et al., 2010; van Rij et al., 2006).

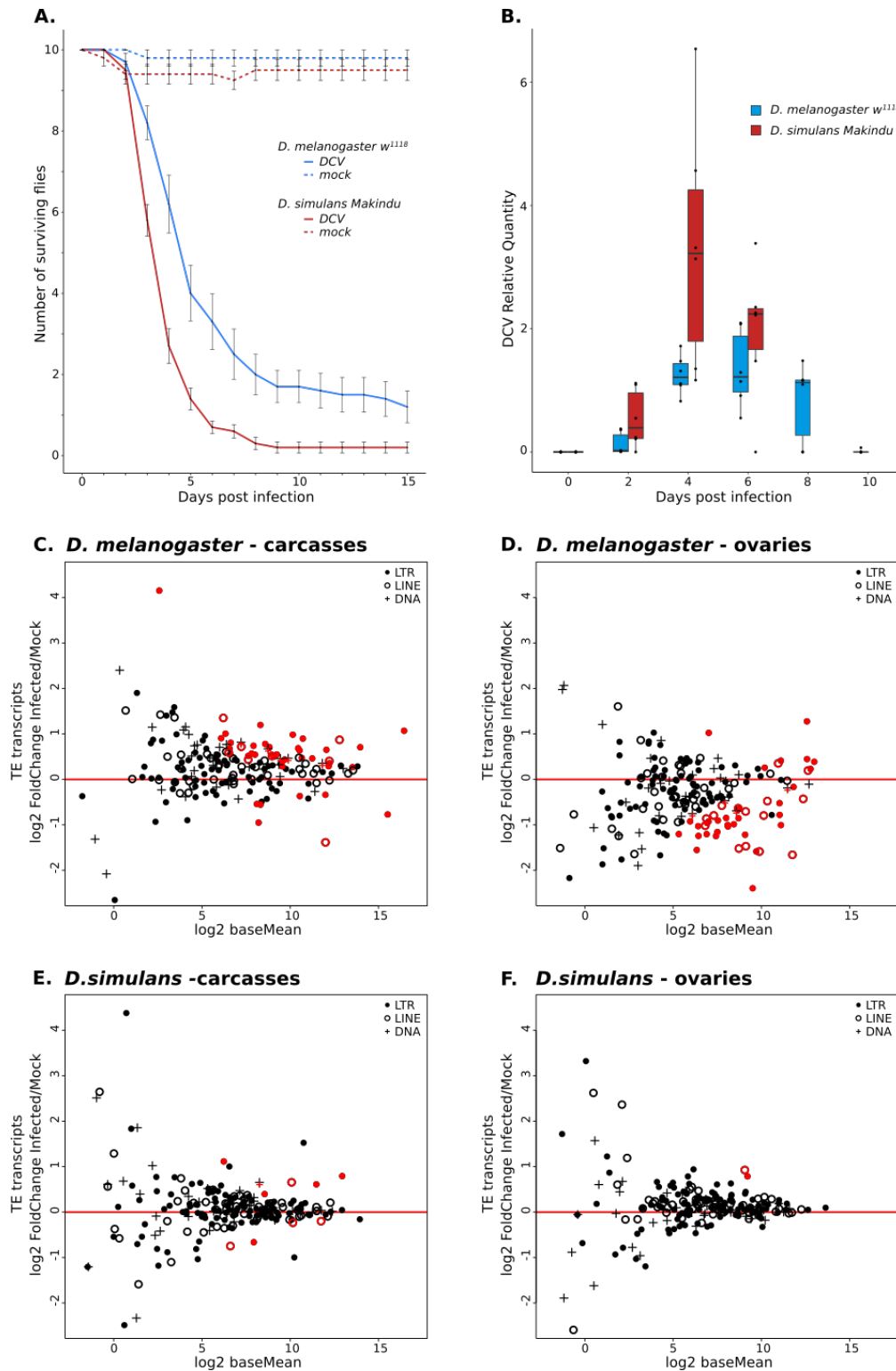
Here we show that DCV infection interferes with TE control, in a more complex way than a non-natural pathogen such as SINV, and particularly in its preferred *D. melanogaster* host, as compared to *D. simulans*. In addition, using a transgenic *D. melanogaster* strain, we are able to control TE RNA production in a constant genetic background, and we show that a higher TE load in the transcriptome is associated with a more efficient anti-viral immunity. This study highlights TEs as major players in *Drosophila* immune response against long-time associated natural viruses.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Host response to DCV infection is contrasted between *D. melanogaster* and *D. simulans*

We infected flies by intra-thoracic pricking (Martinez et al., 2014), and followed fly mortality and DCV replication. The infection rapidly led to fly death, and significantly more rapidly in

*D. simulans*: on average, half of the flies were dead at 5.4 days post infection (dpi) in *D. melanogaster*, and 3.8 dpi in *D. simulans* (Fig. 1A). Accordingly, RT-qPCR revealed that DCV replication was 2.6-fold higher in *D. simulans* compared to *D. melanogaster* at 4 dpi (the peak of replication) (Fig. 1B).



**Figure 1.** A. Fly survival upon DCV infection. B. Kinetics of DCV replication using RT-qPCR. C. to F. TE transcripts log<sub>2</sub>FC between DCV infected and mock conditions. Dot shape indicates TE classes, red line is log<sub>2</sub>FC=0, *i.e.* no modulation. Red dots are TE families displaying significant differential expression at the 0.05 level for DESeq2 adjusted p-values. C. *D.*

*melanogaster* w<sup>1118</sup> carcasses, **D.** *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> ovaries, **E.** *D. simulans* Makindu carcasses, **F.** *D. simulans* Makindu ovaries.

In order to study TE activity and control, we decided to perform RNA-seq and small RNA-seq experiments at the peak of viral replication, *i.e.*, 4 dpi in both species, in dissected ovaries and the rest of the body – hereafter called “carcasses”. DCV RNAs were highly abundant among the sequenced molecules in carcasses. We could also detect DCV RNAs in ovaries, however in much lower amounts, potentially corresponding to the presence of DCV in the muscle cells of the ovarian peritoneal sheath, as described by (Ferreira et al., 2014). In all samples, we found that DCV RNA-seq reads mapped all along the sequence of the viral genome, with a higher coverage over the 3’ half of the viral genome, which corresponds to genes encoding structural proteins (Fig S1).

There is abundant literature about *D. melanogaster* innate response to DCV infection (Y. P. Cheung et al., 2022; Merklings et al., 2015; Rosendo Machado et al., 2021; Schneider & Imler, 2021; Tafesh-Edwards & Eleftherianos, 2020). Notably, it is clearly described that the route of infection matters, whether it is orally transmitted or injected (Mondotte & Saleh, 2018). In the present study, we performed intra-thoracic injections, which are expected to induce the Jak-STAT pathway, and the *vir-1* gene in particular (Dostert et al., 2005; Kemp et al., 2013; Myllymäki & Rämetsä, 2014). Toll pathway is not expected to be involved in response to systemic DCV injections (Ferreira et al., 2014; Zamboni et al., 2005), nor does the Imd pathway, although *Relish* was described as implicated (Goto et al., 2018). As previously described (Chtarbanova et al., 2014), DCV infection leads to many down-regulated host genes in *D. melanogaster*, which we did not observe in *D. simulans*. In particular, downregulated genes in *D. melanogaster* somatic tissues are enriched in genes related to metabolic functions, while the few activated genes are enriched in stress-response activity, as reported by Chtarbanova et al. (2014) In *D. melanogaster* ovaries, we mostly detected suppressed genes upon DCV infection, and these are significantly enriched in functions related to egg formation. On the contrary, *D. simulans* Gene Ontology (GO) term profiles are more similar across somatic and ovarian samples and reveal an enrichment in activation of genes related to stress response.

Several hypotheses may be proposed to explain these differences in gene expression patterns between *D. melanogaster* and *D. simulans*. i) The sequencing data were produced at 4 dpi for both species, which corresponds to a higher number of dead flies and a stronger viral replication in *D. simulans*. Therefore, 4 dpi seems to be further away in the infection process in *D. simulans*. It is thus possible that the differences in patterns are due to differences in the

timeframe of infection rather than to species-specific differences. ii) Similarly, it is possible that the infection protocol leads to acute infection in *D. simulans* while persistence is achieved in *D. melanogaster*. iii) DCV is known and described as a *D. melanogaster* pathogen, displaying a long co-evolutionary history with its host. The differences between *D. melanogaster* and *D. simulans* outcomes may thus be due to *D. simulans* not being its preferential host, even though DCV has been found in natural samples of *D. simulans* (Kapun et al., 2010). Indeed, GO term analysis reveals the activation of stress induced response in *D. simulans*, a pattern expected when the host is naive to the pathogen. In contrast, the physiological response seems more complex in *D. melanogaster*, in particular with the suppression of metabolic pathways, as expected with a pathogen sharing a long co-evolutionary history.

### **DCV infection impacts the transcript amounts of transposable elements**

We analyzed in details the amount of transcripts for 237 TE families in the carcasses of the different samples, and we found a global significant increase upon DCV infection in *D. melanogaster* (median per TE family log<sub>2</sub> Fold Change (lg<sub>2</sub>FC) = 0.28, paired Wilcoxon test: p-value = 8e-12). Forty-three TE families are upregulated upon DCV infection (DESeq2 adjusted p-value < 0.05), while seven are down-regulated (Fig. 1C; See Fig S7 for TE family details). We could not detect significant differences across TE classes (Table S8). In *D. simulans*, there is virtually no modulation: we observed a significant increase for six TE families and a significant decrease for four TE families (Fig. 1E). Overall, the median per TE family lg<sub>2</sub>FC is 0.05 in *D. simulans* (paired Wilcoxon test, p-value = 0.03).

In ovaries, we observed an opposite pattern for *D. melanogaster* samples, with a clear decrease of transcript amounts in TE families: median per TE family log<sub>2</sub>FC = -0.38 (paired Wilcoxon test : p-value = 1e-9). Transcript amounts increase significantly for nine TE families while they decrease for 41 TE families (Fig. 1D). In *D. simulans* again, DCV infection had very little impact on ovarian TE transcript amounts (median per TE family lg<sub>2</sub>FC = 0.10, paired Wilcoxon test : p-value = 5e-9) (Fig. 1F).

For significant TE families, we compared lg<sub>2</sub>FC values between carcasses and ovaries, and found that they were positively correlated in *D. melanogaster* (Pearson correlation coefficient = 0.259; p-value = 0.020) (Fig S9). The correlation was marginally significant in *D. simulans* (Pearson correlation coefficient = 0.562; p-value = 0.071), but it has to be noted that the number of significant TE families is very low in this species. This indicates that TE families that display the highest lg<sub>2</sub>FC upon infection in carcasses were the TE families that also displayed the

highest lg2FC in ovaries, and inversely, suggesting the absence of interaction between TE family and tissue.

In order to understand the mechanisms underlying changes in TE transcript amounts upon DCV infection, we produced small RNA-sequencing data from the same experimental conditions. We could confirm that TE control *via* the piRNA pathway was not impacted upon DCV infection since ping-pong signatures were identified in all conditions (Fig S13). TE-derived siRNAs and piRNAs of both polarities increased upon DCV infection in all conditions (*D. melanogaster* and *D. simulans*, carcasses and ovaries). The increase was stronger in piRNAs compared to siRNAs (all TE families together, median log2FC: piRNAs: [0.25; 1.28], siRNAs: [0.05, 0.75]), and slightly stronger in *D. simulans* compared to *D. melanogaster*.

When TE control is achieved *via* small RNA interference, the expectation is that an increase in small RNAs leads to a decrease in RNA amounts, and reciprocally. However, here, the TE families displaying a small RNA increase upon infection are not significantly enriched in downregulated families, and this was consistent across all conditions (chi square tests, all p-values > 0.36, see Table S14 for details). Such a result reveals a de-correlation between TE transcript amounts and TE-derived small RNAs in the present experimental system.

It has been demonstrated that viral infections in drosophila trigger the active uptake of dsRNA molecules of viral origin in haemocytes, which fuels the siRNA machinery and allows the systemic production of antiviral siRNAs (Saleh et al., 2009; Tassetto et al., 2017). Using Sindbis virus (SINV), we previously proposed that dsRNA molecules of TE sequences hijack the uptake pathway, which would explain the observed systemic increase of TE-derived small RNAs (Roy et al., 2020). In the case of SINV, which is not a drosophila natural pathogen, this leads to a decrease in TE transcript amounts (Roy et al., 2020) ; however, this is not the pattern we observed upon DCV infection. We propose that such a discrepancy is due to 1A, the VSR encoded by DCV (no VSR has been described for SINV). In the tissues where DCV genome is expressed, 1A is produced and binds to long dsRNAs, however without any sequence specificity (Berry et al., 2009; Nayak et al., 2010; van Rij et al., 2006). Therefore, 1A essentially binds to dsRNAs produced from the virus, but also to other dsRNAs such as those produced from TE sequences, either due to antisense transcripts annealing to sense RNAs or to single-stranded transcripts folding back on repeated regions. Eventually, the production of TE-derived siRNAs is prevented, resulting in increased TE RNA amount. Therefore, we propose that the action of 1A is responsible for the de-correlation between TE RNA and small RNA amounts. TE-derived small RNA amounts thus result from these two mechanisms with opposed effects:



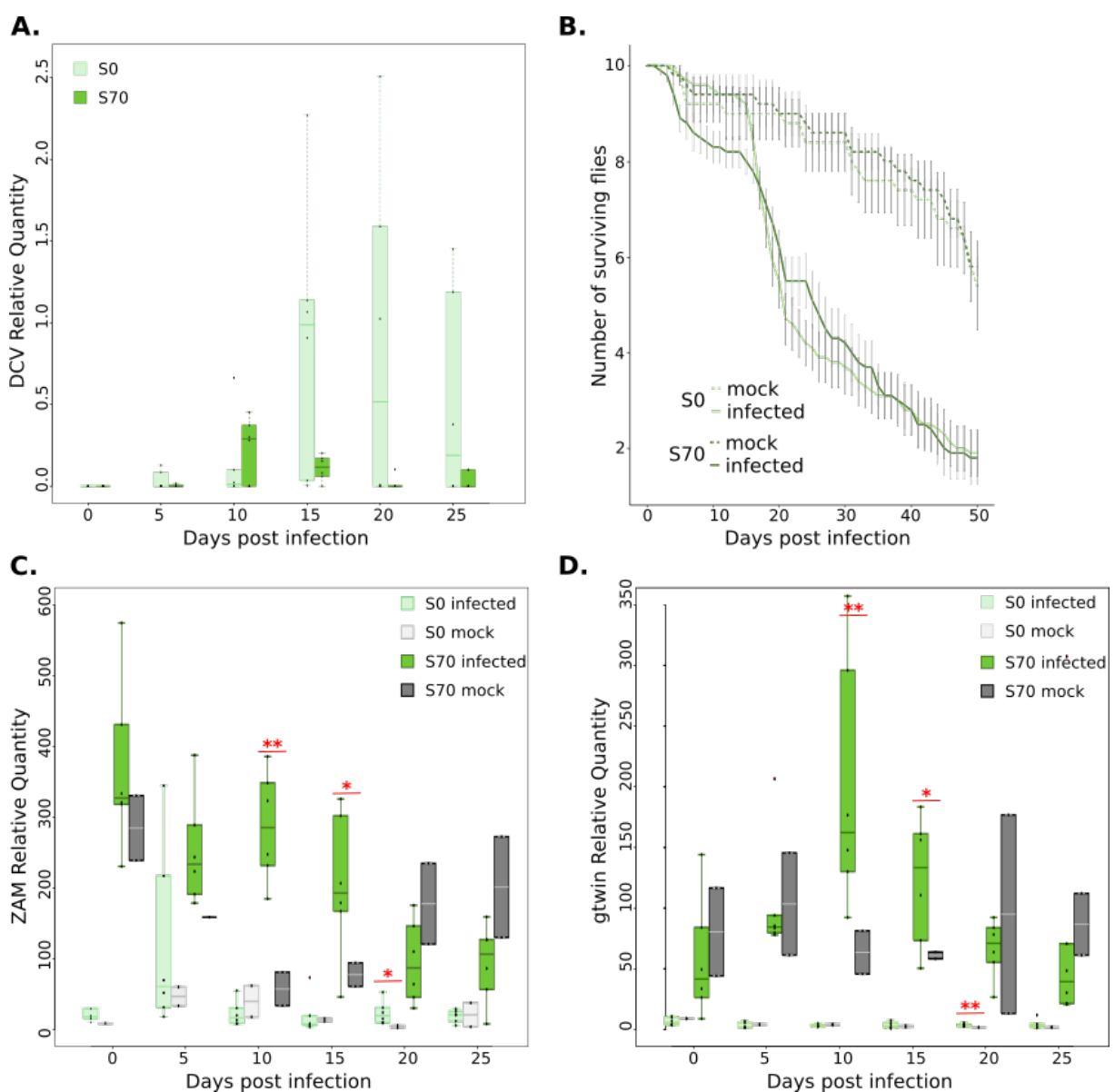
the activation of the dsRNA uptake pathway leads to piRNA and siRNA increase while the action of 1A leads to the reduction of siRNA production. Indeed, since 1A specifically binds to dsRNA molecules, it is expected to interfere with siRNA but not piRNA production, which explains why we observe that the resulting increase in small RNAs is more moderate for siRNAs compared to piRNAs. In the case of the infection by SINV that we previously studied, the tripartite interaction between host, virus and TEs is simpler and only results from TEs hijacking the dsRNA uptake pathway. Here, the virus under study is engaged in a long-lasting interaction with its host, resulting in an arms race illustrated by the setting up of counter-defence and counter-counter-defence from both partners. This ends up in an intricate relationship between the virus, the host and its TEs. Moreover, we propose that this explains the virtual absence of any TE phenotype in *D. simulans*, which, although being closely related to *D. melanogaster*, is not described as its preferred host. However, dsRNA recognition (both for the dsRNA uptake pathway activation and the action of 1A) is very well conserved over evolutionary times, and thus not expected to differ between *D. melanogaster* and *D. simulans*. Nevertheless, even if the target is well conserved, we may propose species-specific differences due to contrasted efficiencies in the production of 1A either at the transcriptional or post-transcriptional levels.

In addition, it is very likely that 1A is only produced in the tissues where DCV is expressed in *D. melanogaster*, which includes fat body, crop, midgut, hindgut, and more marginally the trachea (Ferreira et al., 2014). Ferreira et al. (2014) also described DCV in testes and ovarian peritoneal sheath, however not within gonads. Therefore, we hypothesize that 1A is absent from ovaries, which explains the global decrease in TE transcript amounts in this tissue. However, even if 1A was produced in ovaries, Berry et al. (2009) found that 1A was less efficient in this tissue using an artificial construct.

### **TE upregulation leads to reduced DCV replication**

On the other side, we wondered whether TEs modify DCV replication. Such a study is rather thorny because it requires to make TE transcript amounts vary within the same genetic background. We thus used a sophisticated transgenic *D. melanogaster* strain, which displays an inducible *piwi* knock-down [–constitutive *piwi* knock-down leads to fly sterility and thus prevents from obtaining progeny] (Barckmann et al., 2018). The repetitive, punctual knock-down of *piwi* along 70 successive generations (hereafter named S70 strain, S for shift in temperature causing *piwi* knock-down) led to the accumulation of TE copies from the ZAM and gtwin families, and was accompanied by an increase in transcript amounts for these

families, as compared to S0 (no temperature shift corresponding to the original strain) (Barkmann et al., 2018). Upon intra-thoracic injections, we found that DCV replicated earlier but at strongly reduced levels in S70 compared to S0 (Fig. 2A). Fifteen days after injection, mean DCV RNA levels were 8.1-fold higher in S0. Fly death rates were higher in S70 at the beginning of the infection, but the curves inverted around day 15 (Fig. 2B). Using RT-qPCR, we followed ZAM and gtwin somatic transcript amounts in both strains and both conditions (Fig. 2C and 2D). Similar to the global increase in TE transcript amounts observed in *D. melanogaster* *w<sup>1118</sup>*, we could detect significant increases in ZAM and gtwin transcript amounts around the peak of DCV replication.



**Figure 2.** A. DCV replication in S0 and S70 strains measured using RT-qPCR. B. Fly survival upon DCV and mock infections in S0 and S70 strains. C. ZAM transcript quantification upon DCV and mock infection in S0 and S70. Stars indicate significant differences between infected and mock conditions using t-tests (p-value: 0.05 \* 0.01 \*\*). D. gtwin transcript quantification

upon DCV and mock infection in S0 and S70. Stars indicate significant differences between infected and mock conditions using t-tests (p-value: 0.05 \* 0.01 \*\*).

We propose that the higher TE transcript amounts in S70 produce increased amounts of dsRNA molecules, which can titrate 1A. The reduction in 1A availability removes DCV protection against the fly RNAi machinery; this allows the host to produce more siRNAs against the virus and therefore set up a more efficient RNAi response. This ends up in reduced viral loads and increased fly survival.

We also investigated this question using the natural variability associated with TE copy numbers and transcript amounts using a collection of wild-type strains of *D. melanogaster* and *D. simulans*, previously described for their TEs (Mohamed et al., 2020). These strains were isogenized from populations sampled in France and Brazil. DCV replication and survival upon infection were found to vary across strains (Fig S15). In parallel, for each strain, we analyzed TE transcript amounts in carcasses and ovaries from control condition (“RNA\_CA” and “RNA\_OV”, respectively, data from here and Fablet et al. 2022), TE-derived ovarian piRNA amounts from control condition (“PI\_OV”, data from Mohamed et al. 2020), and the number of base pairs corresponding to TE sequences in the genome assemblies of these strains (“DNA”, data from Mohamed et al. 2020). For all these metrics, we considered the sum across all annotated TE families. While there are no correlations between DNA, RNA\_OV, nor PI\_OV, and d4 nor d6, we found marginally significant, negative Spearman correlations between RNA\_CA and d4 and d6 (RNA\_CA ~ d4 :  $\rho = -0.642$ ,  $p = 0.096$ ; RNA\_CA ~ d6 :  $\rho = -0.714$ ,  $p = 0.088$ ). None of the TE metrics correlated with d2.

Therefore, although natural strains display genetic variation, especially at the level of immune genes (Obbard et al., 2012), we were able to detect a negative correlation between somatic TE transcript amounts and DCV replication, which strengthens the biological meaning of our findings and allows us to propose that TEs partly explain the ‘missing heritability’ in DCV susceptibility (Cogni et al., 2016). Altogether, our results suggest that a higher TE load is thus beneficial in case of viral infections. At a larger evolutionary scale, *Aedes* mosquitoes are known as major vectors of arboviruses –which cause no harm to them–, and are described to carry a large TE load (*ca* half of their genome). The interaction between host, TEs and viruses uncovered here suggests that a high TE load may have been selected for in *Aedes* genomes because it allows to reduce the costs associated with viral infections.

Finally, our results shed light on TEs as major players of a subtle complex host-pathogen interaction built along a long-lasting co-evolution.

## MATERIALS AND METHODS

### *Drosophila* strains and rearing conditions

*D. simulans* Makindu strain was previously described by Akkouche et al. (2013) and Fablet et al. (2019). Wild-type strains were previously described by Mohamed et al. (2020): French *D. melanogaster*: dmgoth63, dmgoth101, Brazilian *D. melanogaster*: dmsj23, dmsj7, French *D. simulans*: dsgoth613, dsgoth31, Brazilian *D. simulans*: dssj27, dssj9. S0 and S70 transgenic *D. melanogaster* strains were previously described by Barckmann et al. (2018). All experiments were performed using 3-6 day old females.

Flies were reared on corn medium and maintained under standard laboratory conditions: 12/12 L/D cycle, 25°C (or 18°C for S0 and S70, in order not to induce *piwi* knock-down) and 70% RH. Chronic viral infections were eliminated by bleaching the eggs, as described previously (Merkling et al., 2015), except for S0 and S70. Three to 6-hour-old eggs were incubated in 50% household bleach (2.6% active chlorine) for 10 minutes, washed three times for 5 minutes in deionised water and then transferred to fresh medium for adult emergence. As expected, we could not detect amplification corresponding to the viruses using RT-PCR and the following primers: DAV: 5'- AGGAGTTGGTGAGGACAGCCCA -3' and 5'- AGACCTCAGTTGGCAGTTCGCC -3', NV: 5'- ATGGCGCCAGTTAGTGCAGACCT -3' and 5'- CCTGTTGTTCCAGTTGGGTTCGA -3', DmelSV: 5'- ATGTA ACTCGGGTGTGACAG -3' and 5'- CCTTCGTTTCATCCTCCTGAG -3) (Merkling and van Rij, 2015). *rp49* was used as control (5'- CGGATCGATATGCTAAGCTGT -3' and 5'- GCGCTTGTTCGATCCGTA -3') (Akkouche et al., 2012). To eliminate the *Wolbachia* endosymbiotic bacteria, 3- to 6-hour-old eggs were collected and placed on fresh standard medium containing 0.25 mg/ml tetracycline hypochloride (Sigma-Aldrich), for all *Drosophila* lines. The treatment was performed during two generations and then three generations recovered on standard medium without treatment. Absence of the bacteria was confirmed by PCR using *Wolbachia* 16S primers (5'- TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT -3' and 5'- GAATAGGTATGATTTTCATGT -3') (Holden et al., 1993), *Wolbachia* wsp (5'- TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC -3' and 5'- AAAAATTAAACGCTACTCCA -3') (Riegler et al., 2005) and *FtsZ* (Simões et al., 2011).

### Virus production and quantification

DCV was produced and titrated in Schneider's *Drosophila* Line DL2 cells, both kindly provided by Luis Teixeira/Ewa Chrostek. DL2 cells were kept in Schneider's *Drosophila* Medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin-streptomycin 10 000 U/mL (all Gibco). Seven days after infection (MOI: 2) in Schneider's *Drosophila* Medium supplemented with 1% penicillin-streptomycin 10 000 U/mL, the cell culture was collected and frozen at -80°C for 40 min. The culture was thawed, frozen again at -80°C for 40 min, and thawed to disrupt cells, and centrifuged at 4000g for 10 min to remove cell debris. The supernatant was aliquoted and stored at -80°C. DCV titer was calculated by the Reed and Muench end-point calculation method: DL2 confluent cells in 96-well plates were infected with a serial 10-fold dilutions of virus suspension. The presence of active DCV was scored by cell death or clear cytopathic effects, resulting in a DCV titer of  $4.22 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL. Similar dilutions with extracts of DL2 cells that were not inoculated with DCV did not cause any cytopathic effect in culture (Reed & Muench, 1938).

### **Virus inoculation and survival assays**

CO<sub>2</sub>-anesthetized flies were pricked in the left pleural suture on the thorax with a 0.15 mm diameter anodized steel needle dipped into the DCV solution, as described in (Martinez et al., 2014). Flies were pricked with the 'mock' solution to control for the absence of mortality in absence of DCV infection. For the survival assays, 100 infected females and 50 'mock' females were kept in rich medium vials, 10 flies per vial. Flies were transferred to fresh media every 2-3 days. The number of dead flies was recorded each day after infection, for 15 days for *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> and *D. simulans* Makindu and 50 days for transgenic flies.

### **RNA extraction and RT-qPCR**

To quantify DCV and TE expression, total RNAs were extracted individually for 6 infected and 2 mock flies at 0, 2, 4, 6 and 8 dpi using Qiazol and the RNeasy mini kit (Qiagen). Purified RNAs were processed using Turbo DNase (Ambion DNAfree kit). Reverse transcription was performed on 4 µL of total RNAs using SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen). qPCR was performed using 2 µL of cDNA, 0.5 µL of each primer (DCV : 5'-GACTGCCTTTGATTAG -3' and 5'-CCCTCTGGGAAGTAAATG -3', ZAM : 5'-CTACGAAATGGCAAGATTAATTCCAATTCC -3' and 5'-CCCGTTTCCTTTATGTCGAGTAGCT -3', gtwi : 5'-TTCGCACAAGCGATGATAAG -3' and 5'-GATTGTTGTACGGCGACCTT -3') and 5 µL of SsoADV SYBR® Green Supermix (Bio Rad) in a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) and

following : 30 sec at 95 °C; 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 58 °C for 30 sec. The *rp49* gene was used as a positive RNA control.

Standard curves were obtained, relating Cq values and amount of each template, using a 1:10 of 4 serial dilutions of a cleaned (Beckman Coulter AMPure XP reagent) and quantified (Invitrogen's Qubit™) PCR product. The PCR product was obtained by PCR on cDNA, initially retrotranscribed from RNA extraction, from *D. melanogaster w1118* flies infected with DCV. For DCV, ZAM and gtwin, absolute quantifications were obtained using the mean Cq values of the biological sample and the standard curves for *Rp49*.

### RNA-seq

Thirty pairs of ovaries were carefully and manually dissected and separated from the rest of the bodies ('carcasses') at 4 dpi. Total RNAs from 30 pairs of ovaries or 30 carcasses were extracted according to the protocol described above, using Qiazol and the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Purified RNAs (4 uL) were processed by TurboDNase (Ambion DNafree kit). RNA quality was validated using a Bioanalyzer (Agilent). Library preparation was performed at the GenomEast platform at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC, France) using Illumina Stranded mRNA Prep Ligation - Reference Guide - PN 1000000124518. Libraries were sequenced as paired-end 100 base reads (HiSeq 4000: Illumina).

Read alignment was performed using Hisat2 (Kim et al., 2019) on *D. melanogaster* and *D. simulans* reference genes available from FlyBase, versions r2.02 and r6.16, respectively, and previously masked using RepeatMasker. Alignments were processed using SAMtools (H. Li et al., 2009). Gene count tables were generated using eXpress (Roberts et al. 2011). TE count tables were obtained using the TEcount module of TEtools (Lerat et al., 2017) and the same TE reference files as used in Roy et al. (2020), and corresponding to 237 TE families. Gene and TE count tables were concatenated and then analyzed using the DESeq2 R package (version 4.3) (Love et al., 2014). The reference sequence used for DCV is NC\_001834.1 from GenBank.

The gene ontology (GO) analysis of RNA-seq data was performed on the differentially expressed genes with the gseGO function of the clusterProfiler package (Yu et al., 2012). The GO terms were obtained using the R package organism (Carlson, 2019) with the database org.Dm.eg.db v3.10.0, corresponding to all *D. melanogaster* annotated genes. Hereafter, the GO overrepresentation analysis of biological process (BP) was performed with adjusted p-values by the FDR method, p-value cutoff at 0.05, and a minimum of 3 genes per term.

### small RNA-seq

Ovaries of each female flies were carefully and manually dissected at 4 dpi. Small RNAs from 30 pairs of ovaries or 30 carcasses were extracted using the TraPR (Trans-kingdom, rapid, affordable Purification of RISCs) small RNA Isolation kit (Lexogen), as described previously (Grentzinger et al. 2020). The TraPR method allows the specific isolation of fully functional and physiologically relevant interfering RNAs (miRNAs, piRNAs, siRNAs and scnRNAs), by anion exchange chromatography. Size selection (18 - 40 nt) was performed on gel at the sequencing platform. Purified small RNAs were used for library preparation, using TruSeq Small RNA Sample Preparation Guide - PN 15004197. Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 4000 sequencer as single-end 50 base reads.

Sequencing adapters were removed using cutadapt (M. Martin, 2011) `-a TGGAATTCTCGGGTGCCAAGGAACTCCAGTCACTTA -m 1`. Size filtering was performed using PRINTSEQ (Schmieder & Edwards, 2011), in order to distinguish 21 nt-long reads (considered as siRNAs) from 23-30 nt-long reads (considered as piRNAs).

TE count tables for sense and antisense alignments were obtained using a modified version of the TEcount module (Fablet et al, 2019) of TETools (Lerat et al, 2017) on the same TE reference sequences as above. Ping-pong signatures were checked using signature.py with `min_size = 23` and `max_size = 30` options (Antoniewski, 2014). Read count normalization using microRNA counts as supposed invariants is a common strategy. However, it has been shown that some microRNA amounts could be affected by DCV infection (Monsanto-Hearne et al., 2017). This is why we performed three different normalization strategies : 1) normalization using all microRNA sequences annotated from FlyBase (19-39 nt-long reads mapped using bowtie --best on FlyBase reference sequences `dmel-all-miRNA-r6.16.fasta` and `dsim-all-miRNA-r2.02.fasta`), 2) normalization using microRNA sequences but excluding those described to vary upon DCV infection in Monsanto-Hearnes et al. (2017), 3) normalization using the endo-siRNAs described by Malone et al 2009, as we previously did in Roy et al. (2020). However, this last normalization procedure is only possible in *D. melanogaster* because endo-siRNA producing loci are not annotated in *D. simulans*. All normalization strategies provided similar patterns (Fig S10, S11, S12).

## Acknowledgments

This work was performed using the computing facilities of Laboratoire de Biométrie Biologie Evolutive / Pôle Rhône-Alpes de bioinformatique (CC LBBE/PRABI) and the biologic facilities: Symbiotron Pasteur platform, of Laboratoire Biologie Fonctionnelles, Insectes et Interactions (BF2i, Lyon) (managed by Federica Calevro, who we thank for her help). Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the ‘France Genomique’ consortium (ANR-10-INBS-0009). We thank Matthieu Boulesteix, Miriam Merenciano, Cristina Vieira for helpful discussions. We thank Nelly Burlet, Sonia Janillon and Agnès Vallier for technical help. We thank also Clément Gilbert, Feth el Zahar Haichar and Anna Zaidman for helpful discussions. This work was supported with funds from the ANR TEMIT (Transposable Element control and antiviral immunity).

## 3.2. Matériels supplémentaires

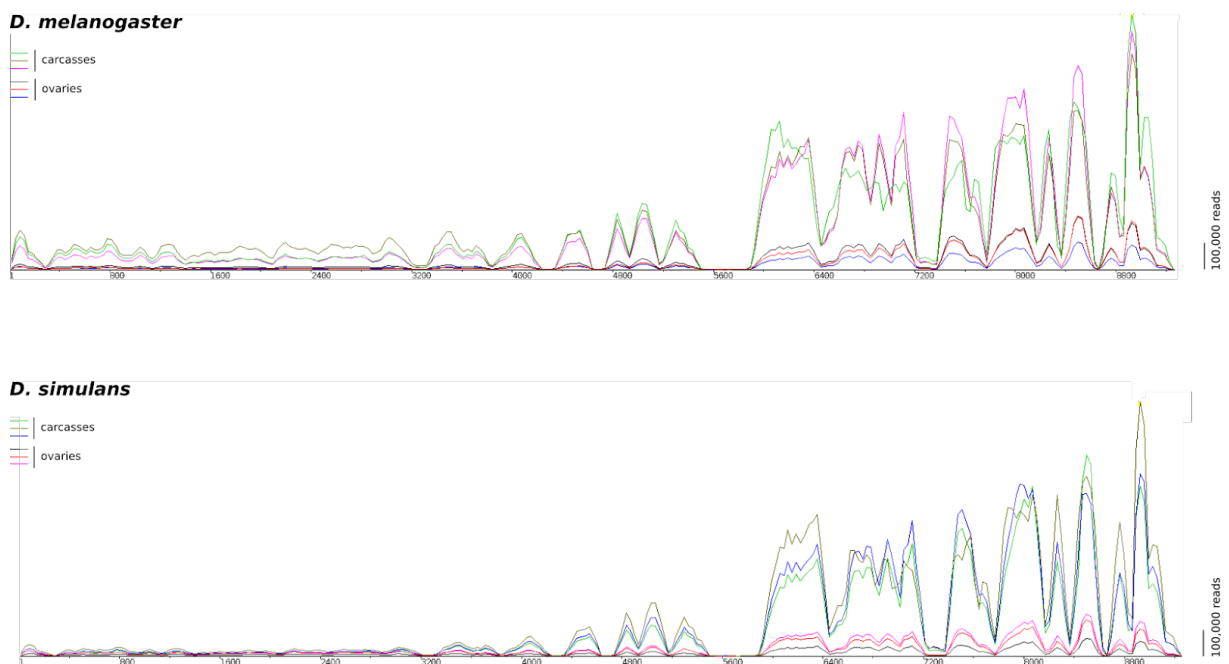
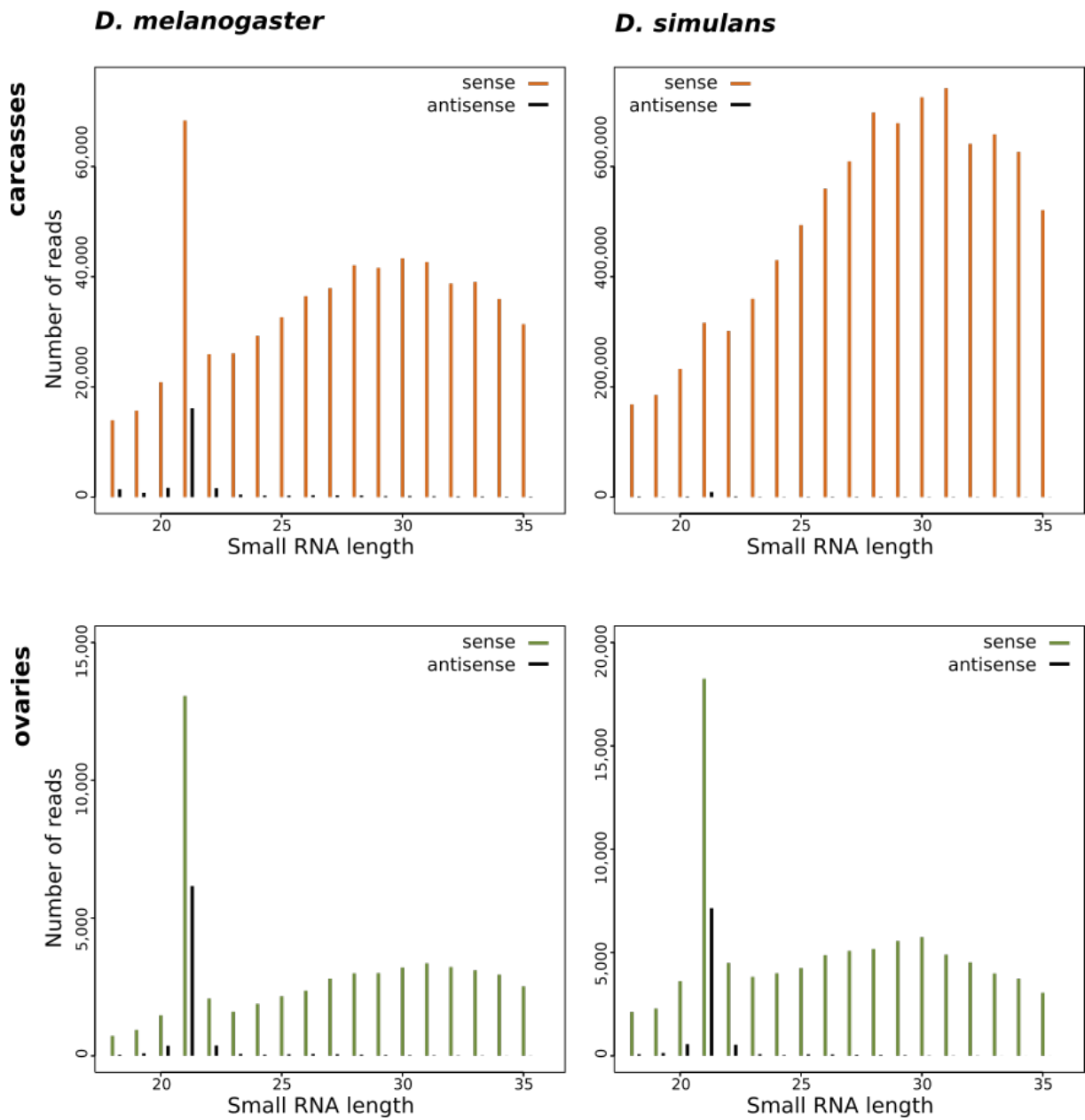
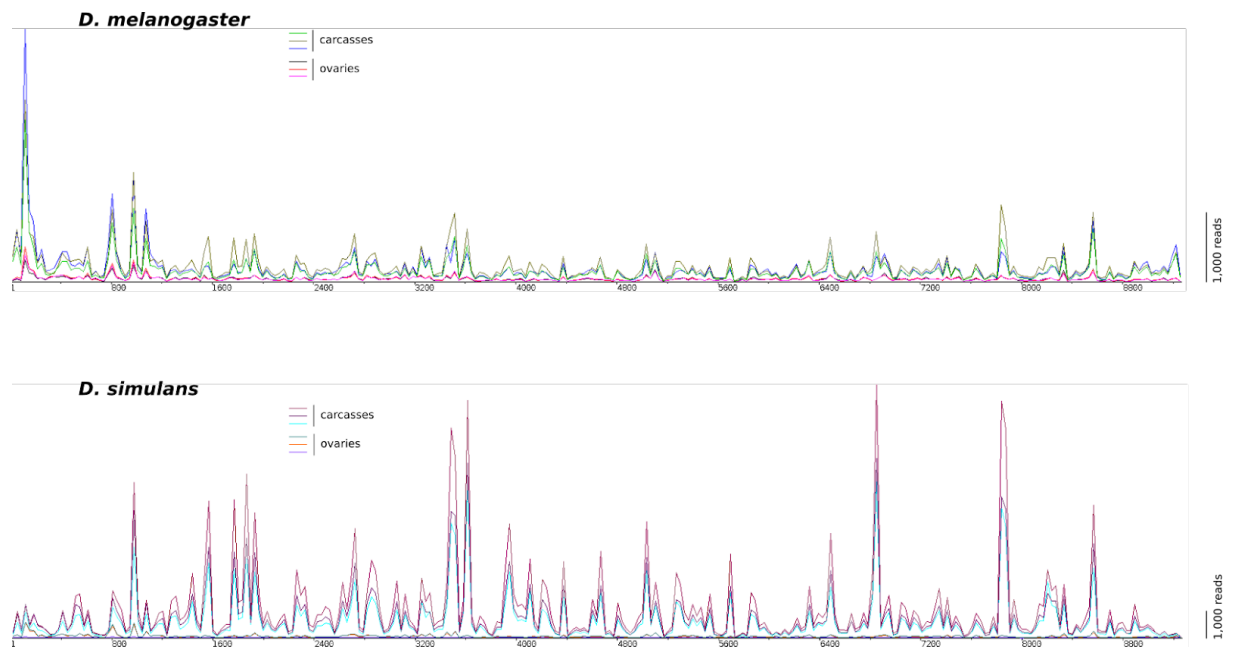


Figure S1. RNA-seq reads mapping along DCV genome.





**Figure S2. DCV-mapping read size distribution in small RNA-seq.** All replicates for a given condition are very similar to each other; only one replicate is shown.



**Figure S3. 21nt small RNAs mapping along DCV genome.** Please note that scales are different between both graphs.

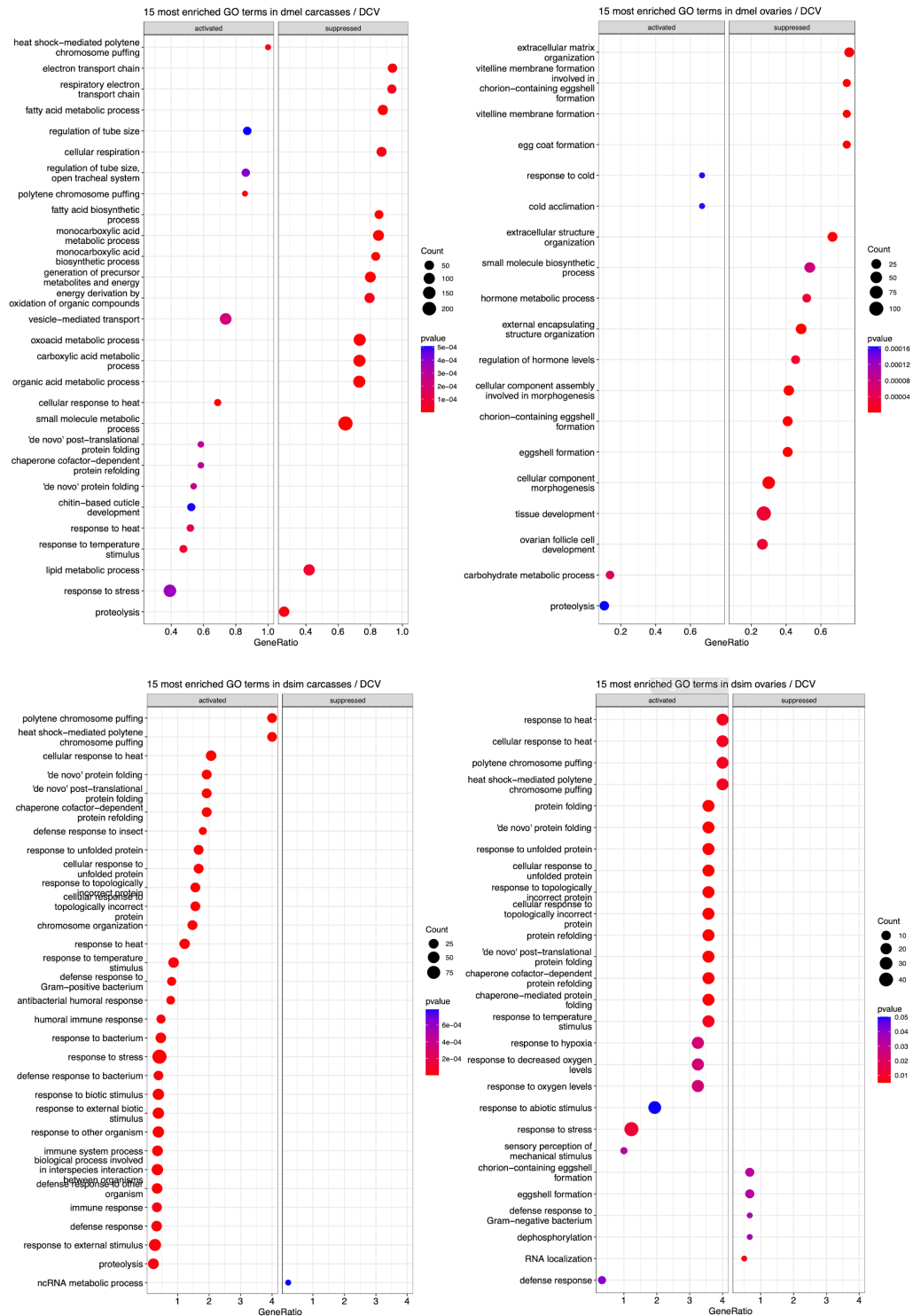
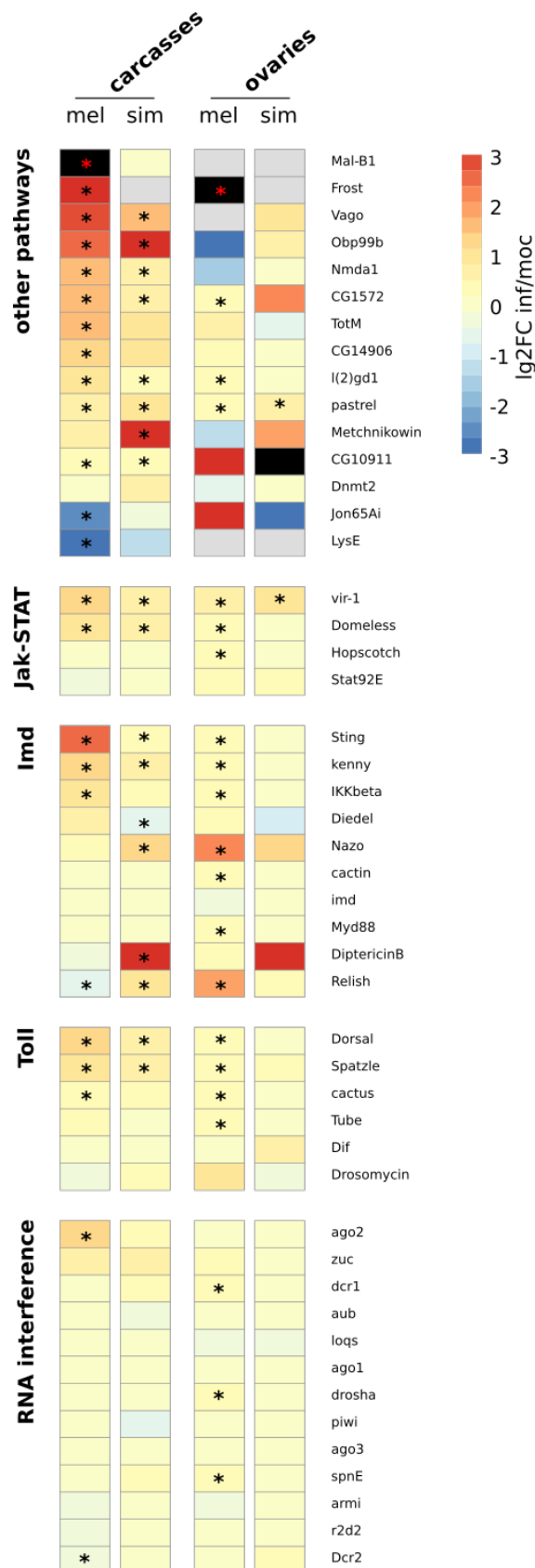


Figure S4. GO term analysis



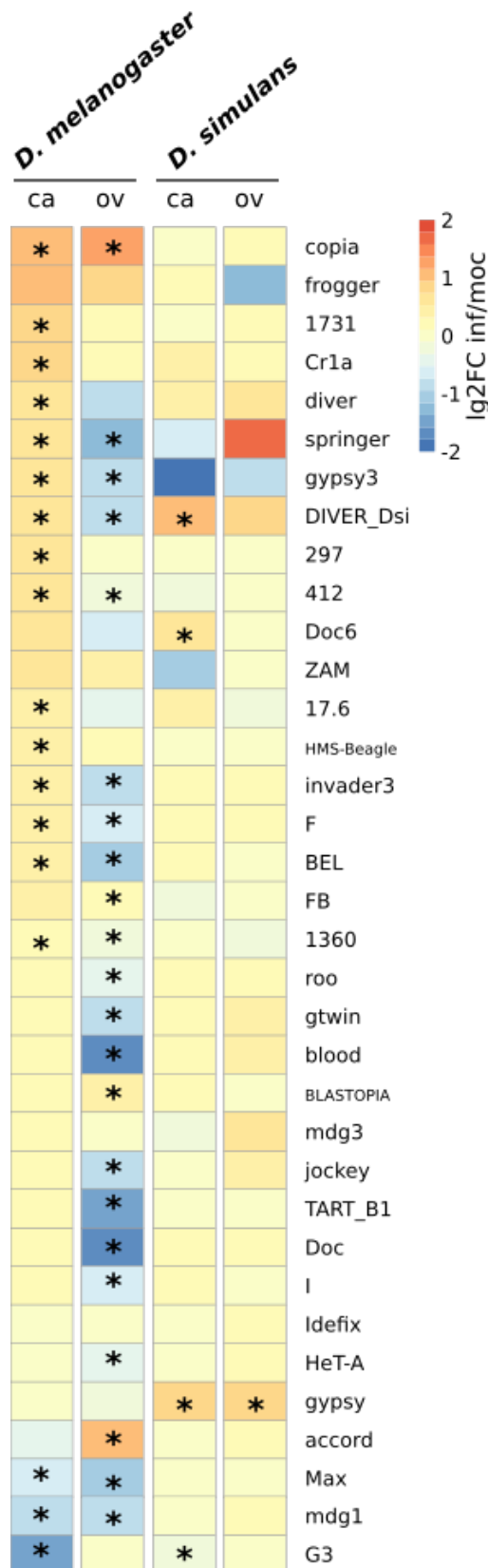
**Figure S5. Heatmap of log<sub>2</sub> Fold Change values between infected and mock conditions for genes involved in immune pathways.** Stars indicate significant p-values (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). Black boxes are out-of-scale (see Table S6 for details). For gray boxes, adjusted p-values could not be computed.

**Table S6. Log2 Fold Change and DESeq2 adjusted p-values between mock and infected conditions for genes involved in immune pathways in *D. melanogaster* (dmel) and *D. simulans* (dsim).**

	dmel	carcas ses			ovarie s			dsim	carcas ses			ovarie s		
name	dmel ID	base Mean	lg2 FC	p	base Mean	lg2 FC	p	dsim ID	base Mean	lg2 FC	p	base Mean	lg2 FC	p
Mal-B1	FBgn0032381	38.2	9.41	8e-13	0	NA	NA	FBgn0195163	8606.2	-0.12	0.384	0	NA	NA
Frost	FBgn0037724	10242.5	3.97	2e-100	439.3	8.90	1e-41	NA						
Vago	FBgn0030262	1881.0	2.78	1e-51	0	NA	NA	FBgn0188581	485.7	1.68	2e-11	7.3	1.04	0.810
Obp99b	FBgn0039685	94.3	2.63	9e-6	3.1	-2.79	0.200	FBgn0189234	327.2	4.03	1e-6	8.2	0.72	0.883
Nmda1	FBgn0013305	2816.7	1.60	4e-21	215.6	-1.65	0.111	FBgn0197085	4238.1	0.59	1e-15	2179.4	0.01	0.979
CG1572	FBgn0030309	2750.5	1.46	1e-21	860.7	0.43	3e-4	FBgn0185623	1813.3	0.61	2e-4	12.3	2.08	0.922
TotM	FBgn0031701	9007.4	1.43	0.007	52.1	0.67	0.485	FBgn0194721	2093.0	0.92	0.052	8.6	-0.62	0.907
CG14906	FBgn0015351	78.8	1.13	0.005	171.7	0.22	0.382	FBgn0268271	20.2	0.83	0.328	75.7	-0.03	0.989
l(2)gd1	FBgn0261983	595.5	0.90	3e-7	1105.2	0.24	0.023	FBgn0195134	694.3	0.29	0.015	1120.3	0.10	0.766
pastrel	FBgn0035770	14829.9	0.71	9e-8	865.2	0.38	1e-4	FBgn0184786	3312.8	0.96	4e-23	553.4	0.67	5e-6
Metchnikowin	FBgn0014865	1378.5	0.52	0.715	2.3	-1.29	NA	FBgn0066161	413.0	3.12	4e-29	1.6	1.93	NA
CG10911	FBgn0034295	13306.4	0.45	0.002	48.9	3.75	0.104	FBgn0196715	20003.8	0.30	0.045	9.7	-6.76	0.636
Dnmt2	FBgn0028707	24.1	0.09	0.921	103.1	-0.50	0.096	FBgn0195186	51.7	0.51	0.421	178.3	0.15	0.879
Jon65Ai	FBgn0035667	7478.8	-2.52	0.007	0.8	3.33	NA	FBgn0268717	5499.7	-0.27	0.350	1.3	-2.73	NA
LysE	FBgn0004428	165.3	-3.06	0.018	0	NA	NA	FBgn0270868	12.8	-1.10	0.445	0	NA	NA

vir-1	FBgn0043841	13278.0	1.29	2e-10	688.1	0.63	2e-5	FBgn0193533	22855.4	0.55	1e-8	321.7	0.98	1e-5
Domeless	FBgn0043903	1045.3	1.03	1e-24	3661.4	0.28	7e-6	FBgn0195787	887.3	0.57	1e-7	3198.6	0.11	0.606
Hopscotch	FBgn0004864	403.9	0.08	0.688	3036.9	0.29	1e-6	FBgn0068592	541.5	0.05	0.857	2738.8	0.07	0.844
Stat92E	FBgn0016917	4482.3	-0.30	0.076	5560.4	0.22	0.056	FBgn0191541	3685.5	0.07	0.548	6710.0	0.20	0.187
Sting	FBgn0033453	2227.2	2.51	2e-61	2011.0	0.33	2e-4	FBgn0182454	724.5	0.43	4e-4	2052.3	0.02	0.975
kenny	FBgn0041205	982.2	1.20	5e-26	1226.3	0.30	0.002	FBgn0067496	1084.3	0.68	2e-11	1080.0	0.10	0.847
IKKbeta	FBgn0024222	500.3	0.95	1e-10	1422.9	0.38	1e-6	FBgn0067497	434.0	0.21	0.327	1655.5	0.00	0.991
Diedel	FBgn0039666	134.7	0.76	0.160	0.3	0.22	NA	FBgn0188975	8687.7	-0.49	8e-11	1.9	-1.08	NA
Nazo	FBgn0037562	877.0	0.25	0.092	17.6	2.31	0.001	FBgn0190054	324.2	1.11	1e-9	0.6	1.39	NA
cactin	FBgn0031114	141.8	0.07	0.830	543.1	0.27	0.027	FBgn0269906	192.6	0.13	0.741	809.3	-0.01	0.983
imd	FBgn0013983	324.6	0.00	0.993	136.9	-0.45	0.113	FBgn0067498	381.2	0.03	0.959	214.0	-0.11	0.901
Myd88	FBgn0033402	884.5	-0.03	0.860	1280.5	0.28	3e-4	FBgn0181860	1836.6	-0.05	0.792	1458.0	0.27	0.958
DiptericonB	FBgn0034407	1542.0	-0.27	0.851	11.3	0.32	0.870	FBgn0183168	139.2	3.9	0.026	1.0	3.52	NA
Relish	FBgn0014018	763.9	-0.69	0.026	595.9	1.95	9e-4	FBgn0029245	2053.8	0.90	6e-24	1155.3	0.25	0.187
Dorsal	FBgn0260632	2084.8	1.17	5e-34	2192.6	0.36	4e-7	FBgn0067500	3080.2	0.52	2e-11	2102.0	-0.00	0.993
Spatzle	FBgn0003495	689.2	0.87	6e-11	2709.1	0.24	3e-5	FBgn0067488	614.0	0.67	0.002	2533.8	0.23	0.318
cactus	FBgn0000250	2729.6	0.44	1e-9	10343.3	0.30	4e-13	FBgn0067503	3972.6	0.17	0.106	13973.1	-0.00	0.995
Tube	FBgn0003882	408.2	0.30	0.059	1685.2	0.26	3e-4	FBgn0067487	320.1	0.06	0.887	1680.9	0.08	0.844

Dif	FBgn0011274	2206.6	-0.02	0.914	164.4	0.07	0.839	FBgn0067525	2733.9	0.06	0.683	149.5	0.65	0.170
Drosomy cin	FBgn0283461	25992.1	-0.28	0.632	82.4	0.90	0.268	FBgn0084867	2779.8	0.35	0.067	19.6	-0.25	0.975
ago2	FBgn0087035							FBgn0084451	4013.0	0.16	0.153	3826.2	0.12	0.648
zuc	FBgn0261266	20.5	0.72	0.392	588.9	0.25	0.063	FBgn0193556	17.5	0.49	0.851	941.0	-0.08	0.883
dcr1	FBgn0039016	252.4	0.05	0.872	1754.6	0.38	7e-5	FBgn0084784	345.3	0.18	0.482	2542.2	0.02	0.969
aub	FBgn0000146	82.5	0.02	0.979	2798.6	-0.11	0.057	FBgn0193614	68.3	-0.25	0.871	2651.6	-0.01	0.983
loqs	FBgn0032515	512.8	0.01	0.954	1177.2	-0.17	0.069	FBgn0084799	1207.2	-0.08	0.597	3869.3	-0.16	0.500
ago1	FBgn0262739	2947.8	0.00	0.998	7196.4	0.08	0.525	FBgn0084546	3886.8	-0.07	0.632	10079.5	0.07	0.871
drossha	FBgn0026722	153.4	-0.04	0.908	14112.4	0.19	0.029	FBgn0182290	238.7	0.13	0.783	1662.6	-0.01	0.981
piwi	FBgn0004872	177.8	-0.07	0.921	7273.4	-0.01	0.799	FBgn0193615	112.6	-0.77	0.194	6638.2	0.05	0.921
ago3	FBgn0250816	4892.0	-0.08	0.898	17809.4	0.08	0.333	FBgn0270325	32.8	-0.08	0.990	1048.2	-0.12	0.899
spnE	FBgn0003483	134.8	-0.09	0.904	3882.8	0.37	1e-5	FBgn0190560	105.9	0.28	0.865	4160.3	0.13	0.742
armi	FBgn0041164	154.4	-0.18	0.692	2770.5	-0.16	0.100	FBgn0185467	158.2	-0.00	0.998	2929.3	0.13	0.576
r2d2	FBgn0031951	388.9	-0.21	0.169	1807.2	0.09	0.257	FBgn0084228	415.9	0.02	0.973	2362.8	-0.04	0.927
Dcr2	FBgn0034246	978.4	-0.28	0.042	2303.6	0.09	0.613	FBgn0084576	887.9	0.00	0.994	1656.8	0.24	0.418



**Figure S7. Heatmap of log<sub>2</sub> Fold Change values between infected and mock conditions for some TE families.** See Supplemental files for the complete list of TEs. Stars indicate TE families that are significantly differentially expressed (DESeq2 adjusted p-value < 0.05).



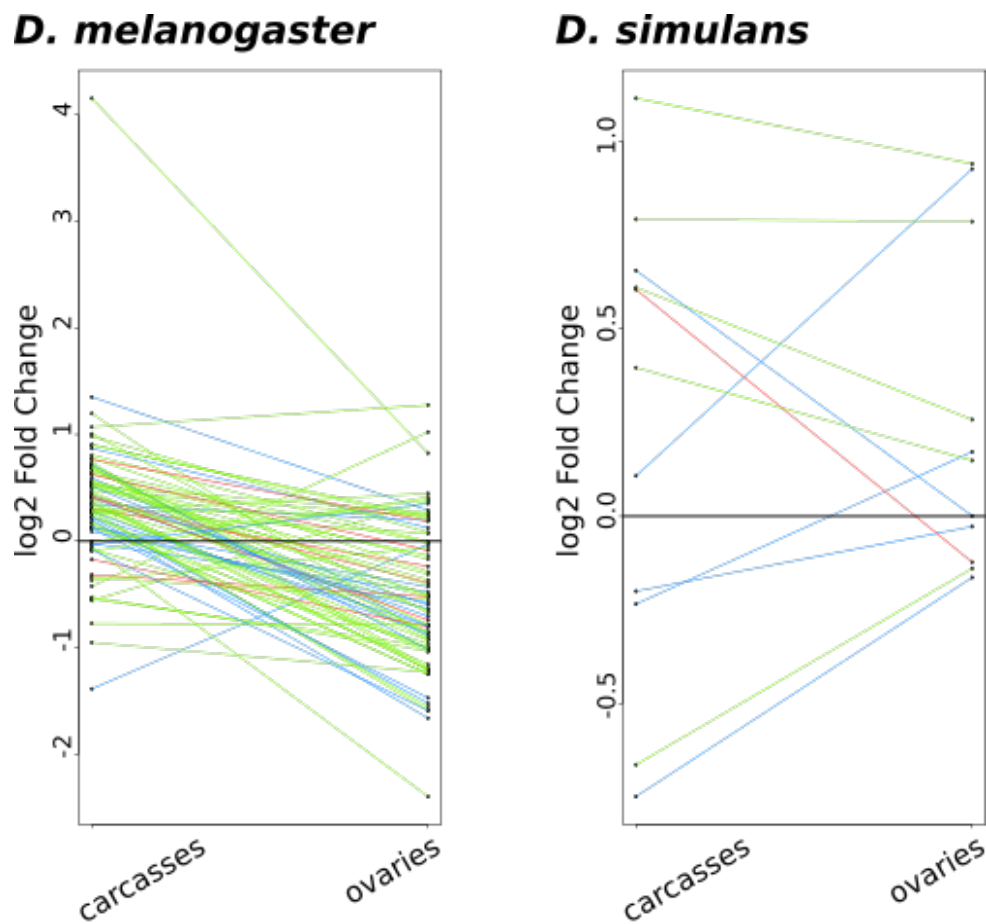
**Table S8. Contribution of TE classes to differentially expressed TE families.**

**A.** Median values across TE families of log<sub>2</sub> Fold Changes in read counts between infected and mock conditions, from RNA-seq data. P-values correspond to the paired Wilcoxon test comparing read counts in infected vs mock conditions across TE families.

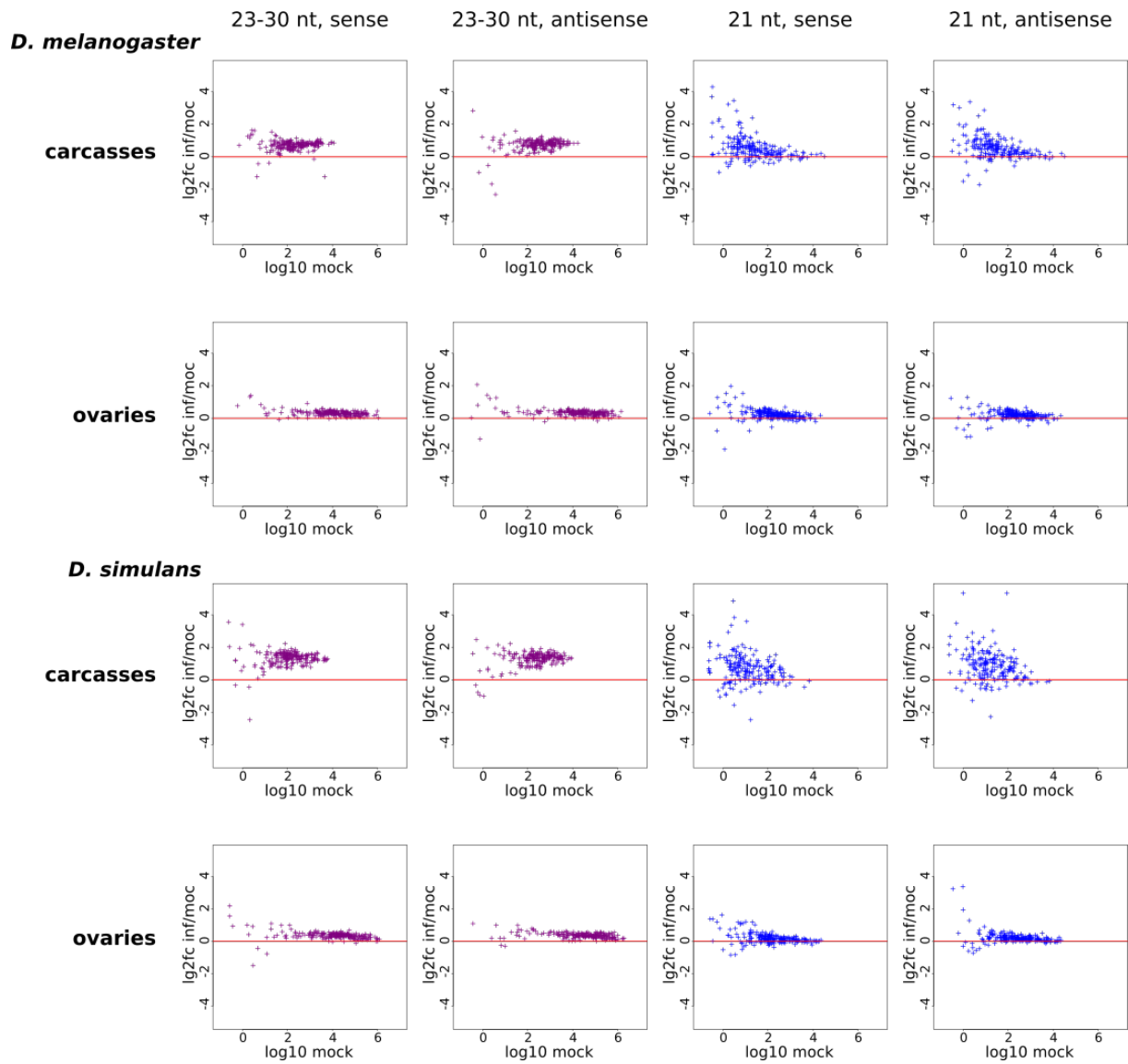
	LTR		LINE		DNA	
Condition	median lg2FC	p-value	median lg2FC	p-value	median lg2FC	p-value
<i>D. melanogaster</i> carcasses	0.292	3.1e-6	0.230	9.1e-5	0.306	9.1e-4
<i>D. melanogaster</i> ovaries	-0.349	7.2e-5	-0.477	2.7e-4	-0.240	0.002
<i>D. simulans</i> carcasses	0.044	0.052	0.059	0.260	0.054	0.691
<i>D. simulans</i> ovaries	0.152	7.8e-8	0.131	1.7e-4	-0.046	0.446

**B.** Distributions of the numbers of differentially expressed (adjusted p-value < 0.05) TE families according to TE class, and Fisher exact test comparing distributions across classes.

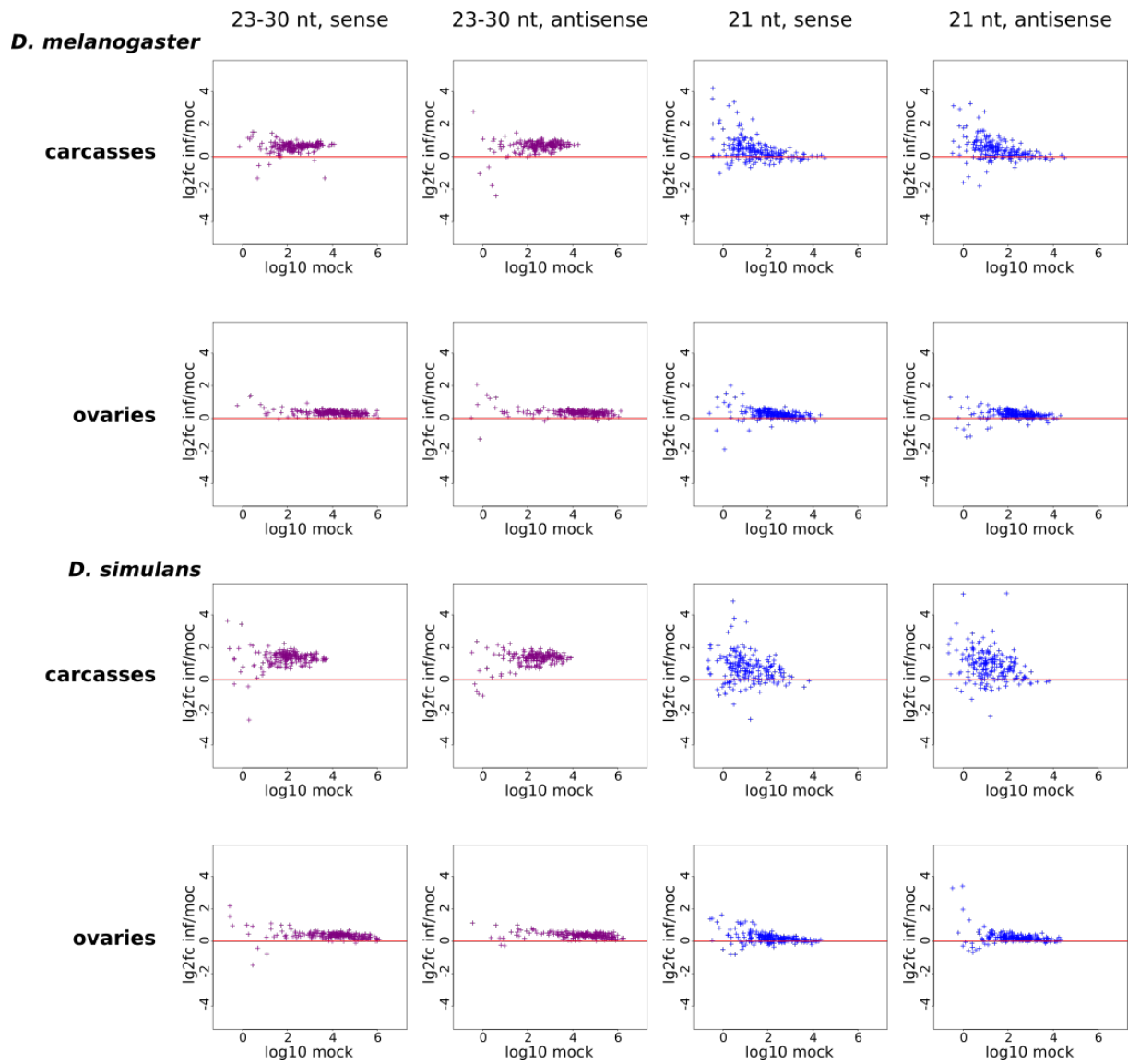
		LTR	LINE	DNA	p-value
<i>D. melanogaster</i> carcasses	lg2FC > 0	31	7	5	1
	lg2FC < 0	6	1	0	
<i>D. melanogaster</i> ovaries	lg2FC > 0	7	2	0	0.619
	lg2FC < 0	24	13	4	
<i>D. simulans</i> carcasses	lg2FC > 0	4	1	1	0.190
	lg2FC < 0	1	3	0	
<i>D. simulans</i> ovaries	lg2FC > 0	1	1	0	1
	lg2FC < 0	0	0	0	



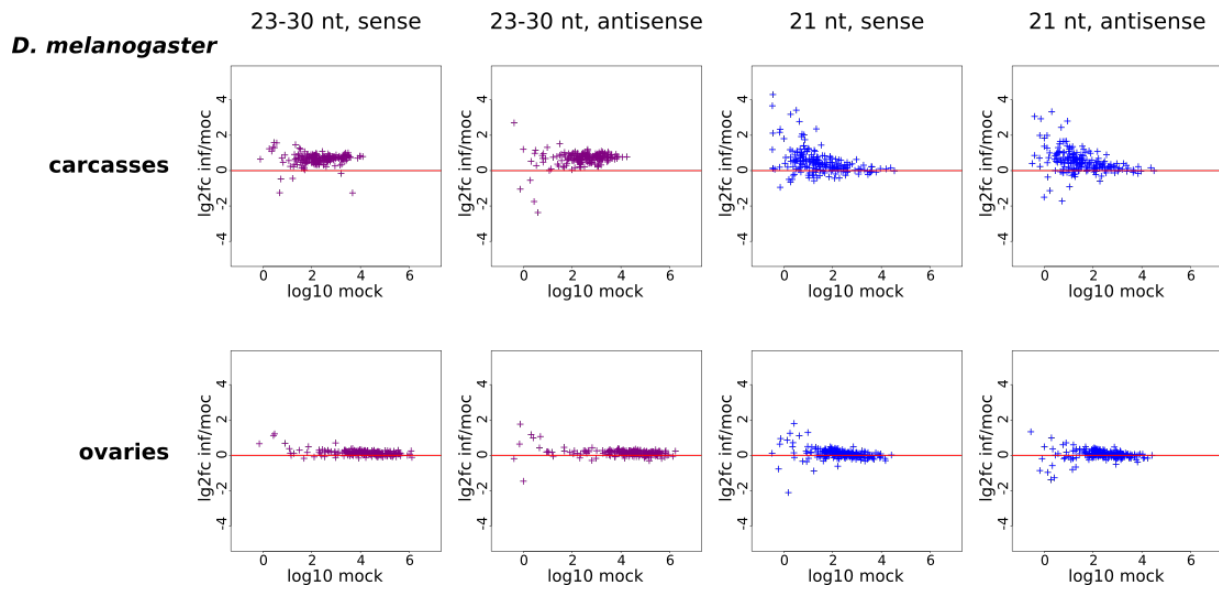
**Figure S9. Correlation between log<sub>2</sub> Fold Changes in carcasses and ovaries, for differentially expressed TE families in at least one condition.** The colors green, blue, and red correspond to LTR, LINE, and DNA classes, respectively. *D. melanogaster* : 80 TE families, Pearson correlation coefficient between carcasses and ovaries = 0.259, p-value = 0.020. *D. simulans* : 11 TE families, Pearson correlation coefficient between carcasses and ovaries = 0.562, p-value = 0.071.



**Figure S10. TE-derived small RNAs log<sub>2</sub> Fold Changes between infected and mock conditions.** Normalization using the complete set of miRNA sequences.



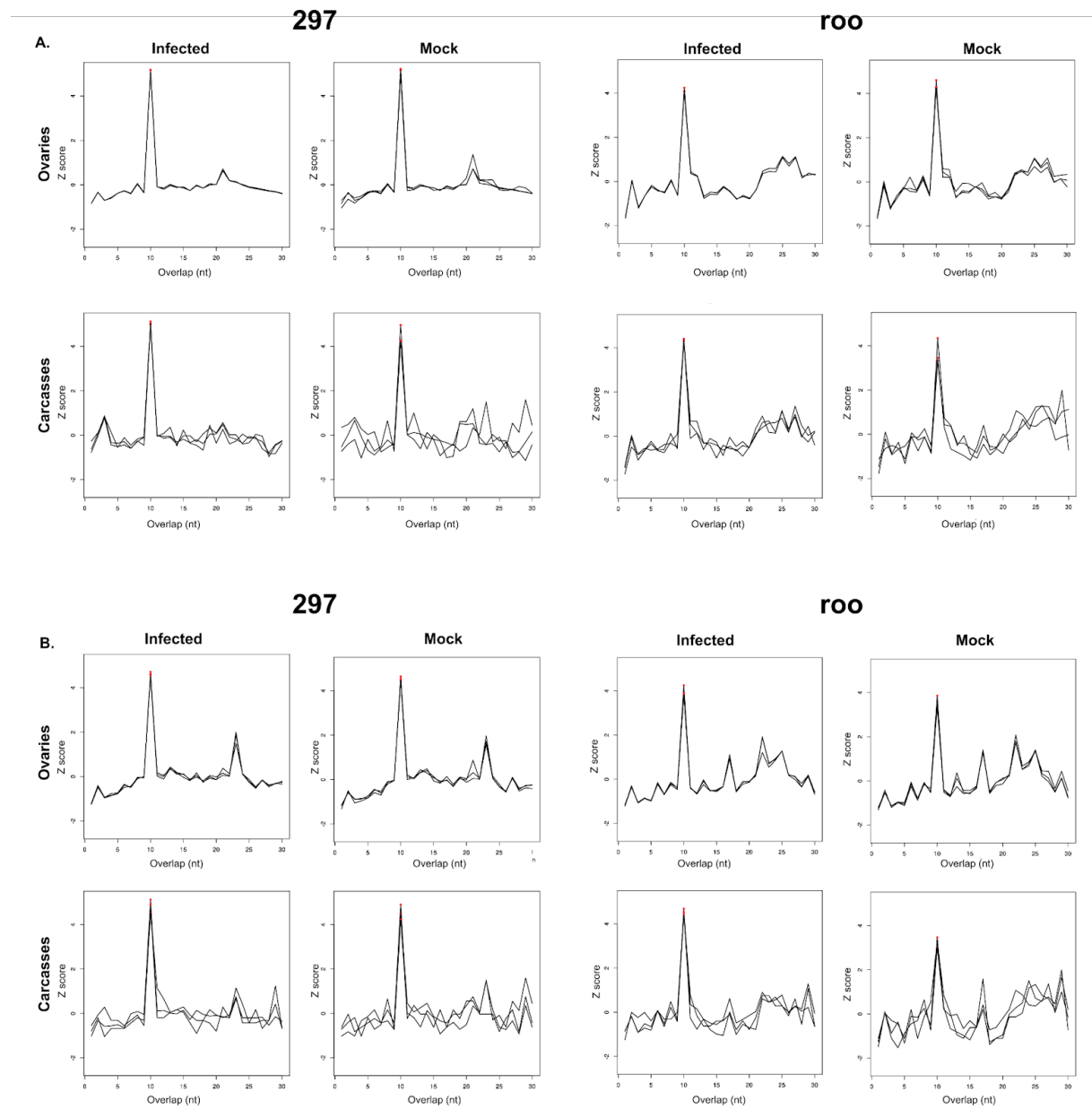
**Figure S11. TE-derived small RNAs log<sub>2</sub> Fold Changes between infected and mock conditions.** Normalization using miRNA sequences and removing the miRNAs identified in Monsanto-Hearnes et al. (2017) as modified upon DCV infection.



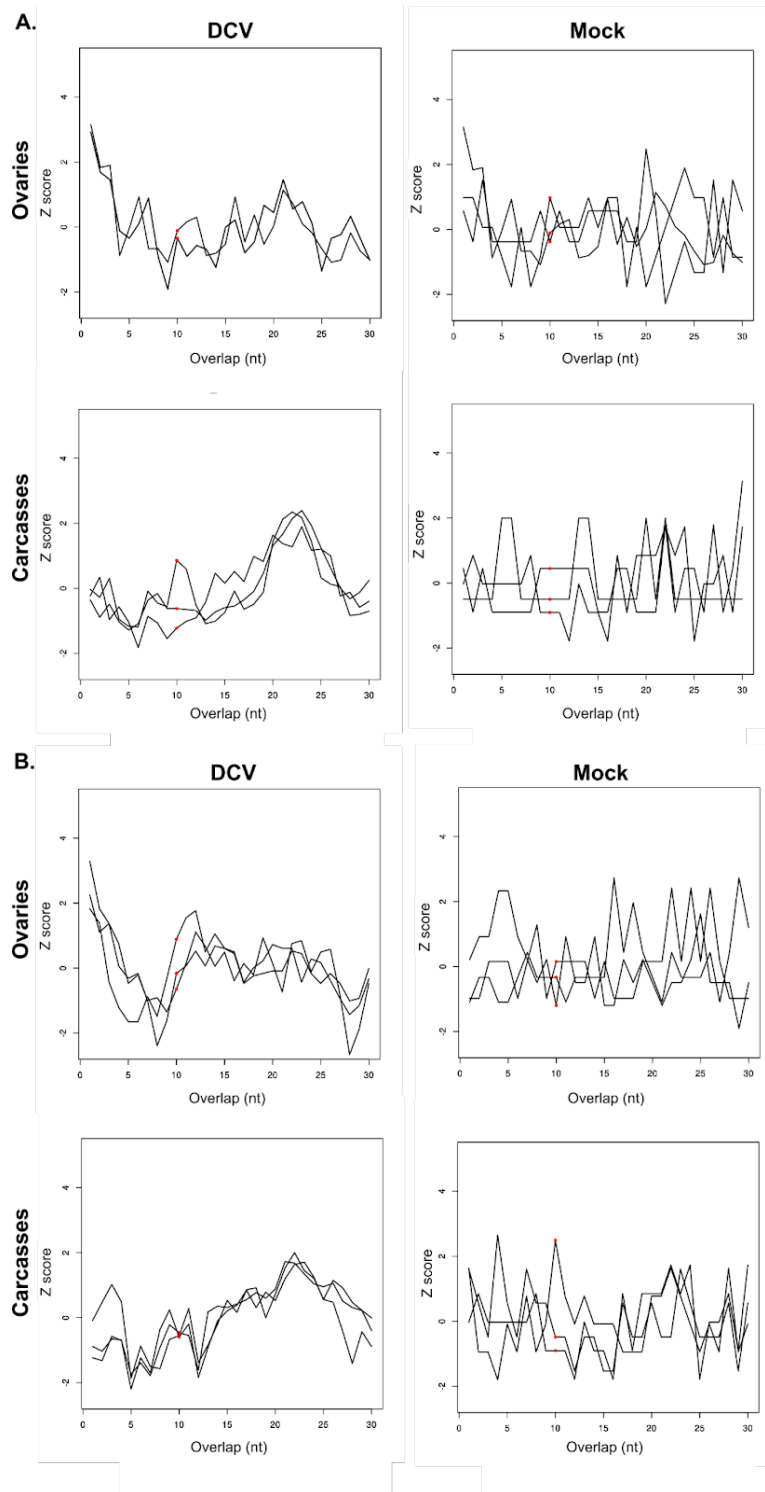
**Figure S12. TE-derived small RNAs log<sub>2</sub> Fold Changes between infected and mock conditions.** Normalization using endo-siRNAs, as defined by Malone et al 2009. This normalization can only be performed on *D. melanogaster* samples because endosiRNA clusters are not annotated for *D. simulans*.

**Figure S13. Ping-pong signatures in both infected and mock conditions after DCV infection.**

**A.** Ping-pong signatures for roo and 297 in *D. melanogaster* w1118 (A) and *D. simulans* Makindu (B)



**B.** Ping-pong signatures for piRNAs targeting DCV in *D. melanogaster* w1118 (A) and *D. simulans* Makindu (B).



**Table S14. Dependency tests between TE transcript log<sub>2</sub> Fold Changes and TE-derived small RNA log<sub>2</sub> Fold Changes.**

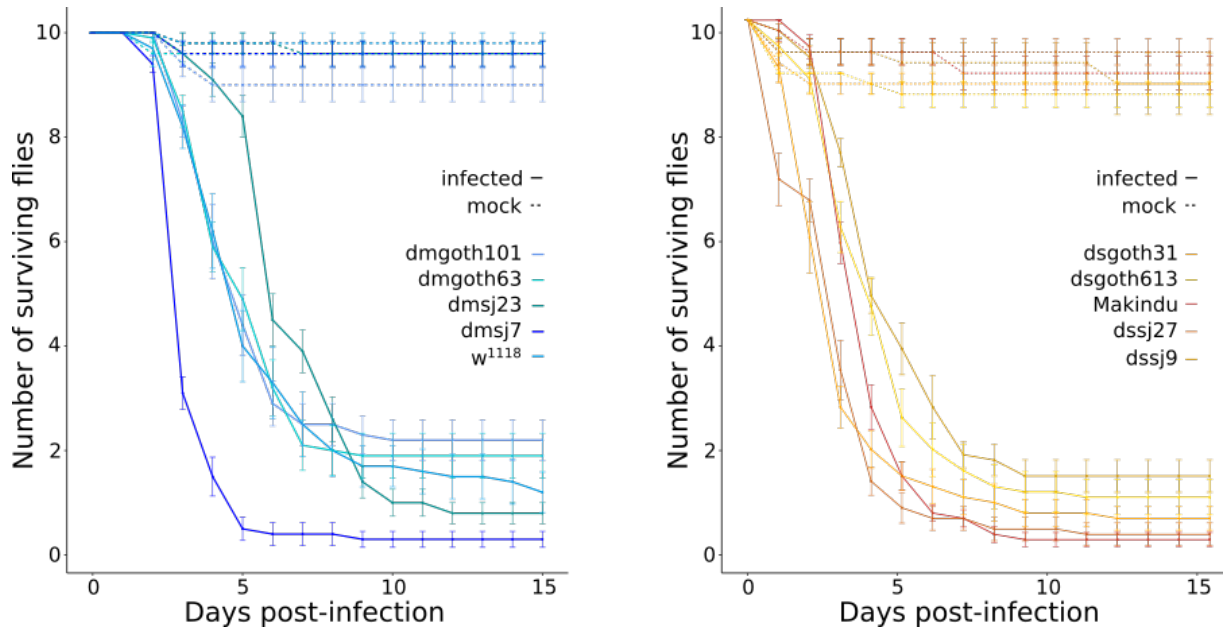
<i>D. melanogaster</i> carcasses		si sense			si anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	10	43	0.829	RNA lg2fc < 0	10	41	0.959
	RNA lg2fc > 0	30	109		RNA lg2fc > 0	30	111	
		pi sense			pi anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	1	52	1	RNA lg2fc < 0	3	51	0.029
	RNA lg2fc > 0	3	138		RNA lg2fc > 0	0	141	

<i>D. melanogaster</i> ovaries		si sense			si anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	35	107	0.843	RNA lg2fc < 0	36	107	0.561
	RNA lg2fc > 0	15	40		RNA lg2fc > 0	11	44	
		pi sense			pi anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	5	138	0.822	RNA lg2fc < 0	10	133	0.867
	RNA lg2fc > 0	3	52		RNA lg2fc > 0	5	51	

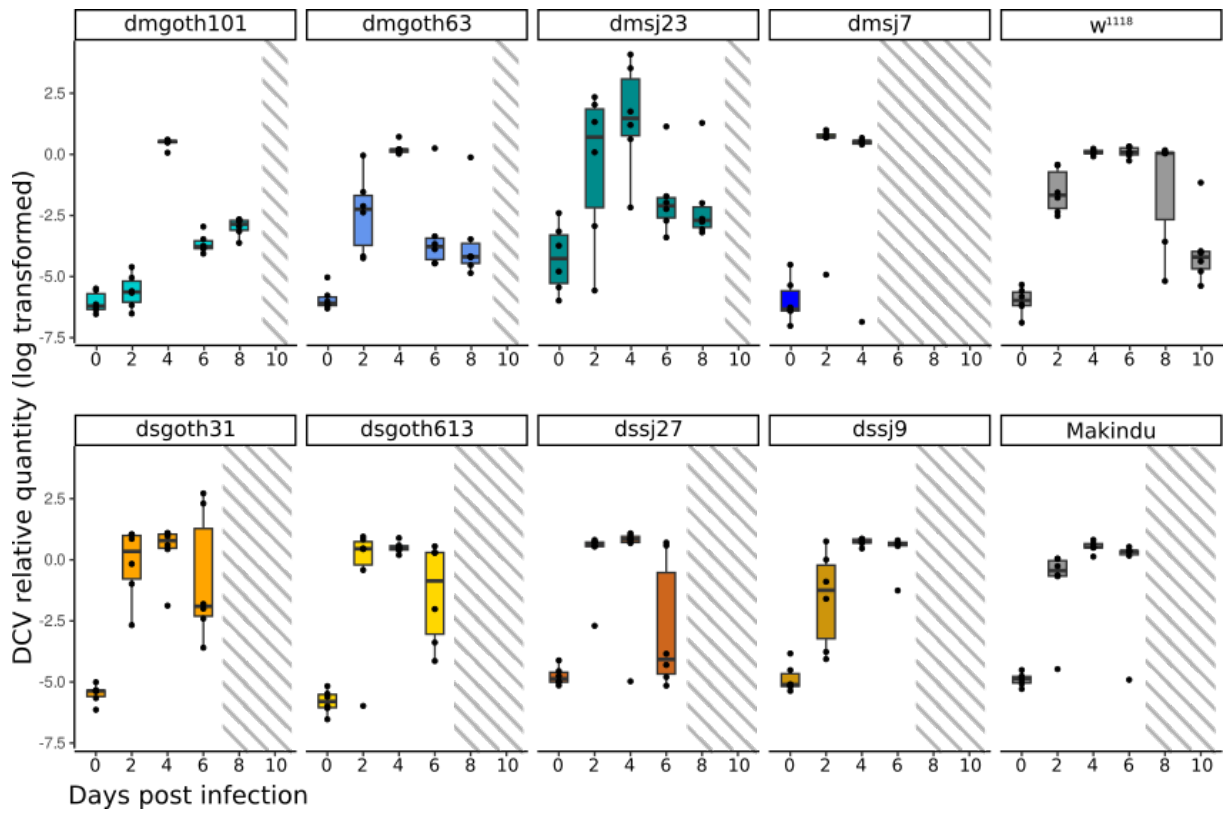


<i>D. simulans</i> carcasses		si sense			si anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	18	64	0.799	RNA lg2fc < 0	18	62	0.244
	RNA lg2fc > 0	28	86		RNA lg2fc > 0	17	97	
		pi sense			pi anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	2	81	0.763	RNA lg2fc < 0	1	83	0.860
	RNA lg2fc > 0	1	116		RNA lg2fc > 0	3	114	

<i>D. simulans</i> ovaries		si sense			si anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	28	37	0.363	RNA lg2fc < 0	17	46	0.962
	RNA lg2fc > 0	48	88		RNA lg2fc > 0	39	98	
		pi sense			pi anti			
		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value		sRNA lg2fc < 0	sRNA lg2fc > 0	p- value
	RNA lg2fc < 0	3	62	0.831	RNA lg2fc < 0	2	64	0.938
	RNA lg2fc > 0	4	134		RNA lg2fc > 0	6	131	



**Figure S15. Natural strain survival upon DCV infection.** Left panel : *D. melanogaster* strains, right panel : *D. simulans* strains. Makindu and w<sup>1118</sup> are added to the graphs for comparative purposes.



**Figure S16. DCV replication in natural strains**, as measured by RT-qPCR. Crosshatched zones indicate that all flies were dead at that time point, preventing the quantification experiment from being done. Makindu and w<sup>1118</sup> are added to the graphs for comparative purposes.

**Table S17. TE characteristics in natural strains.**

DNA: number of bp corresponding to TE sequences in the genome assemblies. RNA\_CA: sum of normalized RNA-seq read counts corresponding to all TE families, data from carcasses. RNA\_OV: sum of normalized RNA-seq read counts corresponding to all TE families, data from ovaries. PI\_OV: sum of small RNA-seq read counts of size 23-30 nt corresponding to all TE families, data from ovaries.

	DNA	RNA_CA	RNA_OV	PI_OV
dmgoth101	12,508,196	247,801.93	85,665.01	7,401,428
dmgoth63	14,444,311	253,933.34	132,462.19	14,696,241
dmsj23	12,626,526	153,430.48	169,507.07	9,280,412
dmsj7	11,957,756	180,432.78	77,303.44	10,974,398
dsgoth31	15,399,644	101,824.18	87,981.15	2,634,988
dsgoth613	13,002,815	109,977.11	88,344.78	3,401,348
dssj27	13,396,960	78,188.51	99,786.61	3,409,124
dssj9	16,488,069	75,662.80	64,785.08	4,151,565

**Table S18. Spearman correlations between TE characteristics in natural strains and DCV quantity.**

	d2		d4		d6	
	rho	p	rho	p	rho	p
DNA	-0.238	0.582	0.261	0.536	0.642	0.138
RNA_CA	-0.238	0.582	-0.642	0.096	-0.714	0.088
RNA_OV	0.238	0.582	0.261	0.536	-0.142	0.782
PI_OV	-0.071	0.881	-0.571	0.151	-0.500	0.266



### Avant-propos

Les résultats obtenus et présentés dans le premier chapitre montrent une interaction complexe entre DCV et le contrôle des ET, entraînant des réponses variables selon le tissu biologique et l'espèce. L'utilisation d'une souche transgénique nous a également permis de suggérer qu'une charge plus élevée d'ET dans le transcriptome pouvait être associée à une immunité antivirale plus efficace. La seconde partie de ce manuscrit vise à élargir la compréhension de l'interaction entre virus et ET en utilisant un panel plus large de virus.

La première partie vise à décrire plus en détails les caractéristiques des trois virus utilisés dans cette seconde étude : (i) le virus X de la drosophile (DXV), un virus naturel de la drosophile qui reste très peu documenté et qui diffère du virus DCV par son génome à ARN double brin, (ii) le 'Flock House Virus' (FHV), un virus à ARN simple brin très utilisé pour étudier la réponse antiviral chez les mouches bien que non naturel de la drosophile, et (iii) le 'Invertebrate Iridescente Virus 6' (IIV-6), un des rare virus à ADN ayant la capacité de se répliquer chez la drosophile.

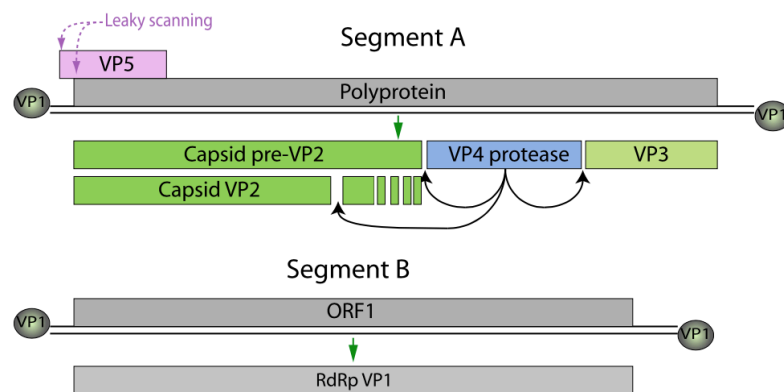
N'ayant pas de stocks viraux disponibles au laboratoire, la seconde partie de ce chapitre présente succinctement les étapes clés ayant été suivies pour procéder à la culture cellulaire des trois virus (DXV, FHV et IIV-6). En effet, il a été nécessaire de réaliser une amplification virale pour obtenir des quantités suffisantes de virus, pour pouvoir infecter les individus et générer les données de séquençage.

Enfin, la troisième partie présente les résultats récemment obtenus de l'analyse transcriptomique des données portant sur les virus DXV, FHV et IIV-6, chez *D. melanogaster* et *D. simulans*. Nous montrons que ces trois virus, qui présentent tous trois des caractéristiques différentes (nature du génome, origine de l'hôte, *etc.*), ont la capacité de se répliquer au sein des deux espèces de drosophile et d'induire des modulations des quantités de transcrits en réponse aux différentes infections. De plus, nous espérons pouvoir très prochainement mettre en lien ces découvertes avec les données de petits ARN.

# 1. Virus : d'un point de vue biologique

## 1.1. Virus X de la Drosophile (DXV)

Isolé pour la première fois en 1979, le Virus X de la Drosophile (DXV) a été découvert chez des mouches témoins dans une expérience initialement réalisée avec le virus Sigma (Teninges et al., 1979). DXV fait partie du genre *Entomobirnavirus*, de la famille des *Birnaviridae* (Dobos et al. 1995). C'est un virus à ARN double brin, non enveloppé avec une capsid icosaédrique monocouche d'environ 70 nm de diamètre (Coulibaly et al., 2005).



**Figure 13 : Génome à ARN double brin du Virus X de la Drosophile (DXV).**

Représentation schématique des segments A et B, codant pour 5-6 protéines. VP1 se trouve sous forme libre et attaché de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN génomique (VPg). La taille du segment A est de 3 360 pb et de 3 243 pour le segment B. ORF : Cadre de lecture ouvert. VP : Protéine virale. RdRp : ARN polymérase ARN dépendante. D'après Hulo et al. (2011).

Le génome du DXV est bi-segmenté avec un segment A long de 3 360 pb et un segment B, plus court, de 3 243 pb (Zambon et al., 2005) (**Figure 13**). Le premier segment est composé de deux ORF. Le premier ORF code une polyprotéine qui est clivée de façon cotranslationnelle par l'enzyme protéolytique virale VP4, pour permettre sa propre libération et former les principales protéines structurales VP2, seule composante de la capsid virale, et VP3, coordinatrice du cycle viral (Birghan et al., 2000; Sánchez & Rodriguez, 1999). En effet, la protéine VP3 est multifonctionnelle et intervient dans de nombreuses activités au cours du cycle de vie viral. L'un des rôles de VP3 est de contrôler la morphologie des particules virales en interagissant avec le précurseur de VP2 (pVP2) et VP1 du segment B. Elle forme la couche interne du virion, permettant la protection et stabilisation du génome viral (Maraver et al., 2003). De plus, elle joue le rôle de VSR en contrôlant et bloquant la voie ARNi en présence d'ARNdb exogène (Valli et al., 2012; van Cleef et al., 2014). Le second ORF du segment A code une protéine non structurale, VP5, impliquée dans l'évacuation du virus (Mundt et al., 1997). Le segment B code la polymérase ARN-dépendante (RdRp) du virus, VP1, qui est liée au génome viral de manière covalente et est sous forme de polypeptide libre dans le virion

(Nagy & Dobos, 1984; Revet & Delain, 1982). En interagissant avec VP3, elle forme un complexe facilitant l'encapsidation de VP1 (Lombardo et al., 1999; Tacken et al., 2002). De manière intéressante, l'interaction de VP3 avec l'ARN est dépendante de la séquence (Kochan et al., 2003).

### ***1.1.1. DXV : Cycle de réplication et transmission***

Bien que le cycle de réplication viral du virus DXV soit peu documenté, il a été suggéré que l'entrée du virus dans les cellules ait lieu par endocytose, en se basant sur les mécanismes des autres birnavirus (Galloux et al., 2007). Cela permettrait la libération de peptides produits à partir de pVP2, la déstabilisation et la formation d'une zone d'entrée dans la membrane endosomale, permettant l'accès au virion dans le cytoplasme. En comparaison avec DCV, DXV se transmet aussi de manière horizontale par le biais du tractus digestif ou respiratoire ; et se retrouve dans divers organes comme le corps gras, le tube digestif, les muscles, le cerveau, les ovaires et les testicules. Les symptômes varient selon la concentration virale injectée, conduisant au décès de l'hôte de manière plus ou moins précoce (Zambon et al., 2005). Tout comme DMelSV, DXV a la particularité d'être très sensible à la privation d'oxygène (Teninges et al., 1979; Zambon et al., 2006).

### ***1.1.2. DXV : Réponses antivirales de l'hôte***

En lien avec son rôle dans la réponse antivirale, il a été observé que la voie ARNi s'active lors d'une infection par DXV. Toutefois, la présence du VSR VP3 du virus semble limiter l'intervention de cette voie qui ne pourrait que limiter la propagation du virus (Zambon et al., 2006). En plus de se lier aux longues molécules d'ARNdb comme DCV, la protéine VP3 est capable de se lier à de courtes molécules de siARN, permettant de supprimer la voie d'ARNi en interférant avec le clivage de l'ARN médié par Dcr-2 (Ferrero et al., 2015; Valli et al., 2012; van Cleef et al., 2014). En revanche, VP3 n'affecte pas le découpage des ARN cibles de cette voie. Par exemple, l'utilisation de mutant Dcr-2 n'a montré que peu d'effet sur l'infection par DXV. Dans ce sens, l'induction de gènes liés à la voie Toll tels que *Toll*, *drosomycin* et *Dif* a été détectée, ce qui permettrait de venir parallèlement en soutien à la voie ARNi ralentie par le VSR (Zambon et al., 2006). Ces mêmes auteurs ont également observé que des individus mutés pour *piwi* ou *aub* par exemple étaient beaucoup plus sensibles à l'infection par DXV et soutiennent l'idée d'un rôle important de la voie des piARN dans la réponse antiviral de l'ARNi bien que sa fonction reste à élucider (Cox et al., 2000; Pal-Bhadra et al., 2004). Concernant la voie Imd, elle est activée lors de l'infection par DXV mais ne fournit pas de réponse antiviral



protectrice (Zambon et al., 2005). Tout comme pour DCV, des mouches mutantes G9a ont une durée de vie réduite après une infection par DXV, ce qui s'expliquerait par une hyperactivation de la voie Jak/STAT et non une augmentation de la charge virale (Merkling et al., 2015). Ces mêmes auteurs ont également observé une induction des gènes *Turandot*, 24h après l'injection virale. En revanche, seule une faible induction des gènes *Tot* au moment du décès des mouches a été observée par (Kemp et al., 2013). D'un point de vue global, il convient de noter que peu d'études ont porté sur la réponse au DXV, ce qui n'indique pas nécessairement l'absence ou la faible activité des voies décrites. Tout comme les autres virus, il est capable de poursuivre sa réplication malgré une pression élevée des voies immunitaires de l'hôte pour contrôler le virus.

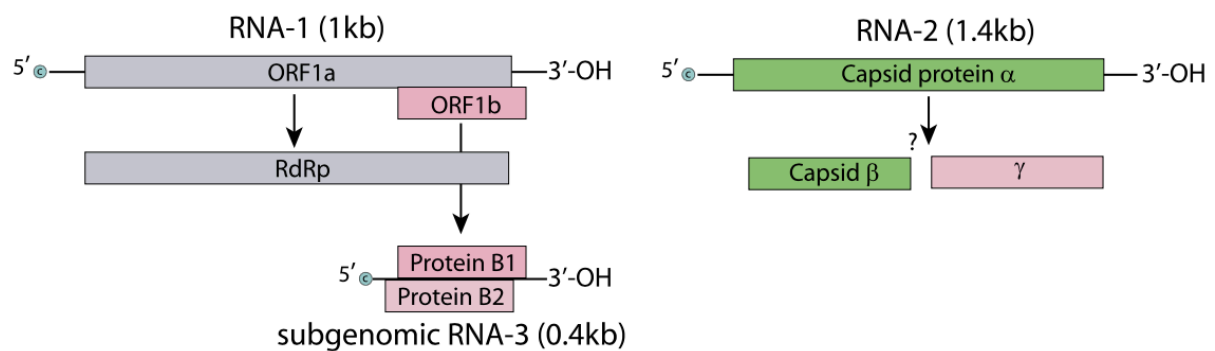
## 1.2. Flock House Virus (FHV)

Le Flock House Virus (FHV) n'est pas un pathogène naturel de la drosophile mais il est utilisé comme modèle pour étudier de nombreux aspects de l'infection, tel que la réponse immunitaire médiée par l'ARNi (Mondotte et al., 2018; Odegard et al., 2010; L. Wang et al., 2022). Il appartient au genre *Alphanodavirus* de la famille des *Nodaviridae* (Venter & Schneemann, 2008). Il a été isolé en 1983 à partir du coléoptère *Costelytra zaelandica*, un scarabé endémique de Nouvelle-Zélande et ravageur de pâturage très répandu (Scotti et al., 1983). Sa large gamme d'hôtes lui permet de se répliquer dans des levures, des plantes, des insectes ainsi que dans des cellules de mammifères, de moustiques et de drosophiles (Dasgupta et al., 2003, 2007; K. L. Johnson & Ball, 1997; R. Lu et al., 2005). Chez la drosophile, il est capable de se propager au sein de multiples tissus comme le corps gras, les trachées, les tissus cardiaques et musculaires, dans la chambre ovarienne, avec une sensibilité variable selon le mode d'infection, conduisant à la létalité (Eleftherianos et al., 2011; Galiana-Arnoux et al., 2006; Mondotte et al., 2018; Thomson et al., 2012; Xu & Cherry, 2014). Il est intéressant de noter qu'une infection par *Wolbachia* affecte fortement la résistance à l'infection par FHV en augmentant la tolérance au virus et non en limitant la charge virale (Chrostek et al., 2013; Teixeira et al., 2008). En comparaison avec le DCV, aucune association n'a été trouvée entre les polymorphismes du gène *pastrel* et la susceptibilité à l'infection par FHV (Magwire et al., 2012).

### 1.2.1. FHV : Structure génomique et réplication virale

FHV est un petit virus à ARN simple brin positif composé de deux molécules, emballées par une seule capsidie dans un virion icosaédrique non enveloppé, d'un diamètre d'environ 34 nm (Schneemann et al., 1998) (**Figure 14**). L'ARN1 (3.1 kb) code la RdRp virale située sur la

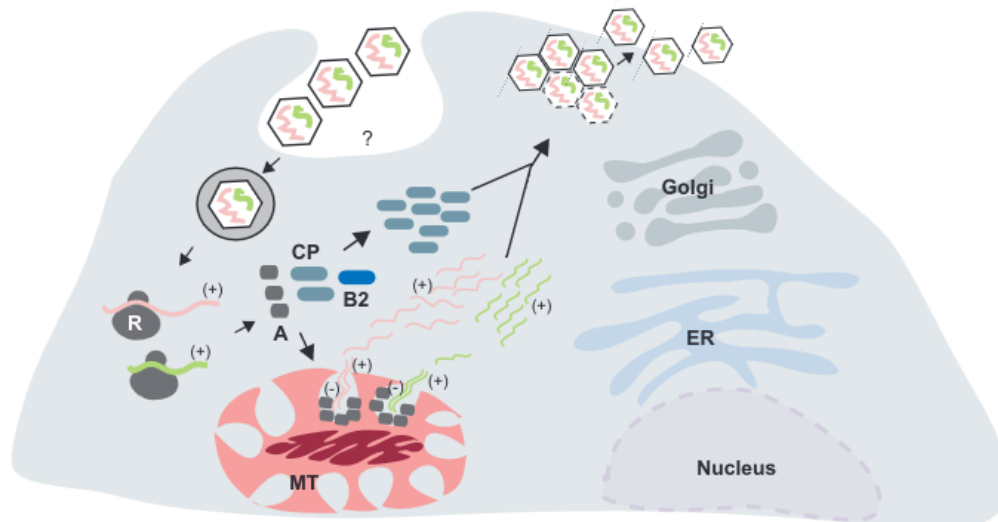
membrane externe des mitochondries dans les cellules infectées, ainsi qu'un ARN3 subgénomique ayant deux ORF qui codent deux protéines : la protéine B1 dont la fonction est inconnue, et la protéine B2 qui est un VSR liant l'ARNdb (Eckerle & Ball, 2002; H. Li et al., 2002; D. J. Miller et al., 2001; D. J. Miller & Ahlquist, 2002). L'ARN2 (1.4 kb) code la seule protéine ( $\alpha$ ) structurale de la capsid du virion (Dasgupta et al., 1984), qui est ensuite clivé en fragments deux fragments ( $\beta$  et  $\gamma$ ) après l'assemblage du proviron (Nangia et al., 2020; Schneemann et al., 1998). Les deux molécules de son génome ne sont pas polyadénylées (Guarino et al., 1984).



**Figure 14 : Génome à ARN simple brin positif du Flock House Virus (FHV).**

Génome linéaire bisegmenté, composé d'un ARN-1 de 3,1 kb et d'un ARN-2 de 1,4 kb. L'extrémité 5' de chaque segment de génome est coiffée. L'extrémité 3' n'a pas de tract poly (A). L'ARN1 code directement pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (protéine A) et l'ARN2 pour la protéine de la capsid. Un segment ARN-3, un ARN subgénomique, est également produit et code les protéines B1 et B2. D'après Hulo et al. (2011).

Après l'entrée et le désenrobage des virions par endocytose médiée par des récepteurs dans la cellule hôte, le génome viral est introduit sous forme d'ARNm pour être traduit et amplifié par la RdRp du virus (**Figure 15**). L'encapsidation est réalisée par la seule protéine  $\alpha$  dans le cytoplasme. Lors de la réplication, l'ARN3 subgénomique est amplifié à partir de l'ARN1 permettant la synthèse des protéines qu'il code. En complément du rôle de suppresseur viral de la protéine B2, la synthèse de l'ARN viral induit des invaginations de la membrane mitochondriale externe des cellules infectées, également appelé des sphérules, permettant de séquestrer les complexes de réplication et les intermédiaires d'ARNdb afin de les protéger de la voie d'ARNi (Eleftherianos et al., 2011; Kopek et al., 2007; D. J. Miller et al., 2001). L'apoptose est induite à la fin du cycle infectieux du FHV, probablement pour libérer les particules virales et permettre une propagation ultérieure du virus dans les cellules voisines (B. Liu et al., 2013; Settles & Friesen, 2008).



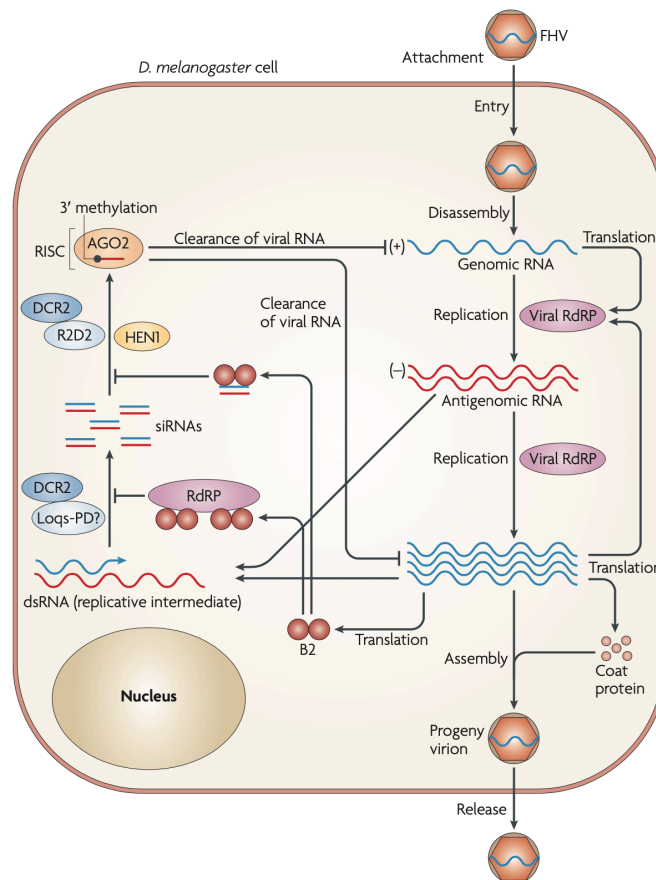
**Figure 15 : Schéma du cycle d'infection du FHV.**

Les particules virales pénètrent dans la cellule par l'intermédiaire d'un récepteur inconnu. Après le désenrobage, les ARN du génome (+) sont traduits en protéine A, en protéine de capsid et en B2. La protéine A s'associe aux mitochondries dans les sphérules induites par le virus et séquestre les ARN (+), qui servent de matrice pour la production des brins (+). Les protéines de la capsid et les ARN (+) nouvellement synthétisés forment des provirions et des particules infectieuses. Le virus nouvellement formé est ensuite libéré de la cellule. MT : mitochondrie, ER : réticulum endoplasmique, R : ribosome, A : protéine A, CP : protéine de capsid, Nucleus : noyau. D'après Chtarbanova (2011).

### 1.2.2. FHV : Inhibition des défenses de l'hôte versus mécanismes antiviraux

Initiée par Dcr-2 avec la production de siARN viraux, la réponse immunitaire induite par la voie d'ARNi chez les drosophiles est négativement corrélée avec l'accumulation d'ARN viral dans les cellules infectées (Gammon & Mello, 2015). Récemment, il a été découvert qu'un mécanisme indépendant de la voie des siARN maintiendrait l'inhibition du virus dans la plupart des cellules somatiques folliculaires des ovaires, suggérant l'existence d'une couche indépendante de défense (N. Martins et al., 2019). Pour faire face aux défenses de l'hôte, le VSR B2 du FHV agit en bloquant l'accès aux composants protéiques de la voie des siARN aux ARNdb (Chao et al., 2005; Lingel et al., 2005) (**Figure 16**). Bien que la protection ne soit pas totale, il a été démontré que le succès de l'infection chez la drosophile dépendait de l'expression du VSR qui facilite la réplication et l'accumulation de particules virales (Aliyari et al., 2008; Myles et al., 2008). En effet, un individu infecté par un mutant du FHV déficient en B2 est capable de rapidement contrer l'infection. Inversement, une infection avec ce même virus mutant chez des mouches mutantes Dcr-2 ou R2D2 conduit à une accumulation importante de virions (Galiana-Arnoux et al., 2006; Y.-H. Han et al., 2011; Marques et al., 2013; Petrillo et al., 2013). De plus, la protéine B2 se lie indifféremment aux siARN et aux long ARNdb, affectant également les siARN produits à partir de sources endogènes, tels que les ET (Berry et al., 2009; Monsion et al., 2018). Par ailleurs, elle ne semble pas ou très peu interférer dans les ovaires, tout comme le VSR de DCV (Berry et al., 2009). En outre, la protéine B2 interagit dans

les cellules infectées avec les intermédiaires d'ARNdb viraux pour supprimer la production de siARN dérivés du FHV, et avec la RdRP codée par le virus pour protéger l'ARN viral de l'action de la protéine Dcr-2 (van Rij et al., 2006).



**Figure 16 : Schéma des étapes clés de l'immunité antivirale à base d'ARNi induite chez *D. melanogaster* par l'infection par le Flock House Virus (FHV).**

Après l'entrée et le désenrobage des virions du FHV, l'ARN génomique à brin positif (ARN(+)) sert à la fois d'ARNm pour la traduction de l'ARN polymérase dépendante du virus (RdRP) et de modèle pour la synthèse de l'ARN antigénomique à brin négatif (ARN(-)). La production préférentielle d'ARN (+) par la RdRP virale est obtenue par de multiples cycles d'initiation de la synthèse de l'ARN à partir de l'extrémité 3' de l'ARN (-) peu abondant. L'ARN double brin (ARNdb) formé entre l'ARN (+) naissant 5'-terminal et l'ARN (-) modèle est reconnu par Dicer 2 (DCR2) et clivé en petits ARN interférents (siRNA), déclenchant ainsi une immunité antivirale basée sur l'ARN. Les siARN viraux sont assemblés avec Argonaute 2 (AGO2) dans le complexe de l'inhibition induite par l'ARN (RISC), méthylés à l'extrémité 3' (représentée par un cercle noir) par HEN1 et utilisés pour guider la clairance spécifique des ARN du FHV. La protéine B2, un suppresseur viral, codé par FHV cible deux étapes de cette voie immunitaire : l'inhibition de la production de siRNA viral en se liant au RdRP viral et au précurseur d'ARNdb viral, et la séquestration des siRNA viraux en se liant aux siRNA duplex. Loqs-PD : loquace-isoforme PD. D'après Ding (2010).

En parallèle de la voie d'ARNi activée par l'hôte lors d'une infection par FHV, il a été observé qu'un ensemble de gènes de la voie Jak/STAT sont induits par le virus, notamment les gènes *Turandot* en culture cellulaire ou *vir-1* chez des drosophiles infectées (Dostert et al., 2005; Ekengren et al., 2001). Néanmoins, le rôle de cette voie semble plutôt agir au niveau de la tolérance, la cinétique d'induction des gènes étant lente. En lien avec les résultats observés pour DCV et DXV, la protéine G9a permettrait également de réguler l'activation de la voie Jak/STAT, et donc les effets délétères pouvant être causés par son hyperactivité, lors d'une

infection par FHV (Merkling et al., 2015). D'autre part, le rôle de la voie Toll a été analysée en comparant des infections orales et intrathoraciques. Elle semble efficace uniquement lors d'infections orales, avec une résistance virale réussie lors de l'induction de certains facteurs de transcription, comme *Dorsal* mais pas *Dif* (Ferreira et al., 2014). Récemment, (R. Shen et al., 2022) ont identifié et caractérisé le rôle d'un suppresseur de tumeur, le dRASSF (*drosophila Ras-association domain family*), en tant que régulateur de la réponse immunitaire à une infection virale chez la drosophile. Ils ont découvert que la perte de ce régulateur compromettrait la voie Imd, suractivait la voie Jak/STAT et entraînait une vulnérabilité importante face à l'infection. Ainsi, cette protéine régulatrice semble être nécessaire à l'activation de la voie Imd ainsi qu'à la modulation de l'activité de la voie Jak/STAT, l'augmentation de la charge virale chez les mouches mutantes *dRASSF* étant corrélé avec l'hyperactivité de la voie Jak/STAT. Il est également intéressant de noter que les deux protéines *PRGP-LC* et *imd* ne semblent pas nécessaires à la réponse antivirale contre FHV mais reste essentiel contre les bactéries gram-négatives, contrairement à *dRASSF* qui ne semble pas nécessaire pour l'activation de la voie Imd pour ce type d'infection bactérienne (R. Shen et al., 2022).

### 1.3. Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6)

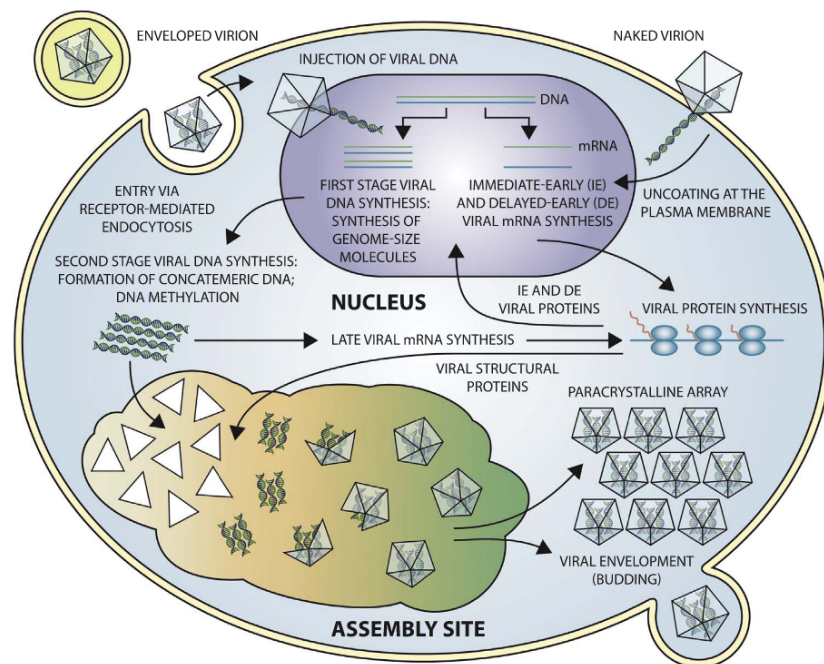
Les virus iridescents d'invertébré IIV (IIV) ont été découverts pour la première fois en 1954 chez des populations de larves de tipules, de gros moustiques (*Tipula paludosa*), communément appelés 'cousins' (Xeros, 1954). Subdivisés en cinq genres, ils ont donc la capacité de se propager au sein d'une large gamme d'hôtes de vertébrés et invertébrés, infectant plus de 100 espèces d'arthropodes (Williams et al., 2000, 2017). IIV-6, également connu sous le nom de *Chilo iridescent virus* (CIV), fait partie du genre des *Iridovirus*, de la famille des *Iridoviridae* (Asgari & Johnson, 2010; Chinchar, Hick, et al., 2017). Il a été isolé à partir du lépidoptère *Chilo suppressalis*, un ravageur du riz (Fukaya & Nasu, 1966). Bien qu'étant pathogène non naturel de la drosophile, il peut se répliquer et provoquer des infections pathogènes chez ces dernières (Bronkhorst et al., 2012; Constantino et al., 2001; Teixeira et al., 2008). Une caractéristique spécifique du IIV-6 est la coloration violette, une iridescence qui apparaît chez des individus infectés : elle est due à l'accumulation de particules virales et à leur disposition en réseaux para-cristallins dans le cytoplasme des cellules hôtes (Williams, 2008). Les effets du IIV-6 sont généralement non cytopathiques, conduisant davantage à une infection persistante chez la drosophile avec une létalité modeste lors d'injections virales (Teixeira et al., 2008).

### 1.3.1. IIV-6 : Génome et réplication

Contrairement aux DCV, DXV et FHV, IIV-6 est un virus à ADN double brin (ADNdb) linéaire, à symétrie icosaédrique et de 185 nm de diamètre (Jakob et al., 2001; Jakob & Darai, 2002). Le génome viral est grand (212 482 pb) et très complexe, codant 468 ORFs dont 215 ORFs putatifs qui ne se chevauchent pas (Eaton et al., 2007). Le virus code également pour 54 protéines structurales, des composantes de la particule virale mature, dont les fonctions sont cruciales notamment dans les processus de pathogenèse, de transcription, de réplication, d'assemblage et de libération du virus (İnce et al., 2010; Whitley et al., 2010). Les virions sont composés de trois domaines : un noyau ADN-protéine contenant le génome entouré d'une membrane lipidique interne avec des polypeptides associés, d'une capsidie protéique et d'une enveloppe virale externe dans le cas où les particules virales bourgeonnent hors des cellules (Williams, 1998; Williams et al., 2005; Yan et al., 2009). D'autre part, il a été décrit qu'aucune trace d'intron n'a été retrouvée dans les transcrits des gènes de ces virus et que les ARNm viraux sont dépourvus de queues poly(A) (İnce et al., 2013; W. J. Song et al., 2004; Tsai et al., 2007).

Les connaissances du mécanisme de réplication du IIV-6 sont basées sur celle du virus 3 de la grenouille (Frog Virus 3, FV3), supposé similaire et devenu un modèle pour tous les *Iridovirus* (Granoff, 1984 ; Goorha, 1982 ; Williams et Ward, 2010) (**Figure 17**). Après liaison à la cellule hôte par l'intermédiaire de récepteur cellulaire, il a initialement été suggéré que la particule virale pénètre par endocytose médiée par la clathrine lorsqu'elle est enveloppée ou par fusion au niveau de la membrane plasmique dans le cas où le virus est non enveloppé (Braunwald et al., 1979, 1985; Gendrault et al., 1981; Y. Liu et al., 2016). Il a récemment été proposé que l'entrée soit faite par pinocytose, c'est-à-dire par absorption à l'aide de petites vésicules (C.-J. Guo et al., 2011; Jia et al., 2013; S. Wang et al., 2014). Une fois entrée dans la cellule, la première étape de la réplication de l'ADN viral commence dans le noyau par le biais d'une ADN polymérase codée par le virus (Goorha et al., 1978; Nalçacioğlu et al., 2003). Toujours dans le noyau, le virus y transcrit ses gènes précoces immédiats (IE) et tardifs (DE) par l'intermédiaire de l'ARN polymérase II de l'hôte (Barry & Devauchelle, 1987; D'Costa et al., 2001). Une fois synthétisé, l'ADN est transporté dans le cytoplasme où a lieu la seconde étape de la réplication, avec la formation de concatémère d'ADN, pouvant avoir une taille jusqu'à dix fois supérieure à celle du génome, qui seront emballés dans les virions (Willis et al., 1984). La transcription des gènes tardifs, la troisième classe temporelle de transcrits du

virus, a lieu à l'aide de l'ARN polymérase que code le virus (İnce et al., 2013). Après maturation des particules virales, la libération des virions se fait par bourgeonnement ou par lyse cellulaire.



**Figure 17 : Schéma de la réplique des Iridoviridae.**

La stratégie de réplique illustrée est celle du Frog Virus 3 (FV3), représentant celle de tous les membres de la famille. L'ADN viral pénètre dans le noyau après le désenrobage, où ont lieu la transcription virale précoce et la synthèse de génomes d'ADN. Ils sont ensuite transportés dans le cytoplasme où ils sont méthylés et où la deuxième étape de la synthèse de l'ADN aboutit à la formation de concatémères composés de 10 molécules d'ADN ou plus. La transcription tardive nécessite une synthèse continue de l'ADN viral et est catalysée par une ARN polymérase ADN-dépendante codée par le virus. L'ADN viral et les protéines interagissent dans des sites d'assemblage viral morphologiquement distincts et forment des virions matures. Voir le texte pour plus de détails. D'après Chinchar, Waltzek, et al. (2017).

#### ***IIV-6 : Inhibiteur de la voie d'ARNi***

Parmi les nombreuses protéines que code IIV-6 se trouvent deux candidats suppresseurs de la voie d'ARNi. Le premier, homologue putatif de l'ARN polymérase III, est l'ORF 142R, et le second est l'ORF 340 R, une protéine contenant des domaines de liaison à l'ARNdb (dsRBD : *Double-Stranded RNA-binding Motif*). Des travaux ont mis en évidence que cette dernière était considérée comme un VSR, bloquant l'ARNi en se liant à l'ARNdb long ou en empêchant la transformation en siARN par Dcr-2 et ainsi l'incorporation de siARN fonctionnels dans le complexe RISC (Bronkhorst et al., 2014). Récemment, Bronkhorst et al. (2019) ont observé qu'une infection par IIV-6 modifiait également l'expression de certains miARN cellulaires au niveau post-transcriptionnel. En effet, ils suggèrent que le VSR 340R serait également capable de se lier aux miARN de manière spécifique, bien que les dsRBD n'aient pas été décrits comme agissant de manière spécifique à la séquence de l'ARNdb (Ferrandon et al., 1994), séquestrant ainsi les miR-305 afin d'empêcher leurs fonctions et de permettre l'accumulation du virus.

Il est important de noter que le génome du IIV-6 contient des régions de courtes séquences d'ADN répétés (M. Fischer et al., 1988). Par exemple, les ORFS 216R, 396L et 443R ont été décrits comme étant de grands éléments d'ADN répétitifs du génome de IIV-6 (Nalçacıoğlu et al., 2009). Par ailleurs, une étude a mis en évidence la capacité d'un nombre important d'ET de *D. melanogaster* à s'intégrer dans le génome du IIV-6 au cours de la réplication (Loiseau et al., 2020).

### **1.3.2. IIV-6 : Défenses de l'hôte**

Outre la présence de VSR, l'infection de drosophiles mutantes *Dcr-2* et *Ago2* a montré que la voie d'ARNi fournit une défense antivirale contre ce virus à ADN (Bronkhorst et al., 2012; de Faria et al., 2022). Concernant la voie Jak/STAT, certaines études n'ont pas observé de phénotype particulier chez des mutantes *Jak* ou n'ont pas détecté l'activation du gène *vir-1* lors de l'infection par IIV-6 (Dostert et al., 2005; Kemp et al., 2013). Cependant, des résultats contradictoires ont été récemment décrits. En effet, il a été rapporté qu'une voie dépendante de *p38b* activerait la voie Jak/STAT et permettrait de médier la tolérance à l'infection par IIV-6, n'ayant pas observé de modification de charges virales (West & Silverman, 2018a). Ils suggèrent le rôle essentiel des gènes *p38b* et *Stat92E* pour pallier l'infection, entraînant l'induction des protéines *Turandot* et la production des cytokines, *Unpaired*, activatrice de la voie Jak/STAT. De plus, il a été décrit que l'infection par IIV-6 entraînait une augmentation rapide puis une régulation à la baisse des gènes AMP, suggérant une capacité du virus à inhiber les voies Imd et Toll (West et al. 2019). Aucune résistance associée à *Wolbachia* de l'hôte face à l'infection par IIV-6 n'a été observée chez la drosophile (Teixeira et al., 2008).



Tableau 2 : Principales caractéristiques du Virus C de la Drosophile (DCV), Virus X de la Drosophile (DXV), Flock House Virus (FHV) et Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6).

Virus		Drosophila C virus (DCV)	Drosophila X virus (DXV)	Flock House Virus (FHV)	Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6)
Hôte naturel		<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Costelytra zealandica</i>	<i>Chilo suppressalis</i>
Famille		<i>Dicistroviridae</i>	<i>Birnaviridae</i>	<i>Nodaviridae</i>	<i>Iridoviridae</i>
Genre		<i>Cripavirus</i>	<i>Entomobirnavirus</i>	<i>Alphanodavirus</i>	<i>Iridovirus</i>
Génome		ARNsb (+)	ARNdb	ARNsb (+)	ADNdb
Segments		Un	Deux	Deux	Un
Pathogenèse chez la drosophile		Cytopathique, persistant	Cytopathique	Cytopathique	Non cytopathic, persistant
VSR	Protéine	A1	VP3	B2	340R
	Voie ciblée	siARN	siARN	siARN	siARN IMD/Toll (?)
	Mécanisme	Protéine de liaison à l'ARNdb : longs ARNdb	Protéine de liaison à l'ARNdb : longs ARNdb et duplexes siRNA	Protéine de liaison à l'ARNdb : longs ARNdb et duplexes siRNA	- Protéine de liaison à l'ARNdb : longs ARNdb et duplexes siRNA - Activation transcriptionnelle médiée par <i>Relish</i> ?
Mécanisme antiviral de l'hôte		Jak/STAT, ARNi, autophagie	Toll, ARNi	Jak/STAT, ARNi	ARNi
Restriction par <i>Wolbachia</i>		Oui	Non déterminé	Oui	Non

## 2. Virus : d'un point de vue technique

Pour pouvoir obtenir des stocks viraux suffisants pour réaliser l'ensemble des infections virales, notamment selon des conditions expérimentales et avec des charges virales identiques, il a été nécessaire d'amplifier les aliquots de virus gracieusement fournis par le laboratoire de Carla Saleh (Institut Pasteur, Paris) pour DXV et FHV, et Clément Gilbert (CNRS, Université de Paris-Saclay) pour IIV-6.

Avec l'aide d'Anaïs Larue et après plusieurs tentatives, nous avons réussi à mettre en place des cultures de cellules de drosophiles Schneider S2R+ fournies par le laboratoire de Séverine Chambeyron (Institut de Génétique Humaine, CNRS, Montpellier). Pour pouvoir

établir et maintenir les cellules, elles ont été cultivées dans un milieu Schneider pour drosophiles supplémenté avec du sérum bovin foetal (FBS) qui apporte les facteurs permettant de favoriser la croissance embryonnaire, et avec de la pénicilline et de la streptomycine, des antibiotiques utilisés en culture cellulaire pour éviter tout risque de contamination. Les aliquots ayant des concentrations virales différentes, la quantité nécessaire pour amplifier chacun des virus a dû être ajustée à une multiplicité d'infection (MOI) de 0.1 pour DXV, de 1 pour IIV-6 et de 2 pour FHV. Enfin, après sept jours d'infection, des étapes de congélation, de décongélation et de centrifugation des cellules ont permis de dégrader les cellules, libérer les particules virales et éliminer tout débris cellulaires.

Grâce aux techniques transmises par Rita Rebollo et Natacha Kremer, aux installations mises à notre disposition par le laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interaction (BF2i, Lyon), et force de persévérance, nous avons réussi à produire et amplifier les trois virus étudiés dans ce deuxième chapitre. Il convient de noter que toute la mise en place de la culture cellulaire, de l'amplification et de la production des stocks viraux a nécessité beaucoup de temps. De plus, dû à un retard dans le traitement des données de séquençage, les données ARN de ce chapitre ont été reçus que très récemment et les données de séquençage de petits ARN sont toujours en cours de traitement.

### 3. Article

#### 3.1. Transposable elements are modulated by various types of viruses in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*

En préparation

Camille A Mayeux<sup>a</sup>, Anaïs Larue<sup>b</sup>, Chloé Garambois<sup>a</sup>, Hélène Henri<sup>a</sup>, Rita Rebollo<sup>b</sup>,  
Natacha Kremer<sup>a</sup>, Séverine Chambeyron<sup>c</sup>, Marie Fablet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR 5558, F-69622 Villeurbanne, France

<sup>b</sup> Univ Lyon, INRAE, INSA Lyon, BF2I, UMR 203, F-69621 Villeurbanne, France

<sup>c</sup> Institut de Génétique Humaine, CNRS, 34396 Montpellier CEDEX 5, France

### INTRODUCTION

Among pathogens, viruses are the most abundant and diverse infectious agents (Bonnig, 2019; Wasik & Turner, 2013). They are ubiquitous in the environment and they threaten all living organisms (Prangishvili et al., 2006). They are responsible for a large number of diseases, which makes them important public health and research issues, particularly in terms of detection, treatment and prevention of viral diseases (Harvey & Holmes, 2022). Moreover, their ability to infect new hosts, especially through interspecies transmission, is the main cause of emerging infectious diseases (Baxter et al., 2017; Sironi et al., 2020). However, viruses are not the only nucleic acid fragments that threaten organisms. Transposable elements (TEs) are DNA sequences with the ability to move along the genome. They are an important component of genomes of diverse origins, varying in quantity and activity within the organisms (Warren et al., 2015; Deniz et al., 2019). For instance, they represent approximately 19% of the *Drosophila melanogaster* genome, whereas the *Zea mays* genome contains 80% of TEs (Mérel et al., 2020; Schnable et al., 2009). Due to their mobile and repetitive nature, TEs are an extensive source of mutations, sometimes having adaptive effects for the organism (Bourque et al., 2018).

In order to be protected from both viruses and TEs, organisms have developed controlling mechanisms such as the RNA interference (RNAi). RNAi pathway relies on the production of small non-coding RNA molecules that will (1) regulate gene expression or translation, (2) defend the host against viral pathogens, (3) protect the genome against the activity of TE (Fablet, 2014; Mussabekova et al., 2017). The RNAi system can be divided in three main pathways, depending on the type of small RNA involved and the biological function: the PIWI-

interacting RNA (piRNA), the small interfering RNA (siRNA), and the microRNA (miRNA) pathway. In *Drosophila*, whereas miRNAs mainly guide the translational repression of mRNAs, the piRNA pathway is mainly active in germ cells, and the siRNA pathway controls TEs especially in somatic tissues (W.-J. Chung et al., 2008; Kawamura et al., 2008; Okamura et al., 2004, 2008). Moreover, the siRNA pathway also represents one of the main immune responses against viral infections in insects, using viral double-stranded RNAs (dsRNAs) as precursors (Karlikow et al., 2014; Kemp et al., 2013; van Mierlo et al., 2012). Studies of viral cycle replication suggested that most viruses, if not all, produce dsRNAs (Son et al., 2015; Weber et al., 2006). While double-stranded RNA (dsRNA) viruses produce dsRNA molecules during their replication steps, single-stranded RNA (ssRNA) viruses produce dsRNA intermediates by an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). For double-stranded DNA (dsDNA) viruses, the formation of dsRNAs is enabled by the transcription from bidirectional promoters.

Host-virus interactions have led to the development of viral strategies and countermeasures against host defense mechanisms, probably to ensure efficient replication and transmission. For example, insect viruses can encode suppressors of RNAi (VSRs) which may act at different stages of the pathway by inhibiting or suppressing RNAi activity (Csorba et al., 2015; Díaz-Pendón & Ding, 2008). Insect viral suppressors have been shown to be potent inhibitors of antiviral RNAi, likely varying the severity and pathogenicity of infection according to the virus (Gammon & Mello, 2015; Y.-H. Han et al., 2011). Indeed, several studies carried out in *Drosophila* have observed the important role of VSRs, such as B2 protein of Flock House Virus (FHV) (ssRNA(+), *Nodaviridae*), VP3 of Drosophila X Virus (DXV) (dsRNA, *Birnaviridae*) and 340R of Invertebrate Iridescent Virus 6 (IIV-6) (DNA, *Iridoviridae*) (Galiana-Arnoux et al., 2006; H. Li et al., 2002; Zambon et al., 2006). These three viral suppressors can bind long viral dsRNAs and prevent binding of Dicer-2 (Dcr-2) through a canonical dsRNA binding domain (dsRBDs) for IIV-6, and a noncanonical domain for the VSR of DXV and FHV (Bronkhorst et al., 2012; Chao et al., 2005; van Cleef et al., 2014). In addition, the proteins B2 and 340R bind siRNA duplexes that prevent and inhibit incorporation into the RISC (Mussabekova et al. 2017).

Using the arbovirus Sindbis (SINV, ssRNA(+)) (Roy et al., 2020) and the natural *Drosophila* pathogen Sigma virus (DMelSV, ssRNA(-)) (Roy et al., 2021), we previously found that viral infection affects TE activity and modulates the levels of derived-piRNA and -siRNA in *D. simulans*. The results also suggested that the effect of the interaction between TE control and

antiviral response was dependent on the virus family. Furthermore, by studying infection with the *Drosophila C virus* (DCV), a member of the *Dicistroviridae* family, we were able to detect a modulation on TE control in a more complex manner compared to DMelSV and SINV infection, as DCV encodes the suppressor VSR 1A which binds long dsRNAs (Mayeux et al. in prep). We previously showed that infection with DCV interferes with the control of TEs in a more complex manner than DMelSV, known for its tropism for the ovaries, or a non-natural pathogen such as SINV. Overall, these results suggest a major role for TEs in *Drosophila* immune response, with a high amount of TEs in the host genome being associated with more efficient antiviral immunity.

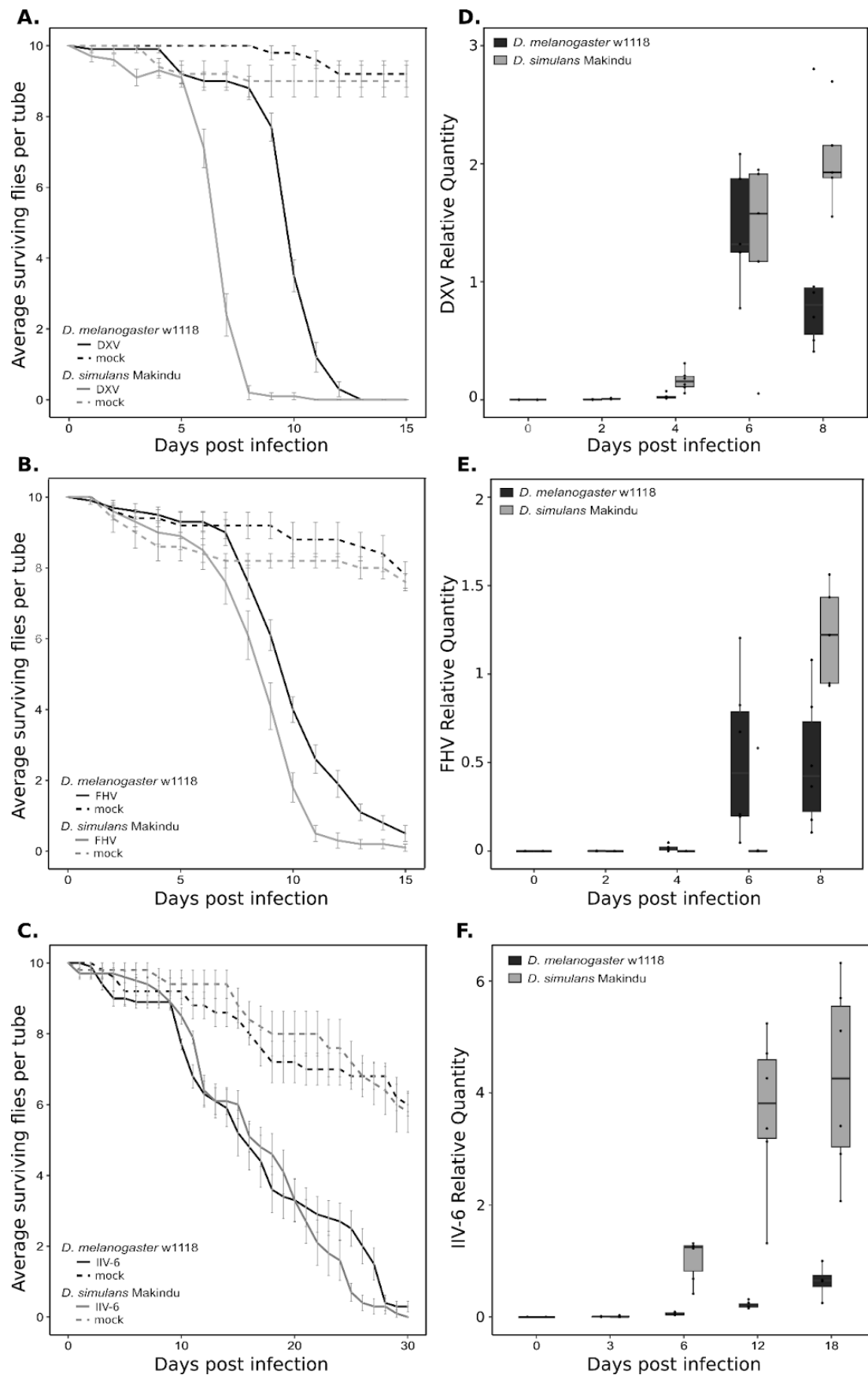
Here, our results showed that the host's antiviral immune response, especially RNAi pathway is affected by viral infection, but also involves other pathways that are now well described for their involvement in response to infection. We analysed the interaction between TEs, the RNAi machinery and viruses differing by the nature of their genome in both *D. melanogaster* and *D. simulans* that have recently diverged. Besides the studies with SINV and DMelSV, little is known on how viral pathogens encoding a VSR, as DCV, DXV and FHV, can affect the RNAi pathway responsible for both antiviral defense and TE control, making it necessary to study different viruses in different host species. We provide further evidence that, like *D. melanogaster*, *D. simulans* is also a relevant model for responses to viral infections, allowing both interspecific and host genotype-specific effects to be observed. Indeed, TE transcript amounts were affected in these two species in different ways. Interestingly, we also detected variable effects depending on somatic and germinal tissue, virus and species. In addition, we hypothesize that the TE content needs to strike a balance, to remain useful and not harm the host. Here, preliminary results obtained with DXV, FHV and IIV-6 support our hypothesis that a high TE load in the transcriptome is associated with better antiviral immunity.

## RESULTS

### ***D. melanogaster* w<sup>1118</sup> and *D. simulans* Makindu differ in mortality and viral loads upon infection with DXV, FHV and IIV-6**

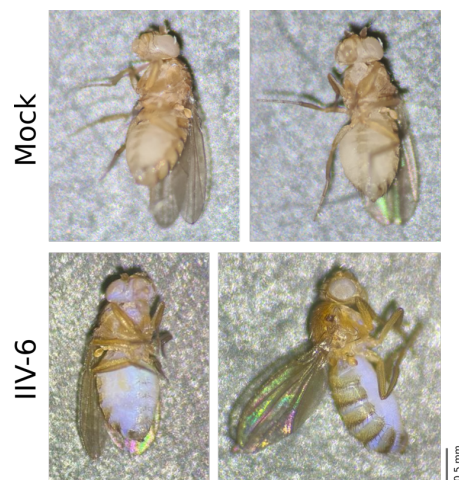
To study the independent effect of DXV, FHV and IIV-6 viruses, we infected adult *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> and *D. simulans* Makindu female by intrathoracic injection. DXV, FHV and IIV-6 viruses differ in the nature of their genomes, being DXV the only natural pathogen of *Drosophila*. However, it is now well established that all three viruses can infect flies under laboratory conditions (Bronkhorst et al., 2012; Dasgupta et al., 1984; Zambon et al., 2005). As

expected, our results showed that each virus caused a rapid death of infected flies compared with control flies in both species (Fig 1A., B., C.). In addition, we found that flies infected with IIV-6 virus showed an iridescence, a purple coloration confirming their infected state. This purple coloration is due to the accumulation of viral particles and their arrangement in paracrystalline networks in the cytoplasm of host cells (Williams, 2008) (Fig. 2). Although the injected viral loads differed between viruses, our infection protocol led to delayed mortality for IIV-6. Indeed, infected flies with IIV-6 survived up to 30 days, whereas flies infected with DXV and FHV survived up to 15 days. These results suggest that our infection protocol led to more acute infections using DXV and FHV. These observations are consistent with the known effects of IIV-6, which are generally non-cytopathic, i.e. they do not alter infected host cells, and tend to lead to persistent infection in *Drosophila* (Teixeira et al., 2008). Comparing the effect of the infection in two species, we found that only the DXV virus caused a significantly faster decrease in survival in *D. simulans* compared to in *D. melanogaster* (log-rank test, p-value = < 0.001).



**Figure 1.** *D. melanogaster w<sup>1118</sup>* and *D. simulans Makindu* survival after an infection with DXV (A), FHV (B) and IIV-6 (C). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Kinetics of DXV (D), FHV (E) and IIV-6 (F) replication using RT-qPCR (individual extractions of whole infected flies).

We next assessed for the three viruses their dynamics of viral replication using qPCR or RT-qPCR, depending on the virus, analyses of whole flies individually extracted at different days post-infection (dpi). First, we confirmed that all three viruses replicate in both *D. melanogaster*  $w^{1118}$  and *D. simulans* Makindu. DXV replicated efficiently, with a rapid increase in viral titer between 4 and 6 dpi (Fig. 1A). Although the two species studied showed significant differences in terms of mortality, the average level of detected DXV RNAs was relatively similar (student test, p-value = 0.888). The opposite effect was observed for the two other viruses. *D. melanogaster* and *D. simulans* flies did not show differences in mortality after an infection with FHV or IIV-6 virus, but they showed significant differences in viral titer: we found a 2.42-fold increase in FHV RNA in *D. simulans* at day 8 and a 17.31-fold increase in IIV-6 DNA at day 12 compared to *D. melanogaster* (student test, p-value = 0.016 and p-value < 0.001, respectively). Overall, our results allowed us to determine a day for each virus to study the effect of viruses on TE transcripts amounts, reconciling (i) the exponential phase of viral replication and (ii) a mortality rate of less than 50% in order to have a sufficient number of infected flies for sequencing: 6 dpi for DXV, 8 dpi for FHV and 12 dpi for IIV-6 (Fig. 1).



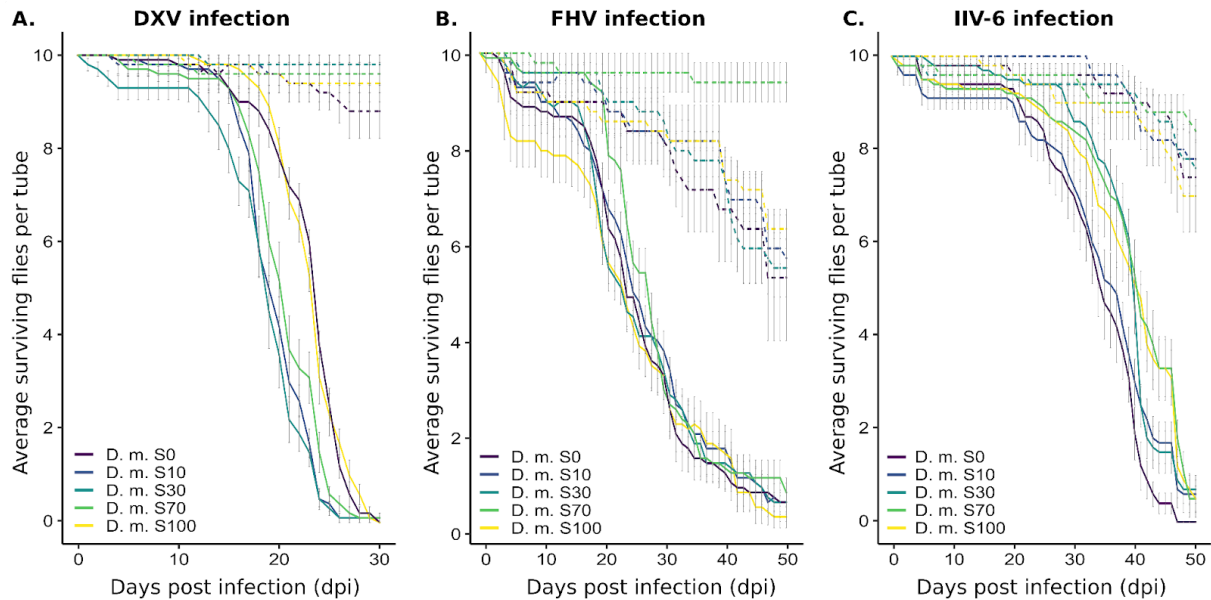
**Fig. 2.** *D. melanogaster*  $w^{1118}$  non-infected (mock) and infected flies with IIV-6. Infection with IIV-6 causes iridescence in the eyes, thorax and abdomen.

### Effect of TE content on survival following different viral infections

To study the effect of TE insertions in the viral response, we used a thermo-inducible knockdown strain of the Piwi gene to perform survival assays. Piwi is one of the key genes in the small-RNA TE silencing pathway. Thus, a Piwi knockdown may result in TE activation (Barckmann et al., 2018). The aforementioned strain was subjected to different generations of TE derepression, allowing the accumulation of new TE insertion over time (Barckmann et al., 2018). We therefore infected with DXV, FHV and IIV-6 flies that had undergone 10 (S10), 30



(S30), 70 (S70) and 100 (S100) generations of TE derepression. The initial generation (S0) was also infected as a control. For each of these lines, we measured the mortality of individuals in the infected and uninfected (mock) condition, up to 30 dpi for DXV and up to 50 dpi for FHV and IIV-6 (Fig. 3).



**Figure 3.** Transgenic fly survival curves upon DXV (A), FHV (B) and IIV-6 (C) infection. Infected flies are represented with full lines, whereas mocked flies are represented with dotted lines. Error bars represent the standard error of the mean (SEM).

We found that transgenic flies infected with DXV showed no differences in survival compared to S0 (log-rank test,  $p$ -values  $> 0.05$ ) (Figure 3A.). However, we did find that, after an infection with FHV, S70 appeared to be more resistant to the infection compared to S0 (log-rank test,  $p$ -value = 0.008) and also compared to all the other transgenic strains (S10 : log-rank test,  $p$ -value = 0.020; S30 : log-rank test,  $p$ -value = 0.020, S100 : log-rank test,  $p$ -value = 0.008) (Figure 3B.). Main differences in survival were observed at the beginning of the infection, between days 0 and 20 (Figure 3B.). Finally, for IIV-6 virus, S30 and S70 showed increased resistance to the virus compared to S0 (log rank test,  $p$ -value = 0.044 and  $p$  = 0.014, respectively) (Figure 3C.) In addition, we noted that S100 did not show more resistance than S0 following any infection.

Overall, our results are in agreement with our previous study (Mayeux et al. in prep), suggesting that differences in TE content can lead to differences in survival following infection depending on the virus and the transgenic line.

### **RNA-seq reads mapping against IIV-6 show different profiles between tissues**

We performed RNA-seq analyses in ovaries and carcasses (rest of the body) of infected and non-infected female flies. We first tested if RNA-seq reads mapped against the viral genome differently between tissues and species. In every sample analyzed (carcasses and ovaries from *D. melanogaster* and *D. simulans*), we observed that DXV RNA-seq reads mapped along the entire viral genome sequence. Notably, there was a slight increased coverage in the 3' half of the segment A viral genome, specifically in the region responsible for encoding structural proteins (VP3) (Fig. S1). Similar results were observed for the bisegmented FHV genome (RNA1, 3,107 pb; RNA2, 1,400 pb): we found that FHV RNA-seq reads were mapped throughout the viral genome sequence in all the samples, with no specific increase in a region of the genome. Finally, IIV-6 RNA-seq data did show differences between tissues: reads mapped completely against the long IIV-6 genome in carcasses, as well as against his VSR 340R, whereas they aligned only at one specific location in ovaries: a hotspot between ~ 91 000 and ~ 92 000 pb (Fig. S1). This uneven distribution could be related with data already obtained similarly with viral siRNAs in the IIV-6 genome by (Bronkhorst et al., 2013; Kemp et al., 2013). In summary, only after an infection with IIV-6 virus, ovaries and carcasses show different mapping profiles. Moreover, we could not find any differences in mapping profiles between species.

Since after an infection with DCV we previously found some chimeric transcripts in carcasses, *i.e.* chimeric virus-TE transcripts (Mayeux et al. in prep), we checked whether the other viruses acted in the same way by using a bioinformatic pipeline recently developed by (Oliveira et al., 2022), ChimeraTE. We did not detect the presence of chimeric transcripts containing both virus-derived and TE-derived sequences in *D. melanogaster*.

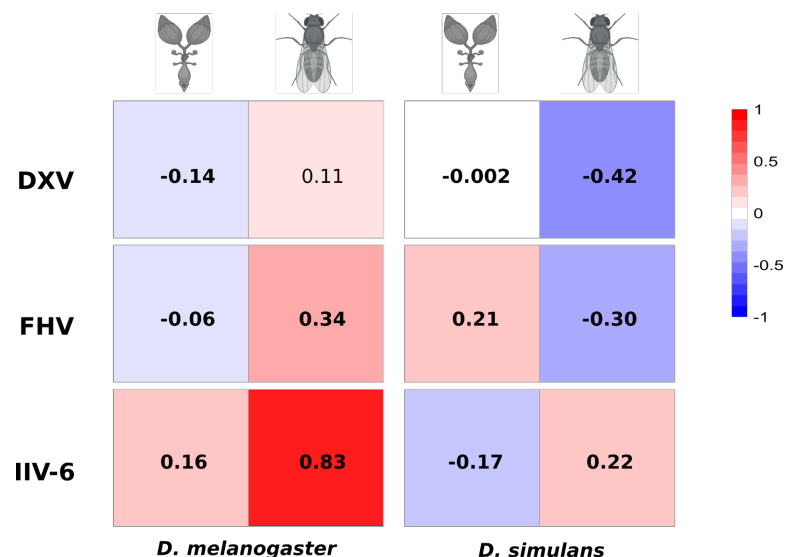
### **DXV, FHV and IIV-6 modulate TE transcript amounts in *Drosophila***

To test whether TE transcript amounts are modulated following DXV, FHV and IIV-6 infection, we used the RNA-seq data from ovaries and carcasses of infected and non-infected female flies. We detected a significant overall modulation of TE transcript amounts after any infection in both carcasses and ovaries for both species (Fig. 4). Nevertheless, TE transcript amounts were not changing in ovaries after an infection with DXV in *D. melanogaster* (Fig. 4). Moreover, in *D. melanogaster*, our results showed that the overall effect of DXV and FHV on the TE transcript amounts is similar, although the log2FC is more or less different (Table S1). Indeed, these infections decrease TE transcript amounts in ovaries and increase them in carcasses in *D. melanogaster*. In contrast, the impact of the IIV-6 DNA virus was not tissue-specific: there was

an significant increase in TE transcripts amounts, with a higher effect in carcasses (mean per TE family  $\lg_2FC = 0.83$ , paired Wilcoxon test:  $p\text{-value} = 1.5e\text{-}63$ ) than in ovaries (mean per TE family  $\lg_2FC = 0.16$ , paired Wilcoxon test:  $p\text{-value} = 2.4e\text{-}14$ ). However, as the analysis was carried out four to six days after FHV and DXV, we can't exclude the possibility that this greater modulation is due to the longer infection times.

In *D. simulans*, we found different results compared to its sister species *D. melanogaster*. The impact of DXV was tissue-specific, resulting in a significant decrease in the quantities of TE transcripts in carcasses, and a very slight in ovaries (mean per TE family  $\lg_2FC = -0.002$ , paired Wilcoxon test:  $p\text{-value} = 7.4e\text{-}10$ ). We also found that there was a decrease TE transcript amounts in carcasses and an increase in ovaries after an infection with FHV. However, the opposite pattern was observed for IIV-6 virus: TE transcript amounts decreased in ovaries and increased in carcasses. Although no viruses other than those used for the infections were detected in the infected individuals, it should be noted that American nodavirus (ANV) was detected within the flies from the RNA-seq data. This suggests that the cells used to prepare the viral and control stocks were chronically infected with ANV, as is often the case in many laboratories (S. Liu et al., 2023).

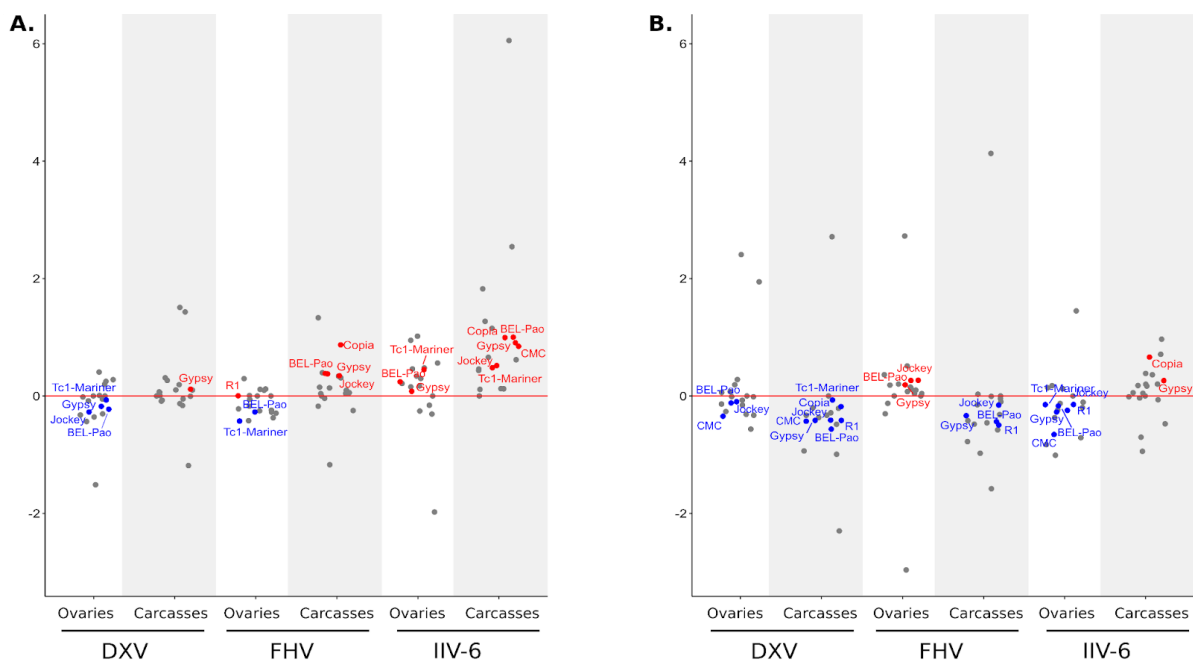
Taken together, these results showed that viruses can modulate the effect on TE transcript amount in several ways in different *Drosophila* species and tissues.



**Figure 4.** Heatmap of the mean log<sub>2</sub> Fold Change values of all TE families for DXV, FHV or IIV-6 between infected and mock conditions, for *D. melanogaster* (left) and *D. simulans* (right). The value shown is the mean log<sub>2</sub> Fold Change between infected and mock conditions. Significant values are shown in bold.

## TE Transcript are modulated at the level of the class, superfamilies and families

We have shown that there is an overall TE transcript modulation in both tissues and species. These results prompted us to ask whether this overall modulation is due to a specific TE class, superfamily or family, we have used TETools (Lerat et al., 2017) to analyse TE expression at the family level. Across the 237 TE families in all infected samples, we detected a higher number of differentially expressed (DE) TEs in carcasses than in ovaries. Except in *D. simulans* carcasses, we found that the number of DE TEs families was higher after an infection with IIV-6, followed by FHV and then DXV for both species and independently of the tissue. Indeed, in *D. simulans* carcasses, the highest number of DE TEs was obtained by DXV (83 DE TEs), then by IIV-6 (70 DE TEs), and only 37 DE TEs by FHV. By observing DE TEs shared between infections, we found that *blood* was commonly down-regulated following all infections in *D. melanogaster* ovaries (Fig. S3). In *D. melanogaster* carcasses, 11 TEs were differentially expressed. However, DE TEs differed between species. Indeed, in *D. simulans* ovaries, *G6* and *412* were the only two DE TEs shared between the different infections, up-regulated with FHV and down-regulated with DXV and IIV-6. In carcasses, 9 TEs were commonly differentially expressed after infection of all three viruses, although they showed different modulation directions. Interestingly, a higher number of TEs were shared in carcasses with the three viruses than in the ovaries, both in *D. melanogaster* and *D. simulans*.



**Figure 6. A. and B.** Mean log<sub>2</sub> Fold Change of TE transcripts superfamilies for DXV, FHV, and IIV-6 between mock and infected conditions, and for ovaries and carcasses independently, for : **A.** *D. melanogaster* w<sup>1118</sup>, and **B.** *D. simulans* Makindu. The red line indicates a log<sub>2</sub>FC equal to 0, i.e. no difference between the two conditions. Red dots are TE superfamilies with a log<sub>2</sub>FC higher than 0 with a p-value < 0.05, and blue dots are TE superfamilies with a log<sub>2</sub>FC lower than 0 with a p-value < 0.05.

Due to heterogeneity of the modulation at the TE family level, we wanted to test whether the different superfamilies always show the same modulation direction with the different infections (Fig. 6 and Table S2). *Penelope* superfamily was not detected in our samples. Although we only had one value, we were able to observe that *MuDR*, *piggyBac* and *Q-element* seemed to be affected by all viral infection ( $\log_2FC > 0.5$  or  $< -0.5$ ), except in DXV- or FHV-infected *D. melanogaster* ovaries for *Q-element*. Broadly, several superfamilies were significantly impacted by infections in different ways, depending on the tissue and species. In *D. melanogaster*, the *BEL-Pao* superfamily was significantly affected by the infection with FHV and IIV-6. *Jockey* was significantly up-regulated by FHV and IIV-6 in carcasses and down-regulated by DXV in ovaries. *Tc1-Mariner* was also among the superfamilies affected by infection, except in DXV- and FHV-infected carcasses. Specifically in somatic tissues, IIV-6 significantly increased CMC, *Cr1* and *Copia*, as did FHV for the latter. Apart from FHV-infected ovaries, *Gypsy* was up-regulated in all conditions and down-regulated in DXV-infected ovaries. In *D. simulans*, *BEL-Pao*, CMC, *Copia*, *Gypsy*, *Jockey*, *R1* and *Tc1-Mariner* were also significantly modulated. We observed that *BEL-Pao* and *Jockey* had the same effects depending on the tissues and viruses used, having no effect in IIV-6 carcasses where only *Copia* and *Gypsy* were significantly increased after infection.

To further study the impact of DXV, FHV, and IIV-6 infections on the two species, we finally analysed their effects on TE modulation at the level of the three main TE classes (LTR, LINE and DNA). We found the same direction of modulation of TE classes in relation to the overall effects, thus no significant differences across TE classes were detected (Fig. S2 and Table S3). However, in DXV-infected carcasses we did find a different modulation depending on the TE class, with an increase in TE transcripts only for LTR elements (mean per TE family  $\lg_2FC = 0.211$ , paired Wilcoxon test: p-value = 0.016). As expected, the number of differentially expressed (DE) TE families (up- or down-regulated) was consistent with the global modulation observed in each condition (Table S2B.). Even if an average decrease is observed, for example, some TEs were up-regulated. However, it is interesting to note that no TE was up-regulated in DXV-infected ovaries, even though there was an overall decrease in both *Drosophila* species (See Fig. S4 for some TE family details).

Overall, our results suggest that the global modulations observed in the quantities of TE transcripts are also specific to families, superfamilies and classes, and vary according to tissue, virus and species.

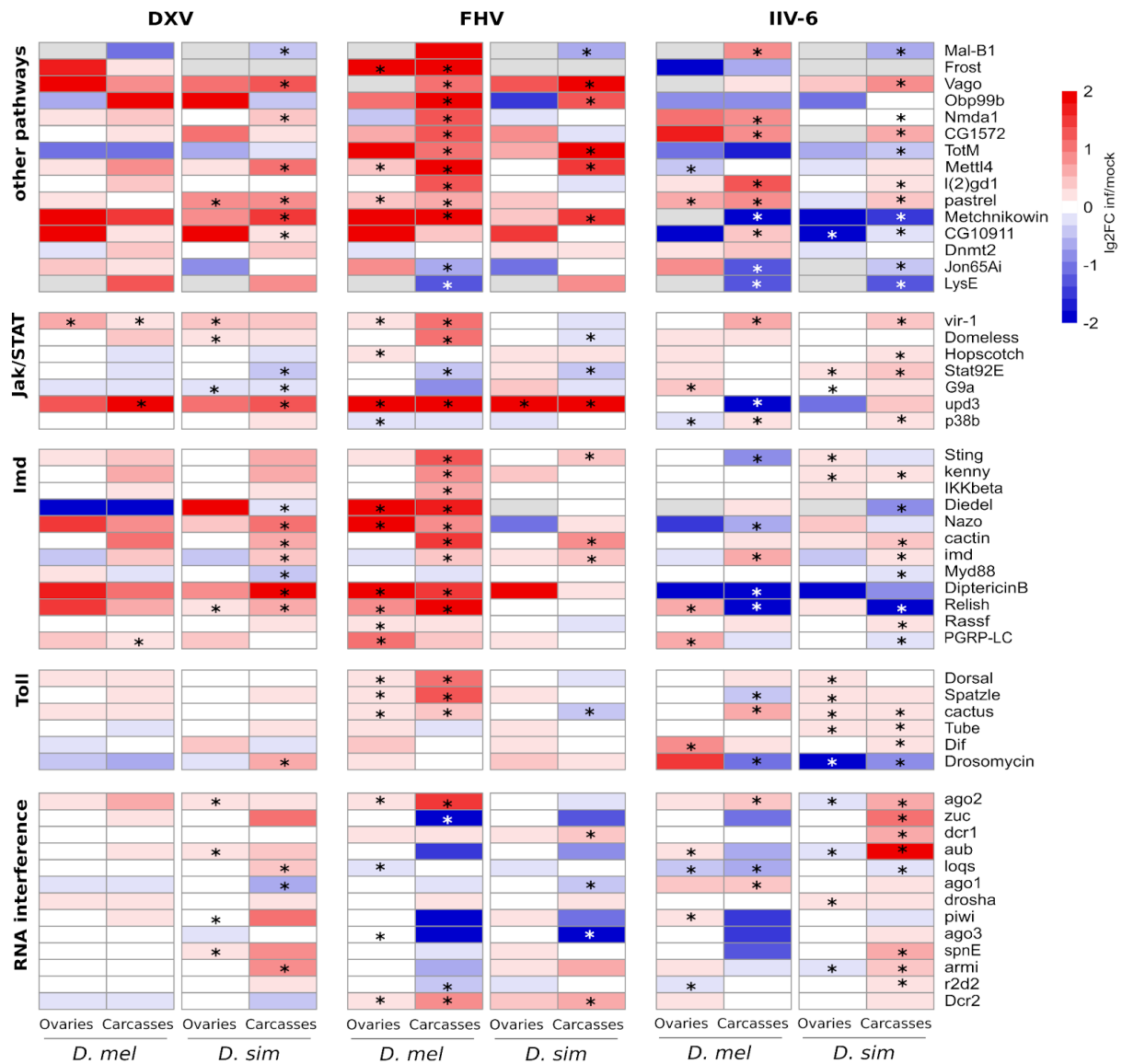
## Host Immune System Differ in Response to Infections

To investigate whether the genes of *D. melanogaster* and *D. simulans* are affected by FHV, DXV and IIV-6 at the peak of viral replication, we first analysed the number of DE genes in the RNA-seq data (Table S4). We found that for each infection, tissue and species, there was a significant number of DE genes, always more genes down-regulated following infection than up-regulated. Then, gene ontology (GO) enrichment analysis allowed us to observe which functions were enriched in these DE genes (Fig. S5 and S6). Merklings et al. (2015) have established the important role of the heat shock response in innate antiviral immunity in *Drosophila*, following infection with an RNA virus. Here, we detected an induction of the heat shock response, specifically in DXV- and FHV-carcasses for *D. simulans*. To study the genes in further detail, we used a list of genes corresponding to the main regulatory pathways in *Drosophila*, including the RNAi pathway, the canonical NF- $\kappa$ B pathways such as Toll and Imd (Immune Deficiency), known for their antibacterial and antifungal roles, and the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (Jak/STAT) pathway (Fig. 7 and Table S5, S6 et S7).

Following DXV infection, we detected a significant increase in the expression of the *vir-1* gene of the Jak/STAT pathway in both *D. melanogaster* tissues (ovaries:  $\log_2\text{FC} = 0.69$ , carcasses:  $\log_2\text{FC} = 0.31$ ). Genes involved in RNAi like *ago2*, *aub* or *piwi*, and Imd pathways, such as *Nazo*, *DiptericinB* or *Relish*, did not display significant upregulation upon DXV infection. In *D. simulans*, statistically significant expression were observed in carcasses for *loqs* ( $\log_2\text{FC} = 0.32$ ), *armi* ( $\log_2\text{FC} = 0.77$ ) (RNAi pathway), *drosomycin* ( $\log_2\text{FC} = 0.57$ ) (Toll pathway), and several Imd pathway genes (*Nazo*, *cactin*, *imd*, *DiptericinB*, *Relish*) as well as those from other pathways such as *Vago* ( $\log_2\text{FC} = 1.27$ ). In ovaries, *pastrel* ( $\log_2\text{FC} = 0.87$ ) increased significantly. In addition, *ago2*, *aub*, *piwi* et *spnE* (RNAi pathway), *Relish* (Imd pathway), *vir-1* and *Domeless* (Jak/STAT pathway) displayed significant differential expression but with a  $\log_2$ -fold change lower than 0.20.

In FHV-carcasses of *D. melanogaster*, we detected activation of several genes in the Toll, Imd, Jak/STAT pathway and others such as *Frost*, *Vago*, *TotM*, *pastrel* or *Metchnikowin* ( $\log_2\text{FC} > 1$ ). On the contrary, *zuc* ( $\log_2\text{FC} = -2.34$ ) (RNAi pathway), *LysE* ( $\log_2\text{FC} = -1.18$ ) and *Jon65Ai* ( $\log_2\text{FC} = -0.65$ ) showed a significant decrease in response to FHV infection. In ovaries, genes from the four main pathways were also activated, with lower expression than those observed in carcasses, except for *Diedel* ( $\log_2\text{FC} = 4.31$ ), *Nazo* ( $\log_2\text{FC} = 2.61$ ) and *DiptericinB* ( $\log_2\text{FC} = 4.33$ ) (Imd pathway). Only *loqs* was significantly underexpressed ( $\log_2\text{FC} = -0.17$ ).

Interestingly, we could not detect differentially expressed genes in *D. simulans* ovaries. In carcasses, the RNAi (*dcr1* and *dcr2*) and Imd (*Sting*, *cactin*, *imd*) pathways showed slightly upregulated genes. However, *Vago*, *Opb99b*, *TotM*, *Mettl4* and *Metchnikowin* genes showed stronger activation in response to FHV infection ( $\log_2FC > 1$ ). Toll (*cactus*) and Jak/STAT (*Domeless* and *Stat92E*) pathway genes were under-expressed.



**Figure 7.** Heatmap of log2 Fold Change values between infected and mock conditions for genes involved in immune pathways. Stars indicate significant p-values (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). For gray boxes, adjusted p-values could not be computed.

After being infected with IIV-6, the differential expression of genes induced in both species was more variable. The Jak/STAT pathway genes were activated in all tissues of both species. In all *Drosophila* carcasses infected with IIV-6, a large number of genes were significantly downregulated, such as *loqs* (RNAi), *Relish* (Imd), *Drosomycin* (Toll), *Metchnikowin*, *Jon65Ai* and *LysE*. However, *ago2* (RNAi), *imd* (Imd), *cactus* (Toll) and *vir-1* (Jak/STAT) genes

displayed significant upregulation. The same contrasting pattern was observed in the ovaries of both species.

Overall, our results suggest that in response to an RNA virus the same pathways are globally upregulated according to the species. Nevertheless, the immune response after an infection with a DNA virus (IIV-6) appears to be gene-dependent.

## DISCUSSION

In this work, we characterised the impact of three viruses that differ in the nature of their genome ((+)ssRNA, dsRNA, and dsDNA) and their natural host. As expected, we could see that all three viruses were capable of replicating in *D. melanogaster* under experimental conditions but also in *D. simulans*, in which no data with these viruses had been obtained so far. Moreover, these results suggest that *D. melanogaster* seems to better control the infection, as the viral titer decreases after the replication peak, whereas this is not the case for *D. simulans*. Using the powerful genetic material provided by the transgenic strain at our disposal, we found that TEs, in face of ssRNAs, dsRNs, and DNA viruses, could play a major role in response to virus infections in both species. Furthermore, S100 showed no greater resistance than S0 following infection with IIV-6 in particular. These results suggest that the antiviral regulation remains efficient depending on a certain amount of TEs. Indeed, we know that within these different *Drosophila* strains, a plateau in terms of TE content is reached after 70 shift generations, S70 having the highest TE transcripts amounts (Chambeyron, personal communication). This could indicate that a particular quantities of TE transcripts could be useful and help cope with viral infection, based on a precise and subtle balance between host and TE regulation. Apart from survival, how replication takes place in this transgenic line and whether TE content is affected are still unanswered questions.

In this work we could not detect chimeric virus-TE transcripts after any type of infection. However, chimeric virus-TE transcripts were previously detected after an infection with DCV (Mayeux et al. in prep). This could reflect that the molecular link between virus and TEs is only established in the case of infections by viruses that share a long co-evolutionary history with the host. However, Goic et al. (2013) showed the presence of TE-mediated production of FHV, which generates FHV retrotransposon chimeric reads, which enabled a better response to infection. It is therefore not impossible that the absence of chimeric transcripts between TEs and viruses in our study is due to technical limitations (quantity of RNA, statistical power), and



in particular to the absence of the poly(A) tail of the viruses, which prevented their extraction due to a protocol targeting mRNAs with a poly(A) tail.

Looking at the mapping profiles, Bronkhorst et al. (2013) initially demonstrated that the bidirectional transcripts (sense and antisense) produced by IIV-6 had the ability to base pair and form long dsRNA molecules. This mechanism would allow substrate production in a Dcr-2-dependent manner, which is necessary for triggering the antiviral RNAi pathway. The absence of alignment against the IIV-6 genome in ovaries could suggest that viral replication does not occur in this tissue. Although the presence of a hotspot of reads in the IIV-6 genome does not allow us to conclude on this hypothesis, this idea may be reinforced by the fact that this virus is not transmitted vertically and that no iridescence was observed in ovaries. To go further, we also need to study the role of the protein encoded by this portion of the genome overexpressed by IIV-6.

The results obtained also showed that even with viruses that are not natural pathogens of *Drosophila*, TE transcript amounts can be impacted, both in ovaries and in carcasses. The direction of the modulation observed following an infection with an RNA virus in *D. melanogaster* are comparable with the results obtained by Roy et al. (2021) during infection with the DMelSV (ssRNA(-)) and by Mayeux et al. (in prep) with the DCV viruses, both natural pathogens of *Drosophila*. They found an increase in TE transcript amounts in carcasses and a decrease in ovaries in *D. melanogaster*. Knowing that *Drosophila* are mainly infected by RNA viruses (Shi et al., 2016), these results suggest that this species may favor TEs regulation in ovaries, probably to protect hereditary genetic material (Roy et al., 2021). The significant increase in TE transcript amounts observed following infection with the DNA virus IIV-6 could be linked to the fact that IIV-6 also contains TE insertions in its own genome (Loiseau et al., 2021). Quantifying the TE transcript amounts corresponding specifically to IIV-6 and the host would help us to determine whether the modulations observed with this virus are due to the host genome or to specific TE activity of the virus. Strikingly, results obtained using the piwi-knockdown transgenic line suggest the possibility that too many TEs could explain an increase in TE transcript amounts after infection in all tissues in *D. melanogaster*. This would be detrimental to the host, which would no longer be able to regulate TEs correctly.

The scenario for *D. simulans* is less clear. Based on our results, no modulation pattern can be established depending on the nature of the virus or the tissue. The lower TE content in *D. simulans* could explain why this species has a less efficient regulatory system than *D.*

*melanogaster*, leading to variable responses depending on the virus at the origin of the infection. Moreover, as the viruses were produced from *D. melanogaster* cells, it is possible that the host response was shaped by the adaptation of the viral stock over the various passages in *D. melanogaster* cells.

In addition to the number of differentially expressed TEs, it would be interesting to (i) test whether viral infections have an impact on transposition rates, in order to (ii) determine whether TEs tend to have a preference for insertion sites after infection, and (iii) whether they insert near genes with the same type of function.

Apart from the observed changes in TEs, immune pathways can also demonstrate diverse responses following viral infection. During DXV infection, Zambon et al. (2005, 2006) described the important role of the Toll pathway in response to infection. Here, we did not detect any pathway-specific activation in *D. melanogaster*. In *D. simulans*, activation of the Toll pathway was detected but remains weaker than certain other genes from other pathways. It would be therefore interesting to use fly mutants specific for the Imd pathway to determine whether its activation does not provide antiviral protection as described by Zambon et al. (2006). However, their analyses showed that flies died between 20 and 25 days after infection, compared with 10 days in our study. It is therefore possible that the activation of pathways in response to DXV infection depends on the viral load inoculated.

Following FHV infection, it has been described that the Jak/STAT and Imd pathways are activated (Dostert et al., 2005; Ekengren et al., 2001). Our results in *D. melanogaster* are in agreement with previous works: there is indeed an activation of *vir-1* in both ovaries and carcasses. In both species and more in *D. simulans*, it is tempting to speculate that activation of the Jak/STAT pathway could be carried out by *Vago*, the role of which has already been described (Deddouche et al., 2008). In addition, *Unpaired* genes could also play an important role in activating the Jak/STAT pathway in response to FHV infection (Myllymäki & Rämet, 2014). Ferreira et al. (2014) describe that Toll pathway activation would only be efficient in response to oral infection, with successful viral resistance upon *Dorsal* activation. The lack of activation of the pathway in *D. simulans* is in agreement with the observations by these authors. However, it would appear that the pathway may be efficient in *D. melanogaster* due to the activation of *Dorsal*, then even during intrathoracic infection.

In the case of IIV-6, Merklings et al. (2015) described an important role for the heat shock restriction factor (*Hsf*) only in response to infection by an RNA virus, as here for DXV and FHV in *D. simulans*. Then, the lack of induction of the heat shock response is in agreement with the observations by these authors. Moreover, West et al. (2019) describe that the virus is capable of inhibiting the Toll and Imd pathways, which would explain the highly variable pattern of up- and down-regulation observed by the genes in these pathways. In addition, Doster et al. (2005) and Kemp et al. (2013) had for instance not detected the activation of *vir-1* (Jak/STAT pathway) during IIV-6 infection. Conversely, (West & Silverman, 2018b) showed that infection led to induction of the Jak/STAT pathway through several genes, including *Stat92E* and *p38b*. Our data are in agreement with these observations and allow us to suggest that activation of this gene is carcass-specific for both species, and would be linked to activation of *p38b* and probably *vir-1*. Here, we suggested a role for *Drosophila p38b* in protection against virus infection, having initially a known role in the response to bacterial and fungal infection (Cheung et al. 2010).

Overall, these results suggested that the RNAi pathway is not the only pathway activated following viral infection. Blockage of the RNAi pathway at different levels by VSRs could explain the supportive activation of other pathways. Further analysis of small RNA sequencing data will enable us to determine how VSRs affect regulatory pathways and whether TE-derived small RNAs are affected.

## MATERIALS AND METHODS

### **Drosophila strains and rearing conditions**

*D. simulans Makindu* strain was previously described by Akkouche et al. (2013) and Fablet et al. (2019). S0, S10, S30 and S100 transgenic *D. melanogaster* strains were previously described by Barckmann et al. (2018), and S70 by Mohamed et al. (2020).

Flies were reared at 25°C (or 18°C for transgenic flies in order not to induce *piwi* knock-down) on corn medium and maintained under standard laboratory conditions: 12h;12h light:dark cycle and 70% RH. Except for transgenic lines, eggs were dechorionated by bleaching to eliminate chronic viral infections as previously described (Merklings & van Rij, 2015b). All of the flies were treated with tetracycline for two generations in order to remove *Wolbachia*, an endosymbiotic bacteria. All of these treatments were carried out in our first study, previously published by (Mayeux et al. in prep).

### **Viruses productions from infections of cultured cells**

Purified DXV and FHV were generated from an initial stock kindly provided by Carla Saleh's lab (Institut Pasteur, France), and by Clément Gilbert (CNRS, University of Paris-Saclay, France) for IIV-6. FHV, DXV and IIV6 were produced and titrated in Schneider's *Drosophila* cells with Wg receptor (S2R+, (Yanagawa et al., 1998) from Chambeyron's lab. For each virus independently, S2R+ cells were cultured at 27°C in Schneider's *Drosophila* Medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin (PS) 10 000 U/mL (all Gibco). When the cells reached confluence and over 95% viability after 2 d, virus was added (100 µl for FHV and DXV, 14 µl for IIV-6) (median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) of 4.6 x 10<sup>8</sup> per ml, 1.58 x 10<sup>8</sup> per ml and 6.40 x 10<sup>10</sup> for IIV-6). At 6 dpi with FHV, DXV or IIV-6 in Schneider's *Drosophila* Medium medium with 1% penicillin-streptomycin 10 000 U/mL and without FBS, cells were pelleted at 800g for 5 min at room temperature. The supernatant was transferred in a new tube store on ice. The cells were resuspended in 2mL of media. To lyse cells, this suspension with cells was frozen at 80°C during 15 min and thawed at 37°C twice. To remove any cellular bacteria or components, cells were centrifuged for 5 min at 1200 g at 4°C. The supernatant was harvested and mixed with the rest of the solution, and 1 %BicNa 7.5% was added. Then, the viral solution was aliquoted and stored at -80°C, and the viral titer was determined (FHV: 1.93 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/ml, DXV : 3.16 x 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, IIV-6: 5.88 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml) using the Reed-Muench end-point method (Reed & Muench, 1938). A 'mock' purification (without virus inoculation) was also produced following the same protocol, to test for possible contaminants in the viral solutions that could provoke an immune response and interfere with the analyses.

### **Infections of flies with FHV, DXV or IIV-6**

Using CO<sub>2</sub>, 3-6 day old flies were anesthetized and infected by pricking injection of the viral stock solution (see above), at the intrathoracic level using a 0.15 mm diameter anodized steel needle, as described in (Martinez et al., 2014). To control the absence of mortality in absence of viral infection, flies were pricked with the 'mock' solution. Therefore, 100 infected females and 50 'mock' females were kept in rich medium vials, 10 flies per vial, in order to follow the mortality. Flies were transferred to fresh media every 2-3 days. For survival analysis, the number of dead flies was counted each day after infection, for 15, 30 or 50 days depending on the virus and *Drosophila* strain.

### **DNA and RNA extraction for viral quantification by qPCR and RT-qPCR**

To quantify FHV and DXV expression, total RNAs were extracted individually for 6 infected and 2 mock flies at 0, 2, 4, 6 and 8 dpi using Qiazol and the RNeasy mini kit (Qiagen). Purified RNAs were processed using Turbo DNase (Ambion DNFree kit). Reverse transcription was performed on 4 µl of total RNAs using SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen). For IIV-6 expression, DNA was extracted individually for 6 infected and 2 mock flies at 0, 3, 6, 12 and 18 dpi using the One-4-all Genomic DNA Miniprep kit (Bio Basic).

qPCR was performed using 2  $\mu$ L of cDNA, 0.5  $\mu$ L of each primer (IIV-6: 5'-TACAACACCTGCGTCAAAGG -3' and 5'-TGCAGGAGCAACAGGTACAG -3') and 5  $\mu$ L of SsoADV SYBR® Green Supermix (Bio Rad) in a QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) and following: 30 sec at 95 °C; 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 58 °C for 30 sec. The *rp49* gene was used as a positive RNA control and for the normalization.

### RNA sequencing

Accordingly to the exponential phase of viral replication, thirty pairs of ovaries were carefully and manually dissected at 6, 8 and 12 dpi for DXV, FHV and IIV-6, respectively. The rest of the body will be called 'carcasses' hereafter. Total RNAs from 30 pairs of ovaries or 30 carcasses were extracted according to the protocol described above, using Qiazol and the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Purified RNAs (4  $\mu$ L) were processed by TurboDNase (Ambion DNAfree kit). RNA quality was validated using a Bioanalyzer (Agilent). Library preparation was performed at the GenomEast platform at the Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC, France) using Illumina Stranded mRNA Prep Ligation - Reference Guide - PN 1000000124518. Libraries were sequenced as paired-end 100 base reads (HiSeq 4000: Illumina).

Read alignment was performed using Hisat2 (Kim et al., 2019) on *D. melanogaster* and *D. simulans* reference genes available from FlyBase, versions r2.02 and r6.16, respectively, and previously masked. Alignments were processed using SAMtools (H. Li et al., 2009). Gene count tables were generated using eXpress (Roberts & Pachter, 2013). TE count tables were obtained using the TEcount module of TETools (Lerat et al. 2017) and the same TE reference files as used in Roy et al 2020. Gene and TE count tables were concatenated and then analyzed using the DESeq2 R package (version 4.3) (Love et al., 2014). The reference sequences from GenBank are NC\_004177.1\_Drosophila\_x\_virus\_segment\_A and NC\_004169.1\_Drosophila\_x\_virus\_segment\_B for DXV, NC\_004146.1\_Flock\_house\_virus\_RNA\_1 and NC\_004144.1\_Floc\_house\_virus\_RNA\_2 for FHV, and NC\_003038.1\_Invertebrate\_iridescent\_virus\_6 for IIV-6.

The gene ontology (GO) analysis of RNA-seq data was performed on the differentially expressed genes with the gseGO function of the clusterProfiler package (Yu et al., 2012). The GO terms were obtained using the R package organism (Carlson, 2019) with the database org.Dm.eg.db v3.10.0, corresponding to all *D. melanogaster* annotated genes. Hereafter, the GO overrepresentation analysis of biological process (BP) was performed with adjusted p-values by the FDR method, p-value cutoff at 0.05, and a minimum of 3 genes per term.

### **Chimeric transcripts identification**

Chimeric transcripts were identified with ChimeraTE Mode 2 (Oliveira et al., 2022), which is able to identify gene-TE chimeras through two independent alignments with gene transcripts and TE insertions. These alignments are used to identify paired-end reads with mates spanning from transcripts to TEs, providing evidence of co-transcription between both sequences. In this work, we have used the pipeline with transcripts and the respective viral genome used in the infections. Therefore, paired-end reads with opposite read mates aligning into transcripts and virus were used as chimeric reads. We have considered only chimeras present in the three RNA-seq replicates, with at least five chimeric reads as mean coverage between them.

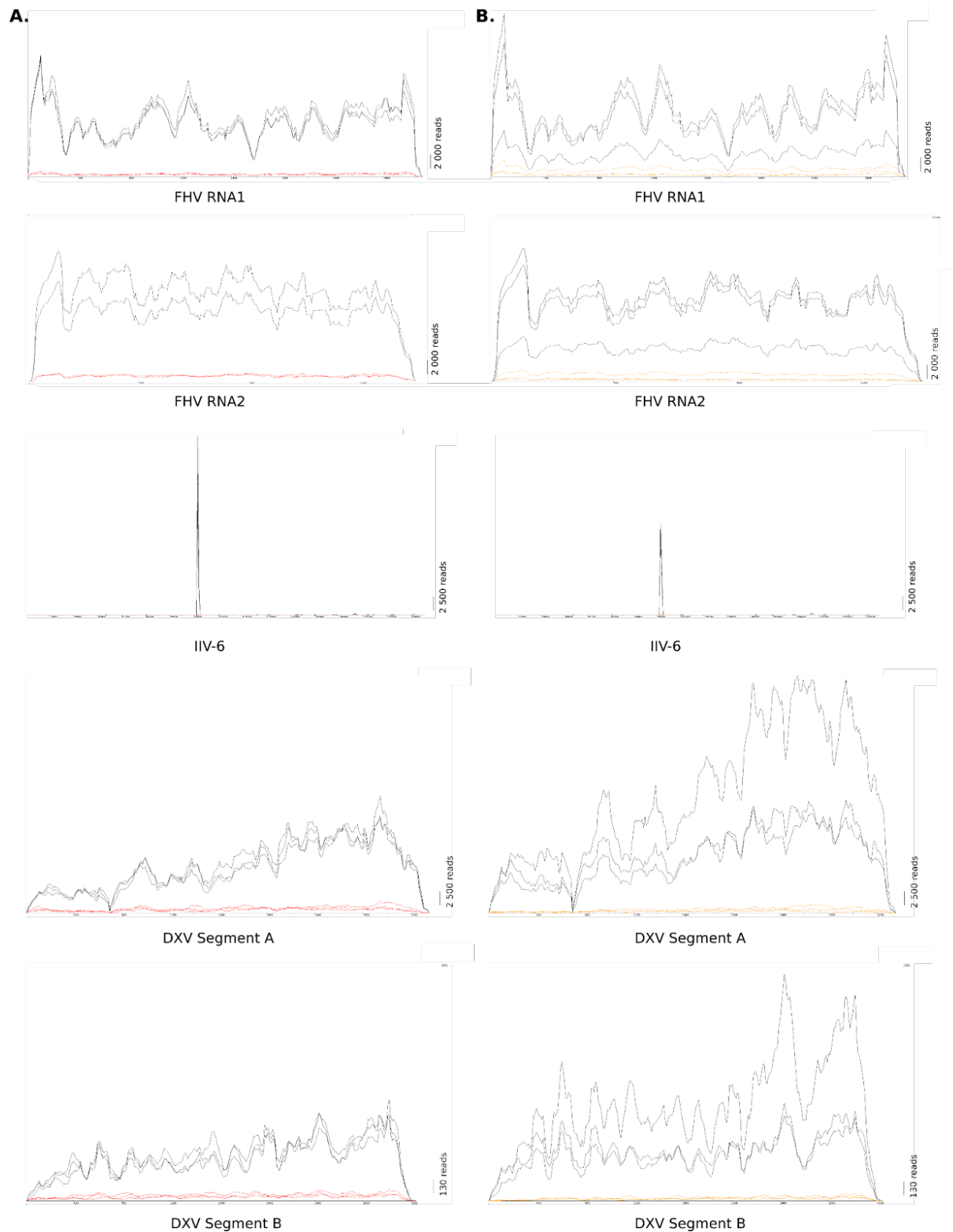
### **Statistical and functional analyses**

All statistical analyses were performed in R (version 4.3.0). The modulations of TE counts were tested for carcasses and ovaries separately, considering 237 TE families. Wilcoxon paired tests comparing TE normalized counts in the infected versus mock conditions were used. The null hypothesis corresponds to an equal number of dots above and below the 0 horizontal line. Differential expression of genes was tested using DESeq2 R package and adjusted P values (significance if lower than 0.05) (Love et al., 2014).

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was performed using the computing facilities of Laboratoire de Biométrie Biologie Evolutive / Pôle Rhône-Alpes de bioinformatique (CC LBBE/PRABI) and the biologic facilities: Symbiotron Pasteur platform, of Laboratoire Biologie Fonctionnelles, Insectes et Interactions (BF2i, Lyon) (managed by Federica Calevro, who we thank for her help). Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the 'France Genomique' consortium (ANR-10-INBS-0009). We thank Maria Carla Saleh, who provided us with FHV and DXV samples. We thank Clément Gilbert, who provided us with IIV-6 viral samples. We thank Matthieu Boulesteix, Miriam Merenciano, Daniel Siqueira De Oliveira and Cristina Vieira for helpful discussions. We thank Nelly Burlet, Sonia Janillon and Agnès Vallier for technical help. We thank also Clément Gilbert, Feth el Zahar Haichar and Anna Zaidman for helpful discussions. This work was supported with funds from the ANR TEMIT (Transposable Element control and antiviral immunity).

## 3.2. Matériels supplémentaires



**Figure S1.** RNA-seq reads mapping along FHV RNA1, FHV RNA2, IIV-6, DXV segment A and DXV segment B genomes for (A) *Drosophila melanogaster* and (B) *D. simulans*. The ovaries are shown in red for *D. melanogaster* and orange for *D. simulans*, and the carcasses are in black.

**Table S1.** RNA-seq data summary table with the percentage of viral RNA (% vRNA), the mean per TE family (mean lg2FC; wilcoxon-test : p-value) and the average of the relative quantity (Rq) of virus. Rq corresponds to 6 dpi for DXV, 8 dpi for FHV and 12 dpi for IIV-6, and were obtained by qPCR.

		DXV				FHV				IIV-6			
Species	Tissue	% vRNA	mean lg2FC	p	Rq	% vRNA	mean lg2FC	p	Rq	% vRNA	mean lg2FC	p	Rq
<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	0.004	-0.14	2.2e-22	2.438	0.046	-0.06	0.002	0.504	0.015	0.16	2.4e-14	0.212
	Carcasses	0.047	0.11	0.07		0.881	0.34	4.22e-24		5.132	0.83	1.5e-63	
<i>D. simulans</i>	Ovaries	0.002	-0.002	7.4e-10	2.68	0.059	0.21	2.52e-12	1.22	0.031	-0.17	2.5e-28	3.670
	Carcasses	0.074	-0.42	4.2e-59		0.893	-0.30	6.79e-14		4.322	0.22	6.1e-9	



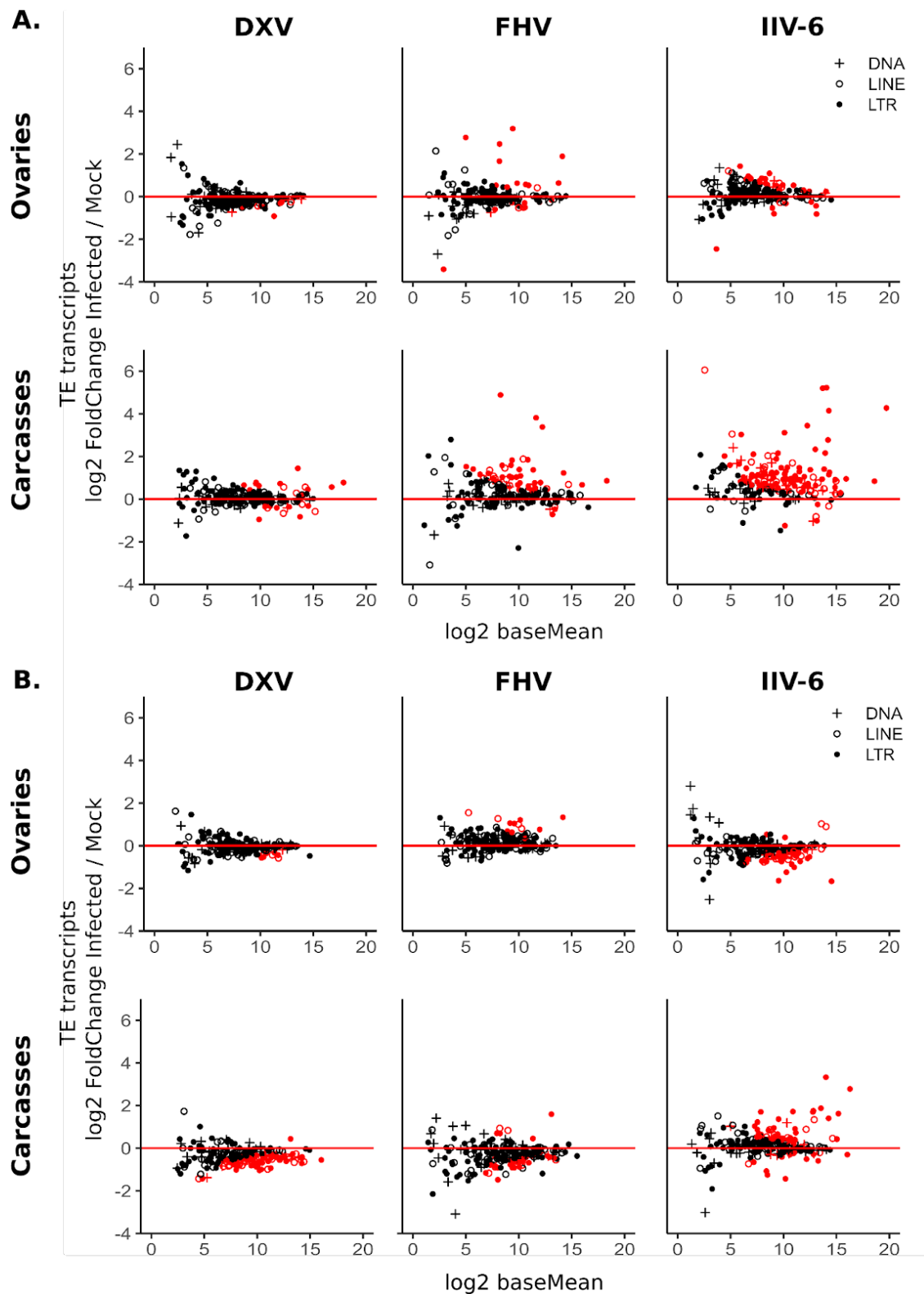
**Table S2. Log2 Fold Change values between infected and mock conditions per superfamilies with DXV, FHV or HIV-6.**

A. Mean values across TE families of log2 Fold Changes in read counts between infected and mock conditions, from RNA-seq data in *D. melanogaster* (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). P-values correspond to the paired Wilcoxon test comparing read counts in infected vs mock conditions across TE families. Significant values are shown in bold (p-value < 0.05).

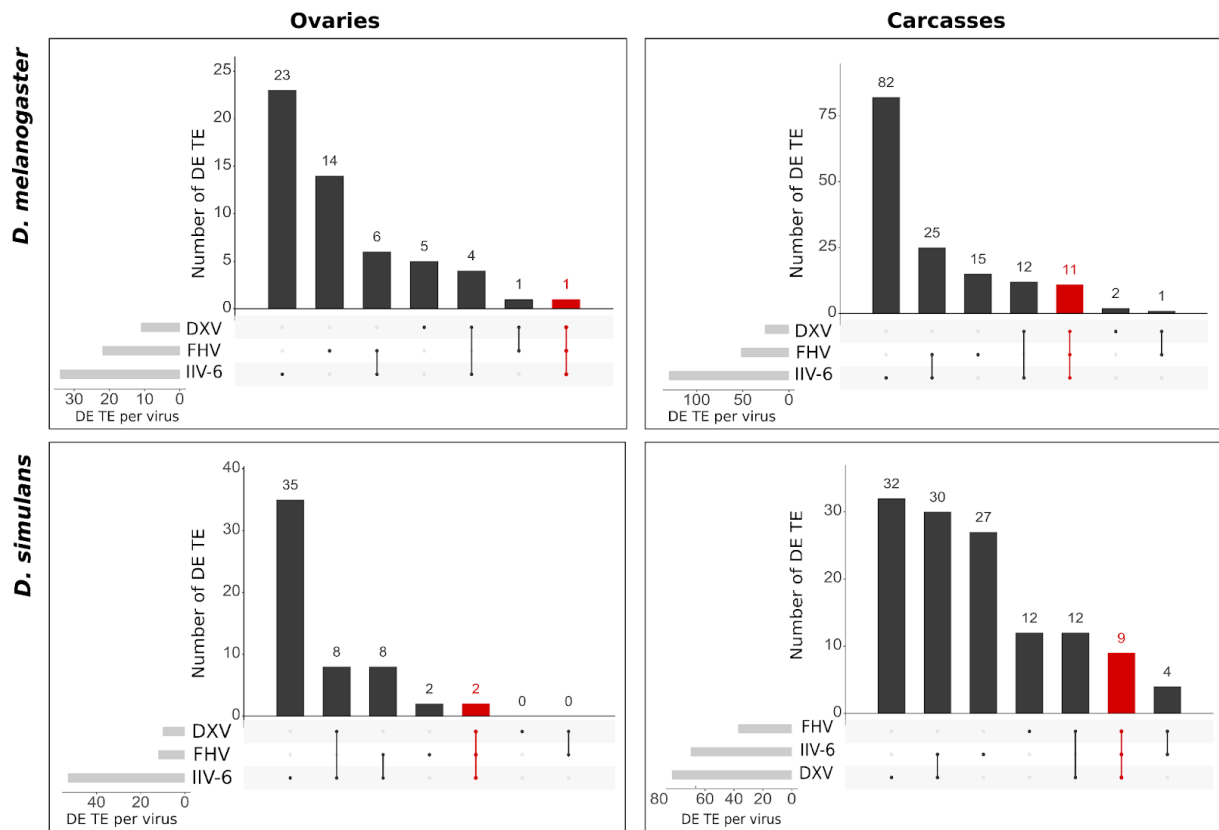
	<i>D. melanogaster</i>											
	Ovaries						Carcasses					
	DXV		FHV		HIV-6		DXV		FHV		HIV-6	
	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p
BEL-Pao	-0,273	0.006	<b>-0,273</b>	<b>0.047</b>	<b>0,242</b>	<b>0.019</b>	0,006	0.698	<b>0,376</b>	<b>0.036</b>	<b>1,001</b>	<b>0.001</b>
Circe	-0,358	1.000	-0,173	1.000	0,46	1.000	0,062	1.000	0,056	1.000	0,617	1.000
CMC	0,249	0.844	-0,242	0.063	-0,256	0.688	0,101	1.000	0,309	0.156	<b>0,846</b>	<b>0.031</b>
Copia	0,278	0.505	0,295	0.689	0,155	0.756	0,265	0.230	<b>0,871</b>	<b>0.005</b>	<b>0,995</b>	<b>0.029</b>
CR1	-0,083	0.500	0,118	1.000	0,213	1.000	0,309	0.500	0,337	1.000	<b>1,271</b>	<b>0.500</b>
Gypsy	<b>-0,177</b>	< <b>0.001</b>	0,096	0.769	<b>0,079</b>	< <b>0.001</b>	<b>0,116</b>	<b>0.029</b>	<b>0,383</b>	< <b>0.001</b>	<b>0,907</b>	< <b>0.001</b>
hAT	0,211	0.722	-0,389	0.262	-0,165	0.221	0,072	0.554	-0,042	0.447	0,127	0.477
Helitron	-0,324	0.100	0,008	0.201	0,478	0.201	-0,163	0.361	0,04	0.201	0,112	0.361
I	-0,435	0.250	0,113	0.500	1,018	0.250	-1,186	0.250	-0,248	0.750	0,458	0.250
Jockey	<b>-0,225</b>	<b>0.003</b>	-0,057	0.063	0,172	0.258	0,192	0.915	<b>0,345</b>	<b>0.037</b>	<b>0,518</b>	< <b>0.001</b>
Loa	-0,304	0.371	-0,219	1.000	0,298	1.000	0,103	1.000	0,396	0.371	0,659	0.371
MuDR	0,009	1.000	-0,293	1.000	-0,308	1.000	-0,13	1.000	0,098	1.000	1,152	1.000
P	-0,053	1.000	-0,254	0.106	0,339	0.418	-0,05	0.106	0,137	0.418	0,435	0.059
Penelope	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
piggyBac	0,407	1.000	-0,421	1.000	0,948	1.000	-0,088	1.000	0,043	1.000	1,825	1.000
Q	0	NaN	0	NaN	-1,976	1.000	1,508	1.000	-1,171	1.000	6,054	1.000
R1	-0,017	0.205	<b>0,003</b>	<b>0.042</b>	0,248	0.076	-0,005	0.554	-0,175	0.155	0,125	0.058
R2	-1,512	0.500	-0,276	1.000	0,561	1.000	1,431	0.500	1,332	0.500	2,543	0.500
Tc1-Mariner	<b>-0,067</b>	<b>0.017</b>	<b>-0,428</b>	<b>0.011</b>	<b>0,45</b>	<b>0.009</b>	-0,073	0.845	0,149	0.170	<b>0,481</b>	<b>0.038</b>

**B.** Mean values across TE families of log2 Fold Changes in read counts between infected and mock conditions, from RNA-seq data in *D. simulans* (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). P-values correspond to the paired Wilcoxon test comparing read counts in infected vs mock conditions across TE families. Significant values are shown in bold (p-value < 0.05).

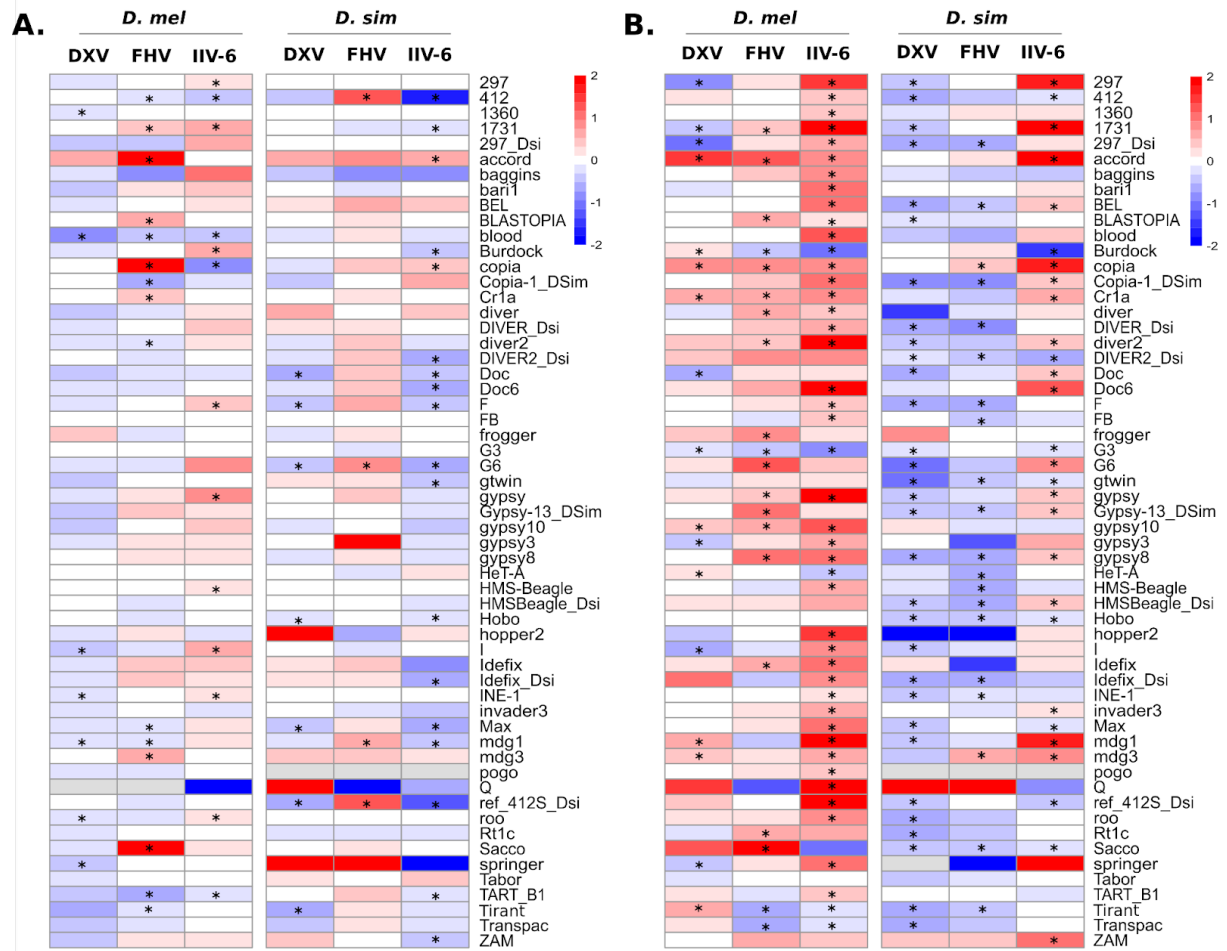
	<i>D. simulans</i>											
	Ovaries						Carcasses					
	DXV		FHV		IIV-6		DXV		FHV		IIV-6	
	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p	log2FC	p
BEL-Pao	<b>-0,097</b>	<b>0.010</b>	<b>0,19</b>	<b>0.028</b>	<b>-0,17</b>	<b>0.032</b>	<b>-0,564</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>-0,436</b>	<b>&lt; 0.001</b>	0,202	0.366
BUT5	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Circe	-0,328	1.000	0,362	1.000	-1,01	1.000	-0,993	1.000	-0,777	1.000	0,169	1.000
CMC	<b>-0,346</b>	<b>0.031</b>	0,099	0.156	<b>-0,656</b>	<b>0.031</b>	<b>-0,415</b>	<b>0.031</b>	-0,006	0.438	-0,064	0.844
Copia	-0,137	0.505	0,04	0.894	0,124	0.733	<b>-0,181</b>	<b>0.012</b>	-0,577	0.339	<b>0,662</b>	<b>0.002</b>
CR1	-0,071	1.000	0,151	0.500	-0,106	0.500	-0,328	0.500	-0,317	0.500	0,383	0.500
Gypsy	0,06	0.109	<b>0,264</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>-0,245</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>-0,416</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>-0,335</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>0,262</b>	<b>0.021</b>
hAT	-0,011	0.266	0,103	0.290	0,146	0.625	-0,299	0.456	-0,103	0.784	-0,035	0.675
Helitron	-0,155	0.418	0,203	0.059	0,175	0.787	-0,367	0.059	0,03	0.281	-0,474	0.106
I	-0,313	0.750	0	0.750	-0,197	0.250	-0,483	0.250	-0,48	0.500	0,046	0.500
Jockey	<b>-0,119</b>	<b>0.009</b>	<b>0,266</b>	<b>0.006</b>	<b>-0,146</b>	<b>0.022</b>	<b>-0,412</b>	<b>&lt; 0.001</b>	<b>-0,155</b>	<b>0.002</b>	0,2	0.104
Loa	-0,265	0.371	-0,303	0.371	-0,37	0.371	-0,201	0.371	-0,422	0.371	-0,013	1.000
MuDR	2,408	1.000	2,724	1.000	1,449	1.000	-2,299	1.000	-0,457	1.000	0,71	1.000
P	-0,013	1.000	0,075	0.059	-0,128	0.106	-0,211	0.106	-0,15	0.106	0,055	0.281
Penelope	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
piggyBac	-0,564	1.000	0,511	1.000	-0,829	1.000	-0,936	1.000	-1,58	1.000	-0,702	1.000
Q	1,944	1.000	-2,963	1.000	-0,711	1.000	2,712	1.000	4,131	1.000	-0,943	1.000
R1	0,191	0.906	-0,126	0.160	<b>-0,273</b>	<b>0.010</b>	<b>-0,43</b>	<b>0.033</b>	<b>-0,496</b>	<b>0.020</b>	0,361	0.084
R2	0,28	0.500	0,039	1.000	-0,238	1.000	-0,328	0.500	-0,976	0.500	0,967	0.500
Tc1-Mariner	0,075	0.894	0,185	0.965	<b>-0,148</b>	<b>0.029</b>	<b>-0,068</b>	<b>0.009</b>	-0,044	0.230	0,178	0.756



**Figure S2. A. and B.** TE transcripts log<sub>2</sub> Fold Change between DXV (left), FHV (middle) or IIV-6 (right) mock and infected conditions. Dots indicate TE classes, while the red line indicates a log<sub>2</sub>FC equal to 0, i.e. no difference between the two conditions. Red dots are TE families displaying significant differential expression at the 0.05 level for DESeq2 adjusted p-values. **A.** *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> ovaries (top) and carcasses (bottom), **B.** *D. simulans* Makindu ovaries (top) and carcasses (bottom).



**Figure S3.** Number of DE TE shared between experimental infection, per tissue and species. The number of DE TEs shared by individuals independently infected with DXV, FHV and IIV-6 is shown in red (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). For each virus, the total number of DE TEs is shown in light grey.



**Figure S4.** Heatmap of log<sub>2</sub> Fold Change values between mock and infected conditions for some TE families, in ovaries (A) and carcasses (B). See Supplemental files for the complete list of TEs. Stars indicate TE families that are significantly differentially expressed (DESeq2 adjusted p-value < 0.05).

**Table S3. Contribution of TE classes to differentially expressed (DE) TE families (DESeq2 adjusted p-values < 0.05).**

A. Mean values across TE families of log<sub>2</sub> Fold Changes in read counts between infected and mock conditions, from RNA-seq data (DESeq2 adjusted p-values < 0.05). P-values correspond to the paired Wilcoxon test comparing read counts in infected vs mock conditions across TE families. Values significantly higher and lower than a p-value of 0.05 are shown in red and blue respectively.

	Condition	LTR		LINE		DNA	
		mean lg2FC	p-value	mean lg2FC	p-value	mean lg2FC	p-value
<b>DXV</b>	<i>D. melanogaster</i> ovaries	-0.486	4.4e-08	-0.346	4.7e-5	-0.334	0.015
	<i>D. melanogaster</i> carcasses	0.211	0.016	-0.072	0.969	-0.410	0.217
	<i>D. simulans</i> ovaries	-0.444	0.005	-0.461	0.008	-0.199	0.024
	<i>D. simulans</i> carcasses	-0.587	1.1e-15	-0.636	3.7e-9	-0.529	1.9e-5
<b>FHV</b>	<i>D. melanogaster</i> ovaries	0.545	0.67	-0.205	0.012	-0.745	1.8e-5
	<i>D. melanogaster</i> carcasses	1.169	4.6e-9	0.878	0.003	0.333	0.052
	<i>D. simulans</i> ovaries	0.881	2.4e-6	1.155	0.047	NA	NA
	<i>D. simulans</i> carcasses	-0.472	3.3e-11	-0.315	1.2e-5	-0.291	9.5e-3
<b>IIV-6</b>	<i>D. melanogaster</i> ovaries	0.285	6.5e-6	0.550	0.052	0.451	0.013
	<i>D. melanogaster</i> carcasses	1.268	4.9e-14	1.034	2.5e-7	0.896	1.54e-5
	<i>D. simulans</i> ovaries	-0.578	3.5e-7	-0.325	2.7e-4	-0.293	7.9e-4
	<i>D. simulans</i> carcasses	0.561	8.4e-4	0.452	5.6e-3	0.203	0.484

**B.** Distributions of the numbers of differentially expressed (adjusted p-value < 0.05) TE families according to TE class, and Fisher exact test comparing distributions across classes. In bold is the highest value between the total number of up-regulated and down-regulated DE TEs.

Virus	Species	Tissue	Orientation	DE TEs	LTRs	LINEs	DNA	p-value
<b>DXV</b>	<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	Up	0	0	0	0	1
			Down	<b>11</b>	6	2	3	
		Carcasses	Up	<b>14</b>	11	3	0	0.506
			Down	12	7	4	1	
	<i>D. simulans</i>	Ovaries	Up	0	0	0	0	1
			Down	<b>10</b>	6	3	1	
		Carcasses	Up	1	1	0	0	1
			Down	<b>82</b>	44	23	15	
<b>HIV-6</b>	<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	Up	<b>26</b>	19	4	3	0.809
			Down	8	7	1	0	
		Carcasses	Up	<b>124</b>	75	32	17	0.719
			Down	6	3	2	1	
	<i>D. simulans</i>	Ovaries	Up	4	2	2	0	0.754
			Down	<b>49</b>	29	14	6	
		Carcasses	Up	<b>52</b>	38	10	4	0.256
			Down	18	12	2	4	
<b>FHV</b>	<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	Up	<b>12</b>	11	1	0	0.368
			Down	10	7	2	1	
		Carcasses	Up	<b>48</b>	34	12	2	0.258
			Down	4	2	1	1	
	<i>D. simulans</i>	Ovaries	Up	<b>12</b>	8	4	0	1
			Down	0	0	0	0	
		Carcasses	Up	6	4	2	0	0.722
			Down	<b>31</b>	23	6	2	

**Table S4. Number of differentially expressed (DE) genes (Up :  $\log_2FC > 1$ ; Down :  $\log_2FC < 1$ ) (DESeq2 adjusted p-values  $< 0.05$ ).**

**A.** Distributions of the numbers of differentially expressed genes according to virus injected. In bold is the highest value between the up-regulated and down-regulated DE genes.

Species	Tissue	Orientation	DXV	FHV	IIV-6
<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	Up	53	193	181
		Down	<b>292</b>	<b>1124</b>	<b>1940</b>
	Carcasses	Up	211	1117	525
		Down	<b>2730</b>	<b>2828</b>	<b>4149</b>
<i>D. simulans</i>	Ovaries	Up	57	96	55
		Down	<b>620</b>	<b>177</b>	<b>2342</b>
	Carcasses	Up	254	511	407
		Down	<b>4756</b>	<b>2642</b>	<b>5306</b>

**B.** Distributions of the number of differentially expressed genes shared between the different experimental injections.

Species	Tissue	Orientation	DXV - FHV - IIV-6	DXV - FHV	DXV - IIV-6	FHV - IIV-6
<i>D. melanogaster</i>	Ovaries	Up	1	15	1	11
		Down	30	58	70	304
	Carcasses	Up	18	107	10	111
		Down	758	525	679	720
<i>D. simulans</i>	Ovaries	Up	0	7	1	3
		Down	34	9	305	64
	Carcasses	Up	39	41	29	59
		Down	1134	413	1815	697



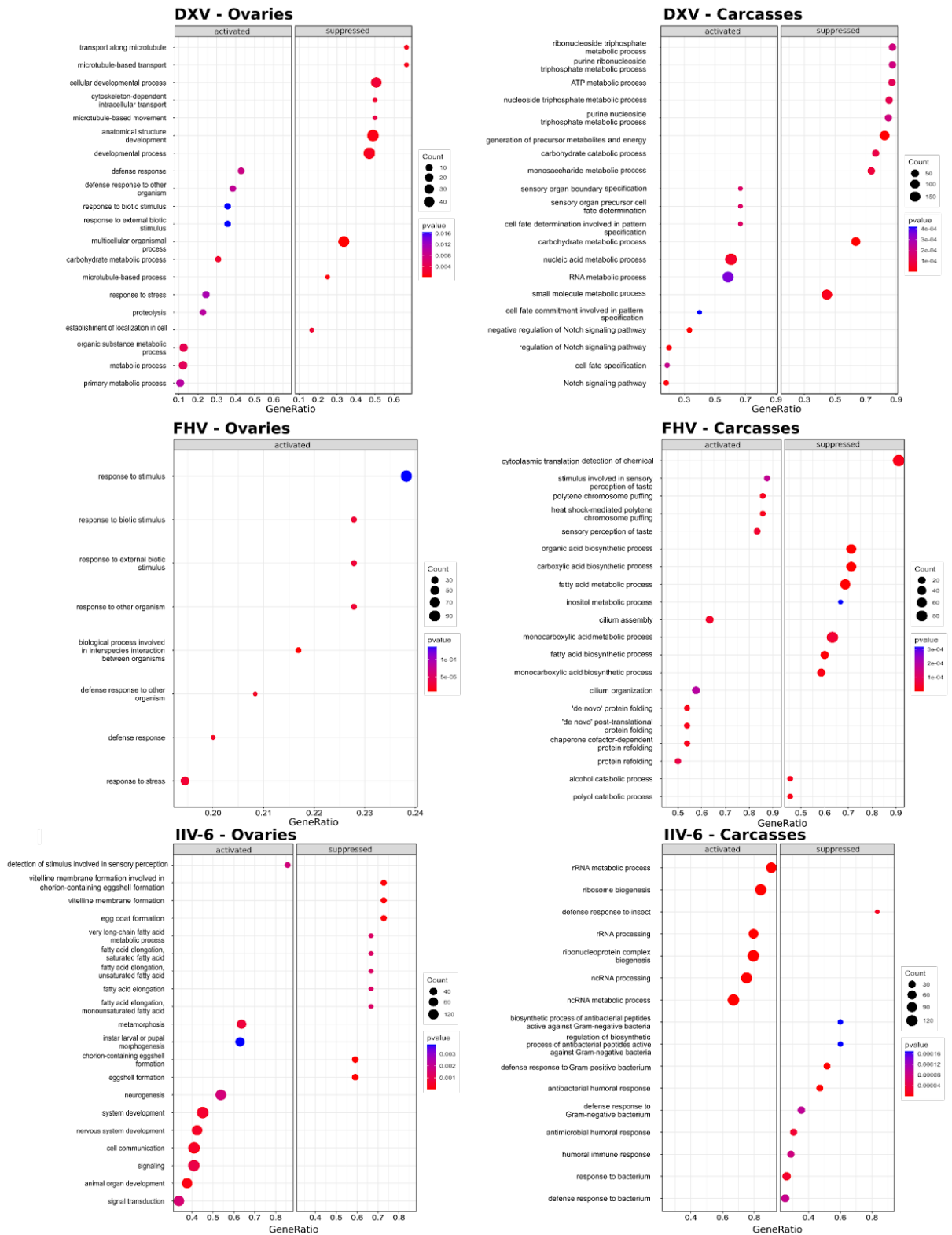
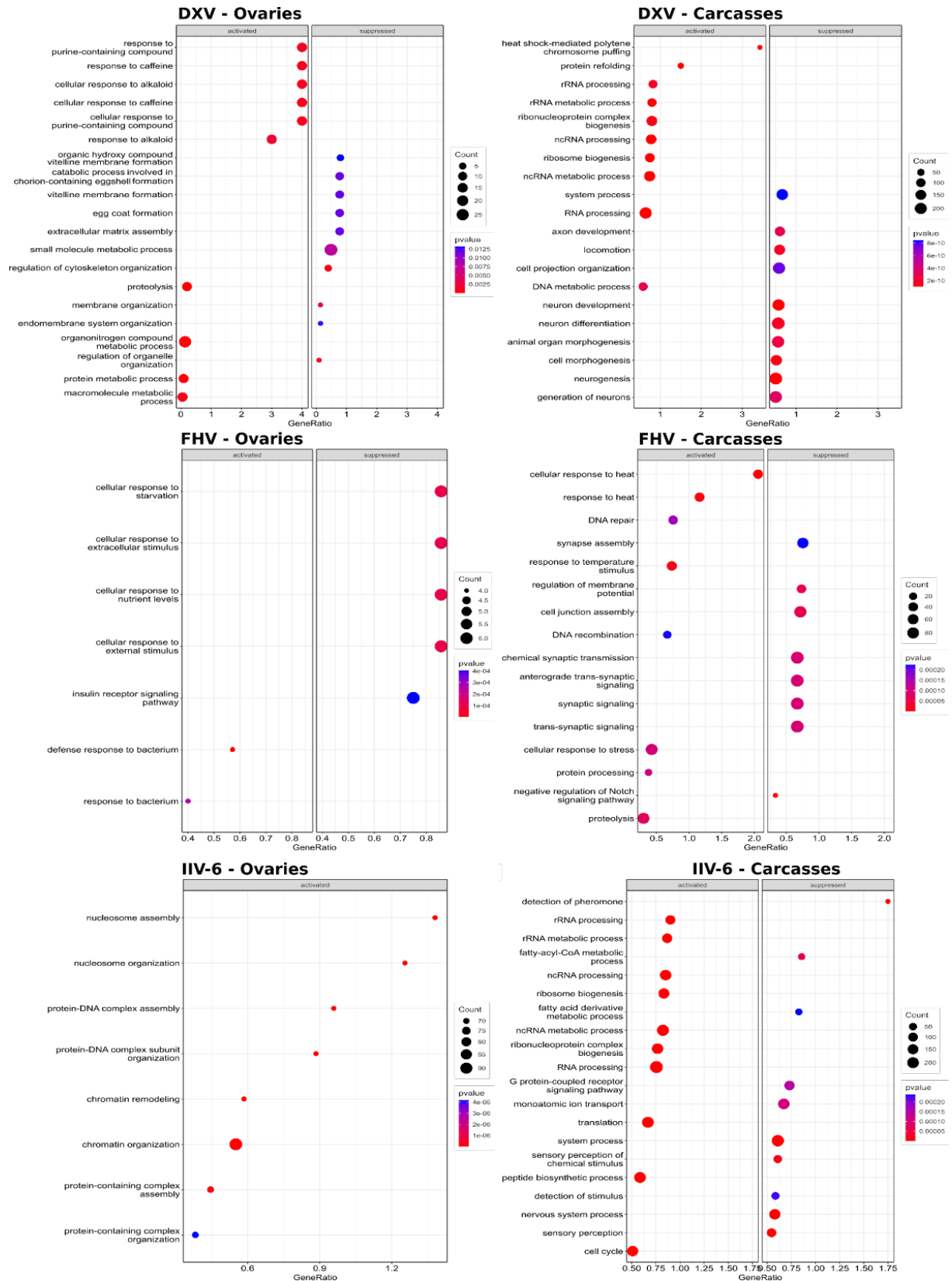


Figure S5. Genes Ontology (GO) enrichment analysis in *D. melanogaster* with FDR < 0.05 (Activated :  $\log_2FC > 1$ ; Suppressed :  $\log_2FC < 1$ ; DESeq2 adjusted p-values < 0.05).



**Figure S6.** Genes Ontology (GO) enrichment analysis in *D. simulans* with FDR < 0.05 (Activated :  $\log_2FC > 1$ ; Suppressed :  $\log_2FC < 1$ ; DESeq2 adjusted p-values < 0.05).

**Table S5. Spearman correlations between ovarian and carcass TE families for each superfamily of each virus.** Circe, MuDR, Penelope, piggyBac and Q superfamilies had only one observation. Significant values are shown in bold (p-value < 0.05).

	<i>D. melanogaster</i>						<i>D. simulans</i>					
	DXV		FHV		IIV-6		DXV		FHV		IIV-6	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
BEL-Pao	0.191	0.461	<b>-0.686</b>	<b>0.003</b>	0.451	0.071	-0.267	0.299	0.069	0.795	0.194	0.455
CMC	<b>0.943</b>	<b>0.017</b>	-0.200	0.714	-0.029	1.000	-0.086	0.919	-0.429	0.419	-0.200	0.714
Copia	0.503	0.099	-0.126	0.700	0.119	0.716	0.231	0.471	0.133	0.683	-0.007	0.991
CR1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000
Gypsy	0.173	0.100	0.102	0.334	<b>0.208</b>	<b>0.046</b>	0.180	0.085	-0.039	0.716	-0.061	0.565
hAT	0.042	0.852	-0.328	0.136	0.098	0.664	<b>-0.444</b>	<b>0.038</b>	0.050	0.827	0.133	0.555
Helitron	0.538	0.212	<b>0.962</b>	<b>0.001</b>	<b>0.885</b>	<b>0.008</b>	0.636	0.124	0.164	0.726	-0.164	0.726
I	-0.500	1.000	-1.000	0.333	-0.500	1.000	-0.500	1.000	1.000	0.333	0.500	1.000
Jockey	-0.078	0.655	-0.063	0.720	0.284	0.098	0.307	0.073	-0.156	0.371	-0.209	0.227
Loa	-0.500	1.000	0.500	1.000	-0.500	1.000	0.500	1.000	0.500	1.000	0.500	1.000
P	-0.636	0.124	-0.091	0.846	0.455	0.306	-0.309	0.500	-0.127	0.786	0.345	0.448
R1	0.118	0.745	-0.498	0.143	<b>0.804</b>	<b>0.005</b>	0.273	0.448	-0.103	0.785	-0.091	0.811
R2	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Tc1-Mariner	0.022	0.949	-0.231	0.448	0.286	0.344	0.267	0.377	0.157	0.608	-0.063	0.837

**Table S6. Spearman correlations between ovarian or carcass TE families of the different injected viruses in *D. melanogaster*, for each superfamily.** Circe, MuDR, Penelope, piggyBac and Q superfamilies had only one observation. Significant values are shown in bold (p-value < 0.05).

	<i>D. melanogaster</i>											
	Ovaries						Carcasses					
	DXV / FHV		DXV / IIV-6		FHV / IIV-6		DXV / FHV		DXV / IIV-6		FHV / IIV-6	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
BEL-Pao	0.353	0.165	-0.260	0.313	-0.022	0.936	0.203	0.432	0.333	0.191	0.069	0.795
CMC	-0.143	0.803	<b>-0.886</b>	<b>0.033</b>	0.029	1.000	0.200	0.714	0.143	0.803	0.314	0.564
Copia	0.259	0.417	0.042	0.904	-0.035	0.921	0.315	0.319	-0.140	0.667	-0.399	0.201
CR1	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000
Gypsy	0.084	0.425	-0.133	0.208	0.038	0.717	0.062	0.560	0.183	0.080	0.126	0.230
hAT	-0.212	0.343	-0.291	0.190	-0.130	0.565	0.021	0.927	-0.407	0.060	0.414	0.055
Helitron	0.077	0.870	-0.615	0.141	0.423	0.344	-0.423	0.344	<b>-0.846</b>	<b>0.016</b>	0.038	0.935
I	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000	0.333	1.000	0.333	0.500	1.000	0.500	1.000
Jockey	0.242	0.162	0.119	0.496	0.059	0.736	0.238	0.168	0.035	0.841	0.315	0.066
Loa	-0.500	1.000	0.500	1.000	-1.000	0.333	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000	0.333
P	0.345	0.448	-0.309	0.500	-0.527	0.224	0.164	0.726	-0.600	0.154	0.236	0.610
R1	0.375	0.285	-0.329	0.353	-0.277	0.439	-0.190	0.599	-0.301	0.399	<b>0.721</b>	<b>0.024</b>
R2	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Tc1-Mariner	0.027	0.935	0.231	0.448	-0.121	0.696	0.258	0.394	0.137	0.656	0.016	0.964

**Table S7. Spearman correlations between ovarian or carcass TE families of the different injected viruses in *D. simulans*, for each superfamily.** Circe, MuDR, Penelope, piggyBac and Q superfamilies had only one observation. Significant values are shown in bold (p-value < 0.05).

	<i>D. simulans</i>											
	Ovaries						Carcasses					
	DXV / FHV		DXV / IIV-6		FHV / IIV-6		DXV / FHV		DXV / IIV-6		FHV / IIV-6	
	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p	rho	p
BEL-Pao	-0.279	0.276	<b>0.806</b>	<b>&gt; 0.001</b>	-0.417	0.098	0.243	0.347	<b>-0.618</b>	<b>0.010</b>	-0.277	0.281
CMC	0.029	1.000	0.771	0.103	0.371	0.497	-0.371	0.497	0.086	0.919	-0.714	0.136
Copia	0.063	0.852	-0.580	0.052	-0.364	0.246	-0.028	0.939	0.378	0.227	0.203	0.528
CR1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000
Gypsy	-0.191	0.068	-0.014	0.893	-0.187	0.074	<b>0.284</b>	<b>0.006</b>	<b>0.263</b>	<b>0.011</b>	0.149	0.156
hAT	-0.129	0.568	0.068	0.765	0.108	0.631	0.333	0.131	-0.098	0.666	-0.160	0.476
Helitron	<b>-0.782</b>	<b>0.038</b>	-0.309	0.500	0.309	0.500	0.055	0.908	-0.055	0.908	0.200	0.667
I	0.500	1.000	0.500	1.000	-0.500	1.000	0.500	1.000	-0.500	1.000	0.500	1.000
Jockey	-0.526	0.001	0.623	0.000	<b>-0.539</b>	<b>0.001</b>	<b>0.400</b>	<b>0.017</b>	-0.187	0.283	0.098	0.576
Loa	1.000	0.333	1.000	0.333	1.000	0.333	1.000	0.333	-0.500	1.000	-0.500	1.000
P	-0.018	0.969	0.273	0.554	-0.745	0.054	0.673	0.098	-0.636	0.124	-0.200	0.667
R1	-0.127	0.733	-0.236	0.514	-0.358	0.313	-0.600	0.073	-0.491	0.154	0.358	0.313
R2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-1.000	1.000	-1.000	1.000	1.000	1.000
Tc1-Mariner	0.251	0.409	0.063	0.837	0.212	0.487	<b>0.747</b>	<b>0.003</b>	<b>0.636</b>	<b>0.019</b>	<b>0.570</b>	<b>0.042</b>

## DISCUSSION GÉNÉRALE

---

Les éléments transposables sont capables de contribuer à l'augmentation de la taille des génomes et leur évolution, et de participer à la diversité génomique. Comme détaillé en introduction, les mécanismes de régulation des ET, plus précisément la voie des siARN et des piARN, majoritairement aux niveaux somatique et germinale respectivement chez *Drosophila*, sont essentiels pour le maintien et la stabilité génomique. En parallèle, la voie des siARN est également l'une des principales voies de défense immunitaire antivirale chez les insectes. Récemment, l'interaction entre les deux voies des siARN et des piARN lors d'une infection virale a été mise en évidence en présence de l'arbovirus SINV et d'un virus de drosophile, DMelSV. Ces découvertes ont permis de confirmer que les infections peuvent entraîner des modulations de l'activité des ET et améliorer les connaissances concernant les interactions hôte-virus chez les insectes (Roy et al., 2020, 2021).

L'objectif de ma thèse était d'explorer et de caractériser l'impact réciproque de la variation de l'activité des ET et de l'immunité antivirale. L'utilisation d'un panel de virus avec des génomes différents, provenant d'hôtes différents et codant un suppresseur d'ARNi, nous a permis d'étudier plus en détails les effets des infections virales sur le contrôle et l'activité des ET, ainsi que sur la défense antivirale de deux espèces d'insecte : *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans*. Bien que l'effet majoritaire des ET soit neutre ou faiblement délétère, il est maintenant bien établi que les changements induits par certains ET sont associés à des phénotypes adaptatifs. En effet, ils sont capables d'affecter la structure et l'expression des gènes à travers divers mécanismes moléculaires (Casacuberta & González, 2013; Chuong et al., 2017). Par exemple, nous savons maintenant qu'ils peuvent perturber des gènes et entraîner une résistance aux pesticides (Aminetzach et al., 2005), à des infections bactériennes (Ullastres et al., 2021), ou à des infections virales (Magwire et al., 2011). Les résultats que nous avons obtenus au cours de mes travaux de thèse font suite aux études de Roy et al. (2020, 2021) et viennent compléter les connaissances que nous avons aujourd'hui quant aux interactions hôte-virus.

Dans mes travaux de thèse, l'ensemble des infections a été réalisé par piqûre intrathoracique. Bien que les résultats obtenus précédemment par Roy et al. (2020, 2021) soient les premières preuves décrivant l'impact d'une infection virale sur les quantités de transcrits d'ET chez deux espèces *Drosophila*, les modulations observées ont été obtenues à la suite d'injections intrathoraciques. Il ne faut donc pas exclure la possibilité que les effets peuvent être

différents entre les études dues à plusieurs facteurs dont le mode d'infection, ayant déjà été mis en évidence par Mondotte and Saleh (2018). Le choix du mode d'infection par piqûre a également été motivée par l'idée de pouvoir infecter les individus de manière similaire au cours des expérimentations et donc contrôler au mieux l'infection, et par le fait que ce phénomène puisse avoir lieu dans un environnement naturel.

## 1. Réponses phénotypiques aux infections virales : variabilité selon les virus et les espèces hôtes

Dans cette thèse, nous avons confirmé qu'en plus de se répliquer chez *D. melanogaster*, les virus DCV, DXV, FHV et IIV-6 étaient capables de se répliquer au sein de son espèce sœur *D. simulans*. A une plus large échelle et en contrôlant chacune des étapes d'infection, nous avons pu découvrir que la survie des individus était variable entre espèces selon le virus à l'origine de l'infection et parfois au sein d'une même population. Phénotypiquement, une infection par un virus à ARN semble moins létale chez *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> que chez *D. simulans* Makindu, tandis que la tendance est inversée lorsque le génome viral est à ADN. Il est toutefois important de noter que nous ne testons ici qu'un seul virus à ADN et qu'il pourrait être intéressant de tester l'effet d'un plus grand nombre de virus de même nature génomique pour conclure quant à une létalité accrue en présence de virus à ADN chez *D. melanogaster*. Cependant, il apparaît que ces quatre virus se répliquent davantage chez *D. simulans* Makindu. En effet, les cinétiques de réplifications virales montrent une répllication toujours plus intense chez cette dernière et suggèrent également que *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> soit davantage capable d'éliminer FHV et DXV une fois le pic de répllication passé. Bien qu'étroitement liées et ayant divergé il y a 1.5 millions d'années, les deux espèces montrent des différences de distributions et de prévalences concernant les virus présents au sein des populations naturelles (Webster et al., 2015b, 2016). Il est donc possible qu'en lien avec l'hypothèse de la reine rouge proposée par Leigh Van Valen en 1973, ces deux espèces proches présentent des efficacités différentes d'immunité antivirale en lien avec une évolution rapide des gènes impliqués dans l'immunité.

Parmi leurs différences génétiques, nous savons également que la quantité d'ET dans le génome de *D. melanogaster* est supérieure à celle de *D. simulans*. Cette différence de répllication virale et de résistance face à l'infection pourrait ainsi être influencée par la proportion des ET occupée dans le génome de l'hôte. Les proportions plus faibles d'ET au sein du génome de *D. simulans* laisseraient moins de possibilités évolutives pour l'élaboration de défense immunitaire telles que lors d'interactions entre les réponses antivirales et le contrôle des ET. Par ailleurs, il est important de noter que l'amplification virale a été réalisée sur des

cellules de *D. melanogaster* : il n'est donc pas impossible qu'une adaptation du stock viral ait eu lieu au cours des différents passages cellulaires.

En utilisant le DCV sur des individus issus de populations naturelles, nous avons détecté la présence de variations génétiques en termes de mortalité et de réplication virale, de manière intra- et inter-spécifique. Toutefois, une corrélation négative entre les quantités de transcrits d'ET dans les tissus somatiques et la réplication de DCV au sein de ces lignées nous ont permis de proposer l'idée que les ET pouvait jouer un rôle dans la susceptibilité à l'infection. Pour aller plus loin dans cette direction, il serait intéressant de pouvoir déterminer l'impact d'infection par DXV, FHV et IIV-6 sur ces mêmes populations sauvages qui présentent une variabilité naturelle en ET. Par ailleurs, il est important de noter que les doses virales de chacun des stocks viraux étaient différentes, ce qui ne nous permet pas de conclure à une résistance plus élevée des drosophiles face à IIV-6 par rapport à DCV, DXV ou FHV par exemple.

## **2. DCV, DXV, FHV et IIV6 : génomes différents et réponses immunitaires variables**

La réponse immunitaire de *D. melanogaster* a largement été étudiée à ce jour mais peu d'études décrivent la réponse d'autres espèces de drosophiles lors d'infections virales. Nos travaux permettent d'élargir les connaissances et de montrer que *D. melanogaster* et *D. simulans*, pourtant proches phylogénétiquement, peuvent induire des réponses différentes face à l'infection par DCV, DXV, FHV ou IIV-6. En effet, les gènes associés à la fonction immunitaire semblent avoir un taux d'évolution plus rapide que d'autres gènes (Obbard et al., 2006, 2009; Sackton et al., 2007). Une éventuelle limite dans la détection de nouvelles composantes du système immunitaires chez *D. simulans* repose sur l'utilisation de gènes paralogues à ceux de *D. melanogaster* (Ekengren et al., 2001).

Outre l'activation de la voie d'ARNi en réponse aux infections virales (Kemp et al., 2013), Deddouche et al. (2008) ont suggéré qu'une voie de signalisation induite par la transcription de *Vago*, un gène antiviral, pouvait être déclenchée par la reconnaissance d'un ARNdb viral par Dcr-2. Nous décrivons ici que l'induction de ce gène ne se limite pas uniquement au virus DCV mais également aux virus DXV et FHV, et plus faiblement à IIV-6. L'efficacité du système immunitaire serait ainsi renforcée par l'activation de divers gènes, de manière complémentaire à la voie d'ARNi, principale voie antivirale chez les insectes.

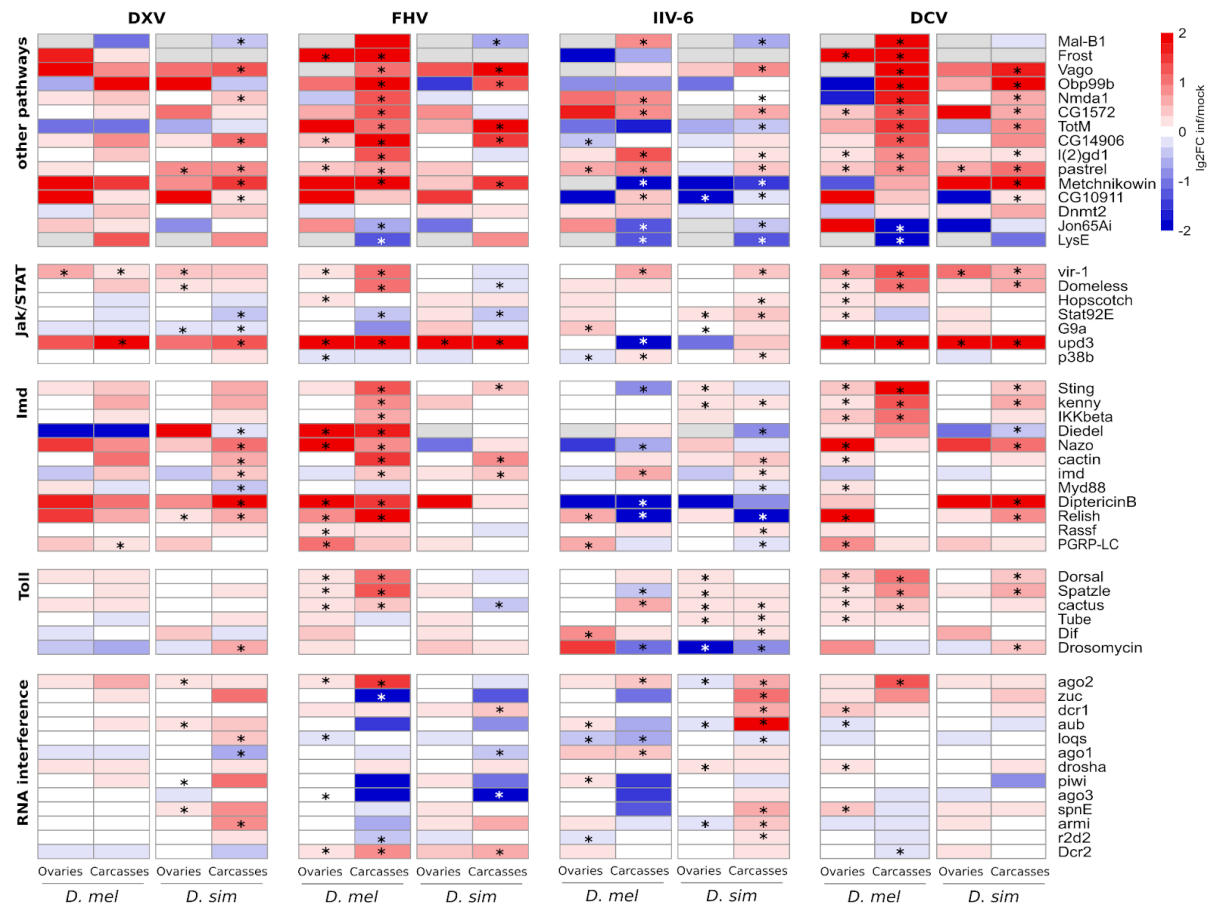
La voie Toll a été décrite comme étant impliquée dans la réponse aux virus DCV, FHV et DXV (Ferreira et al., 2014; Zambon et al., 2005). Nos résultats obtenus avec DCV et FHV sont en accord avec leurs observations chez *D. melanogaster*, avec une action de la voie aussi



bien dans les tissus somatiques que germinaux. Chez *D. simulans*, aucun effet des deux virus n'est observé dans les ovaires. La voie semble spécifique aux carcasses de *D. simulans* avec une expression à la suite d'une infection par DCV, et sous-expression avec FHV. Ces observations peuvent être reliées avec les phénomènes d'évolutions précédemment évoquées, suggérant que *D. simulans* n'ait pas évolué de la même manière pour faire intervenir cette voie en soutien à la voie ARNi dans les ovaires. Concernant DXV, nous n'avons pas détecté d'activation spécifique de la voie Toll chez *D. melanogaster*. Chez *D. simulans*, l'activation de la voie Toll a été détectée mais reste faible, notamment en comparaison avec les gènes activés par les autres voies. Bien que ces résultats ne soient pas en accord avec le rôle important de la voie Toll décrit par Zambon et al. (2005), l'absence d'activation de cette voie dans nos données peut être due à des différences de mode d'injection (injection contre piqûre) et de temps d'incubation. De plus, il semblerait que les charges virales inoculées ne soient pas comparables : tandis que nous observons une mortalité des individus entre huit et douze jours, les auteurs décrivent le décès des mouches infectées entre vingt et vingt-cinq jours après infection. Outre ces différences, il serait possible que la voie Toll puisse venir en soutien à la voie ARNi lors d'une infection par DXV mais que nous n'ayons pas détecté cet effet dû à une mortalité beaucoup plus rapide, ne permettant pas à la voie de s'activer. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de pouvoir infecter des individus mutant de la voie Toll selon le même protocole et déterminer s'ils présentent une sensibilité plus élevée en réponse à l'infection par DXV, selon différentes charges virales. Enfin, l'activation de la voie Toll détectée en réponse à l'infection à IIV-6 nous permet de rajouter ce virus à la liste de virus ciblés par cette voie. Toutefois, West et al. (2019) décrivent que IIV-6 est capable d'inhiber les voies Toll et Imd, ce qui expliquerait le profil très variable de régulation à la hausse ou à la baisse observée pour les gènes de cette voie.

Une hétérogénéité est également présente parmi les gènes de la voie Jak/STAT en présence de IIV-6. Initialement décrite comme non induite par Doster et al. (2005) et Kemp et al. (2013) lors d'infection par IIV-6, West et Silvermann (2018) ont récemment démontré qu'en réponse à une infection par IIV-6, l'hôte *Drosophila* était capable d'induire une voie dépendante de *p38b* qui activerait ainsi la voie Jak/STAT. Ici, nos données suggèrent que l'induction de cette voie serait spécifique aux tissus somatiques chez les deux espèces, à travers l'expression de *p38b*. De plus, *vir-1* est induit lors d'infection par DCV chez les deux espèces et uniquement chez *D. melanogaster* avec FHV, ce qui est en accord avec plusieurs études (Deddouche et al., 2008; Dostert et al., 2005; Hedges & Johnson, 2008). Ici, nous montrons que DXV est également capable d'induire *vir-1* bien que cela n'ait pas été observé par Kemp et al. (2013).

Toutefois, leurs analyses ont été réalisées par injection intrathoracique, et l'infection provoquée par DXV est persistante et non aiguë comme nos travaux. Enfin, la détection de l'activation de gènes codants pour les cytokines *Unpaired* (tel que *upd3*), capables de se lier au récepteur de Jak/STAT, nous permet de montrer une activation de cette voie avec DCV, DXV et FHV, et suggère un rôle important de ces gènes en réponse à des virus à ARN. Pouvoir tester la sensibilité à l'infection chez des mutants du gène *vir-1*, *p38b* ou *upd3* nous permettrait de comprendre les mécanismes antiviraux induisant la réponse antivirale de la voie Jak/STAT.



**Figure 18 : Heatmap des valeurs de log<sub>2</sub> Fold Change entre les conditions infectées et contrôles (mock) pour les gènes impliqués dans les voies immunitaires chez *D. melanogaster* et *D. simulans*.**  
 Les étoiles indiquent les valeurs p significatives (valeurs p ajustées DESeq2 < 0,05). Pour les cases grises, les valeurs p ajustées n'ont pas pu être calculées.

Chez *Drosophila*, d'autres mécanismes cellulaires ont également été décrits comme des composantes importantes de la réponse immunitaire antivirale. En effet, Merkling et al. (2015) ont démontré que les gènes de la réponse au choc thermique étaient d'importants composants face aux infections par des virus à ARN, comme avec DCV chez *D. melanogaster*. Nous détectons l'induction de cette réponse uniquement chez *D. simulans* à la suite d'infection par DXV et FHV. Étant un processus évolutif ancien et hautement conservé, il est possible de suggérer que la réponse au choc thermique soit encore favorisée chez *D. simulans* en réponse à

des infections par piqûre et par des virus à ARN. Cette induction pourrait également être le reflet d'un effet 'maladaptatif' aux stress cellulaires par *D. simulans*. Une autre de leurs études propose que la régulation épigénétique, à travers le modificateur épigénétique *G9a*, permettrait d'atténuer les réponses induites par la voie Jak/STAT face à des virus à ARN (Merkling et al., 2015). Il semblerait que l'induction de *G9a* ne soit pas nécessaire face à l'infection par piqûre avec des virus à ARN. Toutefois, nos données suggèrent que *G9a* puisse intervenir dans les tissus germinaux en réponse à un virus à ADN, éventuellement pour prévenir l'immunopathologie comme évoqué par Merkling et al. (2015) et protéger le matériel génétique héréditaire.

Les différences et changements dans l'expression des gènes en réponse à une infection ne sont toutefois pas toujours liés aux défenses immunitaires de l'hôte mais peuvent être modulés par le virus lui-même. Il est donc important de ne pas exclure la capacité des virus à échapper aux réponses antivirales, notamment à travers l'utilisation de VSR, ou à manipuler l'hôte, tel que l'environnement cellulaire pour sa propre réplication. Dans ce sens, pour l'ensemble des virus étudiés et en se basant sur les données déjà obtenues, il serait très intéressant de pouvoir étudier par RT-qPCR l'expression de certains gènes spécifiques aux différentes voies pour déterminer s'il existe une dynamique de réponse antivirale et/ou si une réponse en relais existe entre les différentes voies. Cette dernière hypothèse peut être en lien avec la capacité de ces virus à coder des suppresseurs de la voie d'ARNi. Il serait intéressant d'observer comment la voie d'ARNi est activée à la suite de l'entrée d'un virus à ARNdb (DXV), le substrat pour la voie des siARN étant directement présent dans la cellule, et par des virus à ARNsb (DCV et FHV) et ADN (IIV-6), qui doivent tout d'abord se répliquer pour fournir à la voie des siARN les substrats nécessaires à la production de siARN dérivés de virus (visiARN).

De manière générale, nous ne pouvons pas exclure le fait que nos données ont été obtenues à des pas de temps différents par rapport aux autres études évoquées, avec des concentrations virales inoculées et des modes d'infection différents, et que l'absence de détection d'induction de gènes décrits comme essentielle peut avoir eu lieu en amont ou en aval de nos analyses.

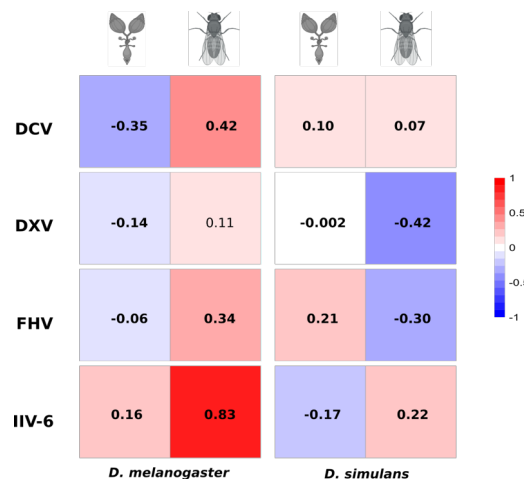
Finalement, de nombreux gènes en plus de ceux impliqués dans la voie antivirale principale d'ARNi ont des activités multiples dans la réponse immunitaire, capable d'agir face à divers pathogènes aussi bien bactériens que viraux. De ce fait, la mise en place de suppresseurs antiviraux de la part des virus pour bloquer la voie d'ARNi pourrait constituer une "adaptation"

favorisant la réplication et la propagation virale au sein de l'hôte. Autrement dit, l'activation d'un ensemble de voies immunitaires par l'hôte pourrait être la conséquence de l'évitement du système immunitaire établi par les virus.

### 3. Modulation des quantités de transcrits d'ET par les infections virales

D'une manière générale, nous pouvons nous demander dans quelle mesure les interactions peuvent jouer un rôle dans l'évolution des réponses immunitaires, en s'interrogeant sur les questions suivantes : (i) quelle est l'influence générale des infections sur les quantités de transcrits en ET, (ii) ces modulations peuvent-elles être similaires entre espèces, tissu ou virus, et (iii) comment ces variations pourraient influencer l'évolution des interactions hôte-virus-ET.

Pour étudier les interactions entre *Drosophila*, les éléments transposables et les virus, nous avons analysé les modulations sur les quantités de transcrits d'ET au sein des ovaires d'une part, et du reste du corps de la drosophile d'autre part. En effet, la voie des piARN est majoritairement active au niveau de la lignée germinale tandis que la voie des siARN est dédiée au contrôle somatique des ET chez les drosophiles. De plus, bien que l'analyse soit faite à des pas de temps différents entre virus, chaque analyse a été réalisée au pic de réplication virale : cela nous permet de comparer l'effet qu'une infection, en phase exponentielle, puisse avoir dans cette interaction tripartite, entre les différents virus étudiés.



**Figure 19 : Heatmap des valeurs moyennes de Log2 Fold Change de toutes les familles d'ET.**

La valeur indiquée correspond au log<sub>2</sub> Fold Change moyen entre les conditions infectées et les conditions contrôles (mock). Les valeurs sont représentées pour les virus DCV, DXV, FHV et IIV-6 pour *D. melanogaster* (à gauche) et *D. simulans* (à droite), ainsi que par tissu (ovaires et carcasses). Les valeurs significatives sont indiquées en gras.

A travers l'analyse de l'abondance en ET dans le transcriptome, nous avons pu contribuer à une meilleure compréhension de l'impact de diverses infections virales sur *Drosophila* de manière spécifique au tissu et à l'espèce (**Figure 19**). Ces découvertes décrivent

que les virus modulent de différentes façons les transcrits d'ET, ce qui pourrait avoir un impact sur la survie des individus et sur la réponse à l'infection. Nous apportons ici d'autres preuves d'un impact des infections virales sur l'activité transcriptionnelle des ET, dépendant du type de virus, de l'hôte et du contenu en ET de l'hôte. En effet, indépendamment du tissu et de l'espèce hôte, nous avons observé des modulations de la quantité de transcrits d'ET lors d'infections virales. Ces résultats corroborent les précédents résultats utilisant d'autres virus et renforcent la nécessité d'identifier les facteurs pouvant moduler les réponses des insectes, aussi en termes de régulation des ET qu'immunitaires, dans un contexte d'infection virale.

Nos résultats conduisent à un constat complexe : aucun schéma global n'a pu être établi chez *D. simulans* mais des réponses similaires sont observées chez *D. melanogaster*. En effet, *D. melanogaster* présente une augmentation globale des quantités de transcrits dans les carcasses et une diminution dans les ovaires à la suite d'une infection par DCV, DXV ou FHV. Lors d'une infection par IIV-6, les quantités sont augmentées dans les deux tissus. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les réponses observées. Le sens de modulation observé pourrait être dépendant du type de virus, c'est-à-dire selon que la nature des génomes (à ARN ou à ADN), et du tissu. Les études réalisées avec SINV sur les deux mêmes lignées *D. melanogaster* w<sup>1118</sup> et *D. simulans* Makindu (Roy et al., 2020), montraient une diminution dans les carcasses : cet effet inverse par rapport à nos analyses pourrait être dû aux caractéristiques du virus. Responsable d'une maladie transmise entre l'humain et l'animal (principalement la faune aviaire) par le biais de moustiques principalement (*i. e.* zoonose), il serait envisageable que les virus portés par des vecteurs puissent agir de manière spécifique, minimisant peut-être les perturbations pouvant être causées par les virus à l'hôte avant d'atteindre l'espèce cible à infecter. Il est donc envisageable que cette capacité de transmission vectorielle puisse entraîner des réponses différentes en mobilisant le système de régulation directement aux tissus somatiques, site d'infection, permettant ainsi une meilleure réponse immunitaire de manière tissu-spécifique.

A une plus large échelle, il ne semble pas surprenant d'observer des différences entre les deux espèces sachant que le génotype peut être source de variabilité concernant l'activité des ET (Anderson et al., 2019; Eugénio et al., 2023; Signor, 2020; Z. Wang et al., 2022). Une explication possible pourrait là encore être due à l'éventuelle adaptation du stock viral aux cellules de *D. melanogaster* en culture utilisées pour amplifier le virus. De plus, la pression de sélection étant plus forte dans les gonades, une régulation accrue pourrait avoir lieu dans les tissus germinaux permettant d'éliminer les mutations et protéger le matériel génétique qui sera

transmis à la descendance. Par ailleurs et bien que cette hypothèse reste à vérifier, la quantité d'ET plus importante chez *D. melanogaster* pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'infection et la régulation des ET en comparaison avec *D. simulans*.

Une limite de notre analyse pour IIV-6 est qu'elle ne permet pas d'isoler les ET provenant de l'hôte lui-même ou du virus pour en déterminer les effets respectifs. En effet, il a été décrit que le génome du IIV-6 contient des ET (Loiseau et al., 2021). Il est donc probable que la forte augmentation des quantités de transcrits d'ET observée à la suite d'une infection par IIV-6 puisse être liée à l'apport d'ET d'origine virale. Il serait ainsi intéressant de pouvoir étudier le contenu en ET des stocks viraux du IIV-6 pour déterminer si et comment la modulation observée chez l'hôte en serait modifiée. Toutefois, la part d'ET apportée par le virus est bien présente et nous observons une modulation des quantités de transcrits en réponse à l'infection. En émettant l'hypothèse d'un rôle néfaste des ET lorsqu'ils se retrouvent en quantité trop élevée, cela pourrait expliquer d'une part l'augmentation importante de transcrits d'ET avec IIV-6 chez *D. melanogaster*, qui ne pourrait pas réguler de manière suffisamment efficace les transcrits d'ET, et d'autre part une modulation plus faible chez *D. simulans* qui contient initialement moins d'ET permettant d'avoir des ressources suffisantes pour contrôler les ET. Dans ce sens mais bien que nos données ne nous permettent pas de tester ces informations, nous pourrions suggérer qu'une proportion élevée de transcrits d'ET deviendrait un fardeau transcriptionnel, entraînant une consommation importante des ressources moléculaires et énergétiques. Au regard des autres virus, les différences de modulations peuvent être dues à un temps d'incubation plus long (12 jours post-infections (dpi)) ayant toutefois été nécessaire pour observer les impacts physiologiques de l'infection par IIV-6 chez les deux espèces.

Chez *D. melanogaster*, le log<sub>2</sub>FC moyen de toutes les familles d'ET dans les carcasses après une infection par un virus à ARN est plus élevé avec le DCV, puis FHV et enfin DXV. Le DCV est un pathogène de *D. melanogaster* présentant une longue histoire co-évolutive avec son hôte (Webster et al., 2015b), le FHV est un virus d'insectes ayant la capacité d'infecter une large gamme d'hôte (Dasgupta et al., 2007), et DXV est quant à lui considéré comme un contaminant de culture cellulaire (Teninges et al., 1979). Dans ce sens, il est envisageable que par des interactions hôte-pathogène plus étroites, l'impact de l'infection sur les quantités de transcrits d'ET soit plus important avec le DCV. Chez *D. melanogaster*, nous détectons une modulation plus importante dans les carcasses que dans les ovaires. Le corps gras, situé au niveau du thorax des drosophiles et ayant des fonctions équivalentes à celle du foie des mammifères (Padmanabha & Baker, 2014), représente un tissu cible de DCV, DXV et FHV et

l'iridescence de IIV-6 nous permet de suggérer que ce dernier s'y trouve également. Le tropisme de ces virus, c'est-à-dire l'ensemble des cellules cibles, pourrait également expliquer les modulations plus importantes observées dans les carcasses que dans les ovaires (Galiana-Arnoux et al., 2006; Merklings & van Rij, 2015b; Zamboni et al., 2006). Concernant la diminution globale des transcrits d'ET observés dans les ovaires à la suite d'infection par ces trois virus, un scénario de protection des ovaires peut également être envisagé et l'analyse du répertoire des petits ARNs nous permettra d'analyser plus en détail la réponse de l'hôte.

Chez *D. simulans*, les résultats obtenus montrent des patterns contrastés. La quantité d'ET étant globalement plus faible chez cette espèce, il pourrait être envisageable de proposer que son système de régulation des ET ne soit pas adapté à un type de virus en particulier mais soit impacté de manière aléatoire face à l'infection virale. Cependant, cette hypothèse reste très théorique car peu de données portant sur cette espèce avec les virus de nos études sont à ce jour disponibles.

Aussi bien pour *D. melanogaster* que *D. simulans*, il pourrait être intéressant d'étudier par RT-qPCR si une dynamique d'expression des transcrits d'ET a lieu, si certaines familles d'ET sont régulés à la hausse dès l'infection pour être par la suite sous-régulé et remplacé par d'autres familles d'ET au moment de l'augmentation de la réplication virale. Récemment, il a notamment été proposé que la sur-expression d'ET différenciellement exprimés à la suite d'une infection chez l'humain et la souris pouvait faire partie d'une réponse de défense précoce et conservée de l'hôte (Macchietto et al., 2020).

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons également analysé le répertoire des petits ARN afin de comprendre comment la machinerie d'ARNi permettant le contrôle des ET était affectée par l'infection par le DCV. Outre les modulations globales des quantités de transcrits d'ET, nous avons pu observer que les voies des siARN et des piARN ciblant les ET étaient toujours fonctionnelles. De manière surprenante, nous avons montré que les quantités de siARN et de piARN dérivés d'ET étaient augmentées dans les deux espèces *Drosophila*, aussi bien dans les carcasses que dans les ovaires. En effet, lors d'une augmentation des quantités de transcrits d'ET, il serait attendu d'observer une absence ou une diminution des quantités de petits ARN dérivés d'ET. Toutefois, nous pourrions expliquer cette augmentation globale dans les carcasses par la présence du VSR 1A qui empêche la voie des siARN de cliver les substrats viraux d'ARNdb, ce qui pourrait limiter le nombre de molécules disponibles pour réguler les ET. De plus, il pourrait être envisageable que, étant réduite par le VSR, la réponse de la voie

d'ARNi ait peut être lieu dans les ovaires dans un premier temps, ne permettant pas un contrôle assez fort au moment du pic de réplication dans les carcasses.

La présence d'un nombre important de piARN dérivé d'ET dans les carcasses chez *D. melanogaster* et *D. simulans* pourrait également être expliqué par la présence du VSR qui permet de protéger les ARNdb viraux de la coupure par *Dcr-2*, conduisant au recrutement de piARN dans les tissus somatiques. En effet, plusieurs études décrivent la présence de piARN somatiques de manière spécifique aux tissus chez *D. melanogaster* tels que dans le corps gras ou le cerveau (Jones et al., 2008; Perrat et al., 2013). Parmi les Arthropodes, plusieurs études décrivent également la présence de piARN somatiques ciblant les virus ayant pour certains une activité antivirale (Lewis et al., 2018; Miesen et al., 2016; Morazzani et al., 2012). Cependant, les études de Petit et al. (2016) ne montrent pas de piARN dérivés de DCV au sein des drosophiles. Il reste important de noter que leurs analyses ont été réalisées deux jours après injection contre quatre jours après piqûre dans nos travaux. L'absence de piARN dérivés de virus (vpiARN) à deux jours après infection, puis la détection au jour quatre après infection laisse penser que la voie des siARN serait mise en place par l'hôte dès l'entrée du virus dans les cellules. Par la suite, la présence de quantité plus importante de vpiARN par rapport aux siARN dérivés de virus (vsiARN) dans nos données suggère qu'une fois le VSR présent en grande quantité, cela empêcherait le clivage de l'ARNdb par *Dcr-2*. Ceci mènerait à une coopération et une compensation de la réponse antivirale des siARN réduites, par la voie des piARN. De ce fait, une analyse à deux jours après infection ne laisserait pas assez de temps pour que cette compensation ait lieu. Dans un scénario évolutif, tandis que les ET divergent pour échapper à leur inhibition et que l'hôte développe des mécanismes de régulation de manière spécifique à la séquence, il ne semblerait pas surprenant que de nouveaux processus de défense apparaissent afin de préserver l'équilibre entre ces deux acteurs. Par exemple, Carducci et al. (2021) décrivent que l'accumulation d'ET à travers une mobilisation accrue à un moment spécifique chez le triton *Cynops orientalis*, a conduit à un renforcement des mécanismes d'inhibition des ET en réponse à des quantités d'ET élevées. Dans une dynamique de course aux armements entre ET et machinerie d'ARNi, il serait donc envisageable qu'en réponse aux infections virales, et peut être davantage par la présence d'un suppresseur de la voie d'ARNi, la voie des piARN ait évolué pour venir en soutien à la voie des siARN dans les tissus somatiques. Cette idée pourrait être supportée par le fait que la production de vsiARN initiée par *Dcr-2* soit négativement corrélée avec l'accumulation d'ARN viral dans les cellules infectées, comme il a été décrit par Gammon et Mello (2015). En utilisant différents mutants pour la voie d'ARNi, Zambon et al. (2006) avait notamment mis en évidence que les titres



viraux étaient plus élevés chez les mouches mutantes, les individus sauvages infectés présentant des quantités similaires plus tardivement que ceux mutés après l'infection.

Un autre scénario plus réaliste pourrait toutefois être envisagé concernant la détection importante de piARN. En effet, nous détectons un pic d'ARN à 30 nt. L'analyse des données séquençages a permis de montrer que ce pic à 30 nt correspondaient à des ARN ribosomiques (ARNr), des produits de dégradation, qui sont extrêmement abondant dans les cellules, comme décrit par Grentzinger et al. (2020). Cette abondance d'ARNr pourrait être lié à une quantité importante de matériel biologique lors de l'extraction des petits ARN (30 carcasses de drosophiles). Il en résulterait que ces petits ARNs correspondent majoritairement à du matériel aspécifique, et seule une faible proportion représenterait des vpiARN ou, tout comme Petit et al. (2016) aucun vpiARN. Dans ce sens, cela suggère que des produits aspécifiques puissent également se trouver parmi les autres tailles de petits ARN.

Très prochainement, l'étude des données de petits ARN obtenues à la suite d'infection par DXV, FHV et IIV-6 en cours de séquençage pourront nous permettre de déterminer comment ces virus, en plus d'impacter l'activité transcriptionnelle des ET, peuvent affecter la voie des piARN et des siARN. Par exemple, nous analyserons les petits ARN selon leur taille (siARN : 21 nt, piARN : 23-30nt), en étudiant les transcrits à l'origine de leur production (ET ou virus) et si leurs quantités sont modulées à la suite de l'infection (sur-expression, sous-expression ou aucun changement). En lien avec nos données actuelles, ces futurs résultats nous permettront, nous l'espérons, de pouvoir mettre en lumière la nécessité d'étudier davantage les interactions hôte-pathogène-ET qui peuvent impacter la diversité génétique et l'évolution des génomes.

#### **4. Modulation de la réplication virale par les éléments transposables**

Afin d'étudier les effets réciproques du contrôle des ET et de la réponse antivirale, une partie de mes travaux de thèse a tout d'abord consisté à déterminer si et comment les ET pouvaient modifier la réponse à l'infection et la réplication du virus. L'analyse de l'impact de quantité variable d'ET a été réalisée de manière plus approfondie avec le DCV dans un premier temps. En utilisant une souche transgénique sophistiquée de *D. melanogaster*, nous avons déterminé comment la réplication du DCV pouvait être affectée par des génotypes hôtes identiques mais présentant des quantités différentes d'ET. En effet, cette souche présente la particularité d'être mutée pour le gène *piwi* de manière thermo-inductible (également appelé

*shift*). Ainsi, en induisant l'activité des ET par l'inactivation du gène, cela a permis d'obtenir différentes drosophiles ayant accumulé de nouvelles insertions d'ET au cours des générations (Barckmann et al., 2018).

Nous avons montré que la présence d'une quantité plus importante de transcrits d'ET au sein de l'hôte permettait de réduire la réplication virale de DCV. En effet, ces premiers résultats ont été obtenus à l'aide d'une lignée présentant un nombre de transcrits d'ET des familles *ZAM* et *gtwin* plus important que la lignée de référence (Barckmann et al., 2018). La quantification par RT-qPCR des quantités de transcrits dans les deux souches S0 et S70, celle de référence et celle ayant subi soixante-dix générations de shift, a permis de montrer que ces deux familles d'ET ont été augmentées autour du pic de réplication virale. Dans ce sens, il serait intéressant de déterminer si cette augmentation est spécifique aux familles présentant des transcrits d'ET plus élevés, bien qu'il soit très complexe de pouvoir élaborer un modèle biologique aussi sophistiqué. Enfin, nous avons également produit des données de séquençage des petits ARN provenant d'individus transgéniques (S0 et S70) infectés par le DCV. Dès la réception de ces données, nous pourrions étudier en détail comment la présence d'un nombre plus important de transcrits d'ET peut agir sur la réponse immunitaire de l'hôte en réponse à une infection virale. Il sera intéressant d'analyser si la présence d'une quantité plus importante de transcrits d'ET (i) affecte la machinerie de régulation des transcrits d'ET dans ce contexte d'infection virale et (ii) si elle permet d'aider à contrer la présence du suppresseur viral 1A et limiter cette protection virale contre la voie d'ARNi.

Ces premiers résultats nous ont ouvert la voie pour étudier comment les ET peuvent contribuer dans la réponse antivirale lors d'une infection virale. En analysant le taux de mortalité avec DXV, FHV et IIV-6, nous avons détecté une survie significativement accrue lors de l'infection par DXV et IIV-6 chez les individus de la lignée S70 en comparaison avec la lignée de référence S0. Le même scénario qu'avec DCV pourrait être envisagé avec ces deux virus : les quantités de transcrits d'ET seraient capables d'interférer dans la réponse antivirale en permettant de réduire les effets du VSR, mais également en mobilisant différentes voies immunitaires comme nous le décrirons plus loin. Par exemple, Merenciano & González (2023) ont récemment démontré qu'une insertion particulière d'un ET avait un effet sur le niveau d'expression d'un gène impliqué dans la réponse immunitaire face à une infection bactérienne. Toutefois, nos données ne nous permettent pas d'observer cette information, n'ayant pas accès au polymorphisme d'insertion. Il serait par exemple intéressant de pouvoir analyser parmi les gènes immunitaires fortement exprimés à la suite de l'infection si des familles d'ET se

retrouvent de manière abondante près de gènes de l'immunité de l'hôte. Dans ce sens, il pourrait également être envisageable qu'une quantité plus abondante de transcrits d'ET permette de recruter et d'activer un nombre plus important de gènes impliqués dans la réponse à l'infection, ce qui pourrait avoir une conséquence immédiate sur les défenses de l'hôte.

L'observation des taux de mortalité à la suite d'infection par FHV semblent montrer une meilleure survie de la lignée S70 uniquement jusqu'à 25 jours après l'infection. Il est tentant de suggérer que l'effet des ET lors d'une infection par FHV puisse être bénéfique dans les premiers jours suivant l'infection mais que le virus finisse par empêcher cette protection accrue. Toutefois, les différentes lignées transgéniques ne présentent pas de mortalité significativement différente lorsque l'on analyse les courbes de survie jusqu'au 50<sup>ème</sup> jours. Il semblerait donc que les différentes quantités de transcrits d'ET n'aient pas d'impact sur la réponse à l'infection par FHV. Comment se traduit cette absence d'effet 'bénéfique' avec FHV ? Ce changement de situation en faveur du virus pourrait se faire par le biais du VSR B2 qu'il code, décrit comme étant un puissant suppresseur de la voie d'ARNi et ayant évolué comme un mécanisme d'évasion indépendant de l'hôte (H. Li et al., 2002).

En conclusion, l'intégration de différentes échelles d'études aussi bien au niveau des ET (familles, superfamilles ou classes d'ET), des virus (ARNsb, ARNdb, ADN ; hôte naturel ou non, etc.) que de *Drosophila* (intra- et inter-espèce) et des tissus (germinaux, somatiques) étudiés font la richesse et la complexité de mon travail de thèse et aura permis une compréhension plus général des processus impliqués lors des interactions hôte-ET-virus.

Pour aller plus loin, ces travaux de thèse pourraient s'élargir à (i) l'étude de ces mêmes interactions sur les ET dans un contexte de co-infections, par exemple avec la bactérie *Wolbachia* capable d'affecter le taux de transposition du rétrotransposon *gypsy* (Touret et al., 2014), (ii) à l'impact générationnel que de telles modulations peuvent avoir sur la descendance de parents infectés, et (iii) à l'analyse des interactions aux seins de vecteurs de maladies tel que les moustiques ou les tiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Agaisse, H., Petersen, U.-M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., & Perrimon, N. (2003). Signaling Role of Hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. *Developmental Cell*, 5(3), 441-450. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00244-2)
- Ahmed, I., Sarazin, A., Bowler, C., Colot, V., & Quesneville, H. (2011). Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 6919-6931. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr324>
- Akhunov, E. D., Goodyear, A. W., Geng, S., Qi, L.-L., Echalier, B., Gill, B. S., Miftahudin, Gustafson, J. P., Lazo, G., Chao, S., Anderson, O. D., Linkiewicz, A. M., Dubcovsky, J., Rota, M. L., Sorrells, M. E., Zhang, D., Nguyen, H. T., Kalavacharla, V., Hossain, K., ... Dvorak, J. (2003). The Organization and Rate of Evolution of Wheat Genomes Are Correlated With Recombination Rates Along Chromosome Arms. *Genome Research*, 13(5), 753-763. <https://doi.org/10.1101/gr.808603>
- Akkouche, A., Grentzinger, T., Fablet, M., Armenise, C., Burlet, N., Braman, V., Chambeyron, S., & Vieira, C. (2013). Maternally deposited germline piRNAs silence the *tirant* retrotransposon in somatic cells. *EMBO Reports*, 14(5), 458-464. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.38>
- Akkouche, A., Rebollo, R., Burlet, N., Esnault, C., Martinez, S., Viginier, B., Terzian, C., Vieira, C., & Fablet, M. (2012). Tirant, a Newly Discovered Active Endogenous Retrovirus in *Drosophila simulans*. *Journal of Virology*, 86(7), 3675-3681. <https://doi.org/10.1128/JVI.07146-11>
- Ali, A., Han, K., & Liang, P. (2021). Role of Transposable Elements in Gene Regulation in the Human Genome. *Life*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/life11020118>
- Aliyari, R., Wu, Q., Li, H.-W., Wang, X.-H., Li, F., Green, L. D., Han, C. S., Li, W.-X., & Ding, S.-W. (2008). Mechanism of Induction and Suppression of Antiviral Immunity Directed by Virus-Derived Small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe*, 4(4), 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.001>
- Almeida, M. V., Vernaz, G., Putman, A. L. K., & Miska, E. A. (2022). Taming transposable elements in vertebrates: From epigenetic silencing to domestication. *Trends in Genetics*, 38(6), 529-553. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.009>
- Almojil, D., Bourgeois, Y., Falis, M., Hariyani, I., Wilcox, J., & Boissinot, S. (2021). The Structural, Functional and Evolutionary Impact of Transposable Elements in Eukaryotes. *Genes*, 12(6), 918. <https://doi.org/10.3390/genes12060918>
- Aminetzach, Y. T., Macpherson, J. M., & Petrov, D. A. (2005). Pesticide Resistance via Transposition-Mediated Adaptive Gene Truncation in *Drosophila*. *Science*, 309(5735), 764-767. <https://doi.org/10.1126/science.1112699>
- Anderson, S. N., Stitzer, M. C., Zhou, P., Ross-Ibarra, J., Hirsch, C. D., & Springer, N. M. (2019). Dynamic Patterns of Transcript Abundance of Transposable Element Families in Maize. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9(11), 3673-3682. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400431>

- Antoniewski, C. (2014). Computing siRNA and piRNA Overlap Signatures. In A. Werner (Éd.), *Animal Endo-SiRNAs* (Vol. 1173, p. 135-146). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0931-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0931-5_12)
- Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rozovsky, Y. M., & Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*, *11*(13), 1017-1027. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00299-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00299-8)
- Arbouzova, N. I., & Zeidler, M. P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila* : Insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development*, *133*(14), 2605-2616. <https://doi.org/10.1242/dev.02411>
- Arkhipova, I. R. (2017). Using bioinformatic and phylogenetic approaches to classify transposable elements and understand their complex evolutionary histories. *Mobile DNA*, *8*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0103-2>
- Arkhipova, I. R. (2018). Neutral Theory, Transposable Elements, and Eukaryotic Genome Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1332-1337. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy083>
- Arnold, P. A., Johnson, K. N., & White, C. R. (2013). Physiological and metabolic consequences of viral infection in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, jeb.088138. <https://doi.org/10.1242/jeb.088138>
- Asgari, S. (2013). MicroRNA functions in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(4), 388-397. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.005>
- Asgari, S., & Johnson, K. N. (Éds.). (2010). *Insect virology*. Caister Academic.
- Aziz, R. K., Breitbart, M., & Edwards, R. A. (2010). Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature. *Nucleic Acids Research*, *38*(13), 4207-4217. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq140>
- Babaiian, A., Romanish, M. T., Gagnier, L., Kuo, L. Y., Karimi, M. M., Steidl, C., & Mager, D. L. (2016). Onco-exaptation of an endogenous retroviral LTR drives IRF5 expression in Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, *35*(19), Article 19. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.308>
- Bang, I. S. (2019). JAK/STAT signaling in insect innate immunity. *Entomological Research*, *49*(8), 339-353. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12384>
- Barckmann, B., El-Barouk, M., Péliisson, A., Mugat, B., Li, B., Franckhauser, C., Fiston Lavier, A.-S., Mirouze, M., Fablet, M., & Chambeyron, S. (2018). The somatic piRNA pathway controls germline transposition over generations. *Nucleic Acids Research*, *46*(18), 9524-9536. <https://doi.org/10.1093/nar/gky761>
- Barray, S., & Devauchelle, G. (1987). Protein synthesis in cells infected by Chilo iridescent virus : Evidence for temporal control of three classes of induced polypeptides. *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, *138*(2), 253-261. [https://doi.org/10.1016/S0769-2617\(87\)80009-6](https://doi.org/10.1016/S0769-2617(87)80009-6)
- Baxter, R. H. G., Contet, A., & Krueger, K. (2017). Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. *Biochemistry*, *56*(7), 907-918. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00870>
- Beek, M. van den, Silva, B. da, Pouch, J., Chaouche, M. el amine A., Carré, C., & Antoniewski, C. (2018). Dual-layer transposon repression in heads of *Drosophila melanogaster*. *RNA*,

- 24(12), 1749-1760. <https://doi.org/10.1261/rna.067173.118>
- Begun, D. J., & Aquadro, C. F. (1992). Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature*, 356(6369), Article 6369. <https://doi.org/10.1038/356519a0>
- Bergman, P., Seyedoleslami Esfahani, S., & Engström, Y. (2017). *Drosophila* as a Model for Human Diseases—Focus on Innate Immunity in Barrier Epithelia. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 121, p. 29-81). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.002>
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), Article 6818. <https://doi.org/10.1038/35053110>
- Berry, B., Deddouche, S., Kirschner, D., Imler, J.-L., & Antoniewski, C. (2009). Viral Suppressors of RNA Silencing Hinder Exogenous and Endogenous Small RNA Pathways in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 4(6), e5866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005866>
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W., & Darnell, J. E. (2001). A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9563-9568. <https://doi.org/10.1073/pnas.171302098>
- Bewick, A. J., Vogel, K. J., Moore, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Evolution of DNA Methylation across Insects. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 654-665. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw264>
- Bhattacharya, T., Newton, I. L. G., & Hardy, R. W. (2017). *Wolbachia* elevates host methyltransferase expression to block an RNA virus early during infection. *PLOS Pathogens*, 13(6), e1006427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006427>
- Biémont, C. (2010). A Brief History of the Status of Transposable Elements : From Junk DNA to Major Players in Evolution. *Genetics*, 186(4), 1085-1093. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.124180>
- Biémont, C., & Vieira, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443(7111), 521-524. <https://doi.org/10.1038/443521a>
- Biessmann, H., Valgeirsdottir, K., Lofsky, A., Chin, C., Ginther, B., Levis, R. W., & Pardue, M.-L. (1992). HeT-A, a Transposable Element Specifically Involved in “Healing” Broken Chromosome Ends in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3910-3918. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.9.3910-3918.1992>
- Bilak, H., Tauszig-Delamasure, S., & Imler, J.-L. (2003). Toll and Toll-like receptors in *Drosophila*. *Biochemical Society Transactions*, 31(3), 648-651. <https://doi.org/10.1042/bst0310648>
- Birghan, C., Mundt, E., & Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser–Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *The EMBO Journal*, 19(1), 114-123. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.114>
- Blair, C. D., Olson, K. E., & Bonizzoni, M. (2019). The Widespread Occurrence and Potential Biological Roles of Endogenous Viral Elements in Insect Genomes. *Current Issues in Molecular Biology*, 34(1), Article 1. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.013>
- Bonning, B. C. (2019). The Insect Virome : Opportunities and Challenges. *Current Issues in*

- Molecular Biology*, 34(1), Article 1. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.001>
- Bonning, B. C., & Miller, W. A. (2010). Dicistroviruses. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 129-150. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085457>
- Bonning, B. C., & Saleh, M.-C. (2021). The Interplay Between Viruses and RNAi Pathways in Insects. *Annual Review of Entomology*, 66(1), 61-79. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-033020-090410>
- Bourc'his, D., & Bestor, T. H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*, 431(7004), Article 7004. <https://doi.org/10.1038/nature02886>
- Bourgeois, Y., & Boissinot, S. (2019). On the Population Dynamics of Junk : A Review on the Population Genomics of Transposable Elements. *Genes*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/genes10060419>
- Bourque, G., Burns, K. H., Gehring, M., Gorbunova, V., Seluanov, A., Hammell, M., Imbeault, M., Izsvák, Z., Levin, H. L., Macfarlan, T. S., Mager, D. L., & Feschotte, C. (2018). Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biology*, 19(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>
- Brasset, E., Taddei, A., Arnaud, F., Faye, B., Fausto, A., Mazzini, M., Giorgi, F., & Vaury, C. (2006). Viral particles of the endogenous retrovirus ZAM from *Drosophila melanogaster* use a pre-existing endosome/exosome pathway for transfer to the oocyte. *Retrovirology*, 3(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-25>
- Braunwald, J., Nonnenmacher, H., & Tripier-Darcy, F. (1985). Ultrastructural and Biochemical Study of Frog Virus 3 Uptake by BHK-21 Cells. *Journal of General Virology*, 66(2), 283-293. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-2-283>
- Braunwald, J., Tripier, F., & Kirn, A. (1979). Comparison of the Properties of Enveloped and Naked Frog Virus 3 (FV 3) Particles. *Journal of General Virology*, 45(3), 673-682. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-45-3-673>
- Bregliano, J. C., Picard, G., Bucheton, A., Pelisson, A., Lavigne, J. M., & L'Heritier, P. (1980). *Hybrid Dysgenesis in Drosophila melanogaster*. 207.
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., & Hannon, G. J. (2007). Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. *Cell*, 128(6), 1089-1103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
- Bronkhorst, A. W., Miesen, P., & van Rij, R. P. (2013). Small RNAs tackle large viruses : RNA interference-based antiviral defense against DNA viruses in insects. *Fly*, 7(4), 216-223. <https://doi.org/10.4161/fly.25708>
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Venselaar, H., & van Rij, R. P. (2014). A dsRNA-binding protein of a complex invertebrate DNA virus suppresses the *Drosophila* RNAi response. *Nucleic Acids Research*, 42(19), 12237-12248. <https://doi.org/10.1093/nar/gku910>
- Bronkhorst, A. W., van Cleef, K. W. R., Vodovar, N., Ince, I. A., Blanc, H., Vlak, J. M., Saleh, M.-C., & van Rij, R. P. (2012). The DNA virus Invertebrate iridescent virus 6 is a target of the *Drosophila* RNAi machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), E3604-E3613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207213109>
- Bronkhorst, A. W., & van Rij, R. P. (2014). The long and short of antiviral defense : Small

- RNA-based immunity in insects. *Current Opinion in Virology*, 7, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.010>
- Bronkhorst, A. W., Vogels, R., Overheul, G. J., Pennings, B., Gausson-Dorey, V., Miesen, P., & van Rij, R. P. (2019). A DNA virus-encoded immune antagonist fully masks the potent antiviral activity of RNAi in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(48), 24296-24302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909183116>
- Brosh, O., Fabian, D. K., Cogni, R., Tolosana, I., Day, J. P., Olivieri, F., Merckx, M., Akilli, N., Szkuta, P., & Jiggins, F. M. (2022). A novel transposable element-mediated mechanism causes antiviral resistance in *Drosophila* through truncating the Veneno protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(29), e2122026119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122026119>
- Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V., & Kazazian, H. H. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5280-5285. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831042100>
- Brower-Toland, B., Findley, S. D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S. C. R., & Lin, H. (2007). *Drosophila* PIWI associates with chromatin and interacts directly with HP1a. *Genes & Development*, 21(18), 2300-2311. <https://doi.org/10.1101/gad.1564307>
- Brown, S., Hu, N., & Hombria, J. C.-G. (2003). Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development*, 130(14), 3077-3084. <https://doi.org/10.1242/dev.00535>
- Brun, G., & Plus, N. (1980). The viruses of *Drosophila*. *The genetics and biology of Drosophila*, 2, 625-702.
- Bruscella, P., Bottini, S., Baudesson, C., Pawlotsky, J.-M., Feray, C., & Trabucchi, M. (2017). Viruses and miRNAs: More Friends than Foes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00824>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*—From microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14(12), 796-810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Bureau, T. E., & Wessler, S. R. (1994). Stowaway: A new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants. *The Plant Cell*, 6(6), 907-916. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.6.907>
- Burns, K. H. (2017). Transposable elements in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 17(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.35>
- Cai, X., Lin, R., Liang, J., King, G. J., Wu, J., & Wang, X. (2022). Transposable element insertion: A hidden major source of domesticated phenotypic variation in *Brassica rapa*. *Plant Biotechnology Journal*, 20(7), 1298-1310. <https://doi.org/10.1111/pbi.13807>
- Cao, C., Cogni, R., Barbier, V., & Jiggins, F. M. (2017). Complex Coding and Regulatory Polymorphisms in a Restriction Factor Determine the Susceptibility of *Drosophila* to Viral Infection. *Genetics*, 206(4), 2159-2173. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.201970>
- Capy, P., & Gibert, P. (2004). *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*: So similar yet



*so different.*

- Caragata, E. P., Rocha, M. N., Pereira, T. N., Mansur, S. B., Dutra, H. L. C., & Moreira, L. A. (2019). Pathogen blocking in *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* is not affected by Zika and dengue virus co-infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5), e0007443. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007443>
- Carducci, F., Carotti, E., Gerdol, M., Greco, S., Canapa, A., Barucca, M., & Biscotti, M. A. (2021). Investigation of the activity of transposable elements and genes involved in their silencing in the newt *Cynops orientalis*, a species with a giant genome. *Scientific Reports*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94193-6>
- Carlson, M. (2019). *Org. Dm. Eg. Db : Genome wide annotation for Fly. R Package Version 382*.
- Carpenter, J. A., Obbard, D. J., Maside, X., & Jiggins, F. M. (2007). The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, *16*(18), 3947-3954. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03460.x>
- Carthew, R. W., Agbu, P., & Giri, R. (2017). MicroRNA function in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *65*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.015>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642-655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Casacuberta, E., & González, J. (2013). The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, *22*(6), 1503-1517. <https://doi.org/10.1111/mec.12170>
- Catlin, N. S., & Josephs, E. B. (2022). The important contribution of transposable elements to phenotypic variation and evolution. *Current Opinion in Plant Biology*, *65*, 102140. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102140>
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification : Patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, *10*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrg2540>
- Chalopin, D., Naville, M., Plard, F., Galiana, D., & Volff, J.-N. (2015). Comparative Analysis of Transposable Elements Highlights Mobilome Diversity and Evolution in Vertebrates. *Genome Biology and Evolution*, *7*(2), 567-580. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv005>
- Chalvet, F., Teyssset, L., Terzian, C., Prud'homme, N., Santamaria, P., Bucheton, A., & Pélisson, A. (1999). Proviral amplification of the Gypsy endogenous retrovirus of *Drosophila melanogaster* involves env-independent invasion of the female germline. *The EMBO Journal*, *18*(9), 2659-2669. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2659>
- Chambeyron, S., Popkova, A., Payen-Groschêne, G., Brun, C., Laouini, D., Pelisson, A., & Bucheton, A. (2008). PiRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(39), 14964-14969. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805943105>
- Chang, C.-H., Chavan, A., Palladino, J., Wei, X., Martins, N. M. C., Santinello, B., Chen, C.-C., Erceg, J., Beliveau, B. J., Wu, C.-T., Larracuenta, A. M., & Mellone, B. G. (2019). Islands of retroelements are major components of *Drosophila* centromeres. *PLOS Biology*, *17*(5), e3000241. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000241>
- Chao, J. A., Lee, J. H., Chapados, B. R., Debler, E. W., Schneemann, A., & Williamson, J. R. (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2.

- Nature Structural & Molecular Biology*, 12(11), Article 11.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb1005>
- Chavda, V., Madhwani, K., & Chaurasia, B. (2022). PiWi RNA in Neurodevelopment and Neurodegenerative Disorders. *Current Molecular Pharmacology*, 15(3), 517-531.  
<https://doi.org/10.2174/1874467214666210629164535>
- Chen, J.-M., Stenson, P. D., Cooper, D. N., & Férec, C. (2005). A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Human Genetics*, 117(5), 411-427. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1321-0>
- Chen, T., Tu, S., Ding, L., Jin, M., Chen, H., & Zhou, H. (2023). The role of autophagy in viral infections. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00899-2>
- Cherry, S., Doukas, T., Armknecht, S., Whelan, S., Wang, H., Sarnow, P., & Perrimon, N. (2005). Genome-wide RNAi screen reveals a specific sensitivity of IRES-containing RNA viruses to host translation inhibition. *Genes & Development*, 19(4), 445-452.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1267905>
- Cherry, S., Kunte, A., Wang, H., Coyne, C., Rawson, R. B., & Perrimon, N. (2006). COPI Activity Coupled with Fatty Acid Biosynthesis Is Required for Viral Replication. *PLOS Pathogens*, 2(10), e102. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020102>
- Cherry, S., & Perrimon, N. (2004). Entry is a rate-limiting step for viral infection in a *Drosophila melanogaster* model of pathogenesis. *Nature Immunology*, 5(1), 81-87.  
<https://doi.org/10.1038/ni1019>
- Cheung, S., Manhas, S., & Measday, V. (2018). Retrotransposon targeting to RNA polymerase III-transcribed genes. *Mobile DNA*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0119-2>
- Cheung, Y. P., Park, S., Pagtalunan, J., & Maringer, K. (2022). The antiviral role of NF- $\kappa$ B-mediated immune responses and their antagonism by viruses in insects. *Journal of General Virology*, 103(5). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001741>
- Chinchar, V. G., Hick, P., Ince, I. A., Jancovich, J. K., Marschang, R., Qin, Q., Subramaniam, K., Waltzek, T. B., Whittington, R., Williams, T., Zhang, Q.-Y., & ICTV Report Consortium. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile : Iridoviridae. *Journal of General Virology*, 98(5), 890-891. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000818>
- Chinchar, V. G., Waltzek, T. B., & Subramaniam, K. (2017). Ranaviruses and other members of the family Iridoviridae : Their place in the virosphere. *Virology*, 511, 259-271.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.06.007>
- Choe, K.-M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., & Anderson, K. V. (2002). Requirement for a Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science*, 296(5566), 359-362.  
<https://doi.org/10.1126/science.1070216>
- Chotkowski, H. L., Ciota, A. T., Jia, Y., Puig-Basagoiti, F., Kramer, L. D., Shi, P.-Y., & Glaser, R. L. (2008). West Nile virus infection of *Drosophila melanogaster* induces a protective RNAi response. *Virology*, 377(1), 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.021>
- Christian, P., & Scotti, P. (1998). *Picornalike viruses of insect*. *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Chrostek, E., Marialva, M. S. P., Esteves, S. S., Weinert, L. A., Martinez, J., Jiggins, F. M., &

- Teixeira, L. (2013). Wolbachia Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genetics*, 9(12), e1003896. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003896>
- Chtarbanova, S. (2011). *Tissue-specific pathologies induced by two RNA viruses in Drosophila melanogaster* [These de doctorat, Strasbourg]. <https://www.theses.fr/2011STRA6226>
- Chtarbanova, S., Lamiable, O., Lee, K.-Z., Galiana, D., Troxler, L., Meignin, C., Hetru, C., Hoffmann, J. A., Daeffler, L., & Imler, J.-L. (2014). *Drosophila C Virus Systemic Infection Leads to Intestinal Obstruction*. *Journal of Virology*, 88(24), 14057-14069. <https://doi.org/10.1128/JVI.02320-14>
- Chung, H., Bogwitz, M. R., McCart, C., Andrianopoulos, A., French-Constant, R. H., Batterham, P., & Daborn, P. J. (2007). Cis-Regulatory Elements in the Accord Retrotransposon Result in Tissue-Specific Expression of the *Drosophila melanogaster* Insecticide Resistance Gene *Cyp6g1*. *Genetics*, 175(3), 1071-1077. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066597>
- Chung, W.-J., Okamura, K., Martin, R., & Lai, E. C. (2008). Endogenous RNA Interference Provides a Somatic Defense against *Drosophila* Transposons. *Current Biology*, 18(11), 795-802. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.05.006>
- Chuong, E. B., Elde, N. C., & Feschotte, C. (2016). Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*, 351(6277), 1083-1087. <https://doi.org/10.1126/science.aad5497>
- Chuong, E. B., Elde, N. C., & Feschotte, C. (2017). Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. *Nature Reviews Genetics*, 18(2), 71-86. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>
- Claycomb, J. M. (2014). Ancient Endo-siRNA Pathways Reveal New Tricks. *Current Biology*, 24(15), R703-R715. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.009>
- Cogni, R., Cao, C., Day, J. P., Bridson, C., & Jiggins, F. M. (2016). The genetic architecture of resistance to virus infection in *Drosophila*. *Molecular Ecology*, 25(20), 5228-5241. <https://doi.org/10.1111/mec.13769>
- Consortium, G. I. S. & others. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.
- Constantino, M., Christian, P., Marina, C. F., & Williams, T. (2001). A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6. *Journal of Virological Methods*, 10.
- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms1082>
- Coughlan, J. M., Dagilis, A. J., Serrato-Capuchina, A., Elias, H., Peede, D., Isbell, K., Castillo, D. M., Cooper, B. S., & Matute, D. R. (2022). Patterns of Population Structure and Introgression Among Recently Differentiated *Drosophila melanogaster* Populations. *Molecular Biology and Evolution*, 39(11), msac223. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac223>
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B., & Rey, F. A. (2005). The Birnavirus Crystal Structure Reveals Structural Relationships

- among Icosahedral Viruses. *Cell*, 120(6), 761-772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.009>
- Cox, D. N., Chao, A., & Lin, H. (2000). Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*, 127(3), 503-514. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.503>
- Craig, N. L. (2015). A Moveable Feast : An Introduction to Mobile DNA. In *Mobile DNA III* (p. 1-39). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555819217.ch1>
- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyán, J. (2015). viral silencing suppressors : Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479-480, 85-103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>
- Cullen, B. R. (2011). Viruses and microRNAs : RISCy interactions with serious consequences. *Genes & Development*, 25(18), 1881-1894. <https://doi.org/10.1101/gad.17352611>
- Czech, B., & Hannon, G. J. (2016). One Loop to Rule Them All : The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(4), 324-337. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.008>
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingeheyde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. *Nature*, 453(7196), 798-802. <https://doi.org/10.1038/nature07007>
- Czech, B., Munafò, M., Ciabrelli, F., Eastwood, E. L., Fabry, M. H., Kneuss, E., & Hannon, G. J. (2018). piRNA-Guided Genome Defense : From Biogenesis to Silencing. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 131-157. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>
- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G., & ffrench-Constant, R. H. (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in Drosophila. *Science*, 297(5590), 2253-2256. <https://doi.org/10.1126/science.1074170>
- Dai, P., Wang, X., Gou, L.-T., Li, Z.-T., Wen, Z., Chen, Z.-G., Hua, M.-M., Zhong, A., Wang, L., Su, H., Wan, H., Qian, K., Liao, L., Li, J., Tian, B., Li, D., Fu, X.-D., Shi, H.-J., Zhou, Y., & Liu, M.-F. (2019). A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis. *Cell*, 179(7), 1566-1581.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.022>
- Dasgupta, R., Cheng, L.-L., Bartholomay, L. C., & Christensen, B. M. (2003). Flock house virus replicates and expresses green fluorescent protein in mosquitoes. *Journal of General Virology*, 84(7), 1789-1797. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18938-0>
- Dasgupta, R., Free, H. M., Zietlow, S. L., Paskewitz, S. M., Aksoy, S., Shi, L., Fuchs, J., Hu, C., & Christensen, B. M. (2007). Replication of Flock House Virus in Three Genera of Medically Important Insects. *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY*, 44(1), 9.
- Dasgupta, R., Ghosh, A., Dasmahapatra, B., Guarino, L. A., & Kaesberg, P. (1984). Primary and secondary structure of black beetle virus RNA2, the genomic messenger for BBV coat protein precursor. *Nucleic Acids Research*, 12(18), 7215-7223. <https://doi.org/10.1093/nar/12.18.7215>
- D'Costa, S. M., Yao, H., & Bilimoria, S. L. (2001). Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells. *Archives of Virology*, 146(11), 2165-2178.

- <https://doi.org/10.1007/s007050170027>
- Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nature Immunology*, *9*(12), 1425-1432. <https://doi.org/10.1038/ni.1664>
- de Faria, I. J. S., Aguiar, E. R. G. R., Olmo, R. P., Alves da Silva, J., Daeffler, L., Carthew, R. W., Imler, J.-L., & Marques, J. T. (2022). Invading viral DNA triggers dsRNA synthesis by RNA polymerase II to activate antiviral RNA interference in Drosophila. *Cell Reports*, *39*(12), 110976. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110976>
- Deniz, Ö., Frost, J. M., & Branco, M. R. (2019). Regulation of transposable elements by DNA modifications. *Nature Reviews Genetics*, *20*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0106-6>
- Di Stefano, L., Walker, J. A., Burgio, G., Corona, D. F. V., Mulligan, P., Näär, A. M., & Dyson, N. J. (2011). Functional antagonism between histone H3K4 demethylases in vivo. *Genes & Development*, *25*(1), 17-28. <https://doi.org/10.1101/gad.1983711>
- Díaz-Pendón, J. A., & Ding, S.-W. (2008). Direct and Indirect Roles of Viral Suppressors of RNA Silencing in Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, *46*(1), 303-326. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.46.081407.104746>
- Ding, S.-W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, *10*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nri2824>
- Ding, S.-W., & Voinnet, O. (2007). Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell*, *130*(3), 413-426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>
- Dionne, M. S., & Schneider, D. S. (2008). Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Disease Models & Mechanisms*, *1*(1), 43-49. <https://doi.org/10.1242/dmm.000307>
- Domínguez, M., Dugas, E., Benchouaia, M., Leduque, B., Jiménez-Gómez, J. M., Colot, V., & Quadrana, L. (2020). The impact of transposable elements on tomato diversity. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17874-2>
- Doolittle, W. F., & Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, *284*(5757), 601-603. <https://doi.org/10.1038/284601a0>
- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nature Immunology*, *6*(9), 946-953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>
- Dowsett, A. P., & Young, M. W. (1982). Differing levels of dispersed repetitive DNA among closely related species of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *79*(15), 4570-4574. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.15.4570>
- Du, T., & Zamore, P. D. (2005). microPrimer: The biogenesis and function of microRNA. *Development*, *132*(21), 4645-4652. <https://doi.org/10.1242/dev.02070>
- Duffy, S. (2018). Why are RNA virus mutation rates so damn high? *PLOS Biology*, *16*(8), e3000003. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000003>
- Durdevic, Z., Hanna, K., Gold, B., Pollex, T., Cherry, S., Lyko, F., & Schaefer, M. (2013). Efficient RNA virus control in *Drosophila* requires the RNA methyltransferase Dnmt2. *EMBO reports*, *14*(3), 269-275. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.3>

- Duret, L., Marais, G., & Biéumont, C. (2000). Transposons but Not Retrotransposons Are Located Preferentially in Regions of High Recombination Rate in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *156*(4), 1661-1669. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1661>
- Eaton, H. E., Metcalf, J., Penny, E., Tcherepanov, V., Upton, C., & Brunetti, C. R. (2007). Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae : Re-annotating and defining the core set of iridovirus genes. *Virology Journal*, *4*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-11>
- Eckerle, L. D., & Ball, L. A. (2002). Replication of the RNA Segments of a Bipartite Viral Genome Is Coordinated by a Transactivating Subgenomic RNA. *Virology*, *296*(1), 165-176. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1377>
- Edger, P. P., Smith, R., McKain, M. R., Cooley, A. M., Vallejo-Marin, M., Yuan, Y., Bewick, A. J., Ji, L., Platts, A. E., Bowman, M. J., Childs, K. L., Washburn, J. D., Schmitz, R. J., Smith, G. D., Pires, J. C., & Puzey, J. R. (2017). Subgenome Dominance in an Interspecific Hybrid, Synthetic Allopolyploid, and a 140-Year-Old Naturally Established Neo-Allopolyploid Monkeyflower. *The Plant Cell*, *29*(9), 2150-2167. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00010>
- Ekengren, S., Tryselius, Y., Dushay, M. S., Liu, G., Steiner, H., & Hultmark, D. (2001). A humoral stress response in *Drosophila*. *Current Biology*, *11*(9), 714-718. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00203-2)
- El Baidouri, M., & Panaud, O. (2013). Comparative Genomic Paleontology across Plant Kingdom Reveals the Dynamics of TE-Driven Genome Evolution. *Genome Biology and Evolution*, *5*(5), 954-965. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt025>
- Eleftherianos, I., Won, S., Chtarbanova, S., Squiban, B., Ocorr, K., Bodmer, R., Beutler, B., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2011). ATP-sensitive potassium channel (KATP)–dependent regulation of cardiotropic viral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(29), 12024-12029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108926108>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- Engelhardt, J., Scheer, O., Stadler, P. F., & Prohaska, S. J. (2022). Evolution of DNA Methylation Across Ecdysozoa. *Journal of Molecular Evolution*, *90*(1), 56-72. <https://doi.org/10.1007/s00239-021-10042-0>
- Érdi, B., Nagy, P., Zvara, Á., Varga, Á., Pircs, K., Ménesi, D., Puskás, L. G., & Juhász, G. (2012). Loss of the starvation-induced gene *Rack1* leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy*, *8*(7), 1124-1135. <https://doi.org/10.4161/auto.20069>
- Ertürk-Hasdemir, D., Broemer, M., Leulier, F., Lane, W. S., Paquette, N., Hwang, D., Kim, C.-H., Stöven, S., Meier, P., & Silverman, N. (2009). Two roles for the *Drosophila* IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(24), 9779-9784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812022106>
- Eugénio, A. T., Marialva, M. S. P., & Beldade, P. (2023). Effects of *Wolbachia* on Transposable Element Expression Vary Between *Drosophila melanogaster* Host Genotypes. *Genome Biology and Evolution*, *15*(3), evad036. <https://doi.org/10.1093/gbe/evad036>

- Evgen'ev, M. B. (2013). What happens when Penelope comes? *Mobile Genetic Elements*, 3(2), e24542. <https://doi.org/10.4161/mge.24542>
- Fablet, M. (2014). Host Control of Insect Endogenous Retroviruses : Small RNA Silencing and Immune Response. *Viruses*, 6(11), 4447-4464. <https://doi.org/10.3390/v6114447>
- Fablet, M., Bueno, M., Potrzebowski, L., & Kaessmann, H. (2009). Evolutionary Origin and Functions of Retrogene Introns. *Molecular Biology and Evolution*, 26(9), 2147-2156. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp125>
- Fablet, M., Jacquet, A., Rebollo, R., Haudry, A., Rey, C., Salces-Ortiz, J., Bajad, P., Burlet, N., Jantsch, M. F., Guerreiro, M. P. G., & Vieira, C. (2019). Dynamic Interactions Between the Genome and an Endogenous Retrovirus : *Tirant* in *Drosophila simulans* Wild-Type Strains. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 9(3), 855-865. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200789>
- Fablet, M., Salces-Ortiz, J., Jacquet, A., Menezes, B. F., Dechaud, C., Veber, P., Nous, C., Rebollo, R., & Vieira, C. (2022). *A quantitative, genome-wide analysis in Drosophila reveals transposable elements' influence on gene expression is species-specific* [Preprint]. Genomics. <https://doi.org/10.1101/2022.01.20.477049>
- Fablet, M., & Vieira, C. (2011). Evolvability, epigenetics and transposable elements. *BioMolecular Concepts*, 2(5), 333-341. <https://doi.org/10.1515/BMC.2011.035>
- Fagegaltier, D., Falciatori, I., Czech, B., Castel, S., Perrimon, N., Simcox, A., & Hannon, G. J. (2016). Oncogenic transformation of *Drosophila* somatic cells induces a functional piRNA pathway. *Genes & Development*, 30(14), 1623-1635. <https://doi.org/10.1101/gad.284927.116>
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C., & St Johnston, D. (1994). Staufien protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell*, 79(7), 1221-1232. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90013-2)
- Ferreira, Á. G., Naylor, H., Esteves, S. S., Pais, I. S., Martins, N. E., & Teixeira, L. (2014). The Toll-Dorsal Pathway Is Required for Resistance to Viral Oral Infection in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004507. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004507>
- Ferrero, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodríguez, J. F., & Verdaguer, N. (2015). Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *Journal of Virology*, 89(21), 11165-11168. <https://doi.org/10.1128/JVI.00218-15>
- Feschotte, C., & Pritham, E. (2005). Non-mammalian c-integrases are encoded by giant transposable elements. *Trends in Genetics*, 21(10), 551-552. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.07.007>
- Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. *Annual Review of Genetics*, 41(1), 331-368. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
- Finnegan, D. J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, 5, 103-107. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90039-5)
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), Article 6669. <https://doi.org/10.1038/35888>

- Fischer, F. P., Karge, R. A., Weber, Y. G., Koch, H., Wolking, S., & Voigt, A. (2023). *Drosophila melanogaster* as a versatile model organism to study genetic epilepsies : An overview. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1116000. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1116000>
- Fischer, M., Schnitzler, P., Delius, H., & Darai, G. (1988). Identification and characterization of the repetitive DNA element in the genome of insect iridescent virus type 6. *Virology*, *167*(2), 485-496. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90111-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90111-0)
- Flajnik, M. F., & Du Pasquier, L. (2004). Evolution of innate and adaptive immunity : Can we draw a line? *Trends in Immunology*, *25*(12), 640-644. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.10.001>
- Förstemann, K., Horwich, M. D., Wee, L., Tomari, Y., & Zamore, P. D. (2007). *Drosophila* microRNAs Are Sorted into Functionally Distinct Argonaute Complexes after Production by Dicer-1. *Cell*, *130*(2), 287-297. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.056>
- Frahry, M. B., Sun, C., Chong, R. A., & Mueller, R. L. (2015). Low Levels of LTR Retrotransposon Deletion by Ectopic Recombination in the Gigantic Genomes of Salamanders. *Journal of Molecular Evolution*, *80*(2), 120-129. <https://doi.org/10.1007/s00239-014-9663-7>
- Fukaya, M., & Nasu, S. (1966). A Chilo Iridescent Virus (CIV) from the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera : Pyralidae). *Applied Entomology and Zoology*, *1*(2), 69-72. <https://doi.org/10.1303/aez.1.69>
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nature Immunology*, *7*(6), 590-597. <https://doi.org/10.1038/ni1335>
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Costa, B. D., Ouldali, M., Lepault, J., & Delmas, B. (2007). Infectious Bursal Disease Virus, a Non-enveloped Virus, Possesses a Capsid-associated Peptide That Deforms and Perforates Biological Membranes \*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(28), 20774-20784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701048200>
- Gammon, D. B., & Mello, C. C. (2015). RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.006>
- Garcia-Silva, M. R., Cura das Neves, R. F., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., Naya, H., Fernandez-Calero, T., Souto-Padron, T., de Souza, W., & Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*, *113*(1), 285-304. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>
- Gardner, M. J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R. W., Carlton, J. M., Pain, A., Nelson, K. E., Bowman, S., Paulsen, I. T., James, K., Eisen, J. A., Rutherford, K., Salzberg, S. L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M.-S., Nene, V., ... Barrell, B. (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *419*(6906), Article 6906. <https://doi.org/10.1038/nature01097>
- Gateff, E. (1982). Cancer, Genes, and Development : The *Drosophila* Case. In G. Klein & S. Weinhouse (Éds.), *Advances in Cancer Research* (Vol. 37, p. 33-74). Academic Press.



- [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60881-7](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60881-7)
- Gendrault, J.-L., Steffan, A.-M., Bingen, A., & Kirn, A. (1981). Penetration and uncoating of frog virus 3 (FV3) in cultured rat Kupffer cells. *Virology*, *112*(2), 375-384. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90284-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90284-1)
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L. W., Zapp, M. L., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2008). Endogenous siRNAs Derived from Transposons and mRNAs in *Drosophila* Somatic Cells. *Science*, *320*(5879), 1077-1081. <https://doi.org/10.1126/science.1157396>
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs : An expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, *10*(2), 94-108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
- Giraud, T., & Capy, P. (1997). Somatic activity of the mariner transposable element in natural populations of *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *263*(1376), 1481-1486. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0216>
- Goic, B., Stapleford, K. A., Frangeul, L., Doucet, A. J., Gausson, V., Blanc, H., Schemmel-Jofre, N., Cristofari, G., Lambrechts, L., Vignuzzi, M., & Saleh, M.-C. (2016). Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nature Communications*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms12410>
- Goic, B., Vodovar, N., Mondotte, J. A., Monot, C., Frangeul, L., Blanc, H., Gausson, V., Vera-Otarola, J., Cristofari, G., & Saleh, M.-C. (2013). RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*. *Nature Immunology*, *14*(4), 396-403. <https://doi.org/10.1038/ni.2542>
- Gomariz-Zilber, E., Poras, M., & Thomas-Orillard, M. (1995). *Drosophila C Virus* : Experimental Study of infectious Yields and UnderLying Pathology in *Drosophila melanogaster* Laboratory Populations. *Journal of Invertebrate Pathology*, *65*(3), 243-247. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1037>
- Goorha, R., Murti, G., Granoff, A., & Tirey, R. (1978). Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus—VIII. The nucleus is a site of frog virus 3 DNA and RNA synthesis. *Virology*, *84*(1), 32-50. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90216-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90216-7)
- Goto, A., Okado, K., Martins, N., Cai, H., Barbier, V., Lamiable, O., Troxler, L., Santiago, E., Kuhn, L., Paik, D., Silverman, N., Holleufer, A., Hartmann, R., Liu, J., Peng, T., Hoffmann, J. A., Meignin, C., Daeffler, L., & Imler, J.-L. (2018). The Kinase IKK $\beta$  Regulates a STING- and NF- $\kappa$ B-Dependent Antiviral Response Pathway in *Drosophila*. *Immunity*, *49*(2), 225-234.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.013>
- Goubert, C., Modolo, L., Vieira, C., ValienteMoro, C., Mavingui, P., & Boulesteix, M. (2015). De Novo Assembly and Annotation of the Asian Tiger Mosquito (*Aedes albopictus*) Repeatome with dnaPipeTE from Raw Genomic Reads and Comparative Analysis with the Yellow Fever Mosquito (*Aedes aegypti*). *Genome Biology and Evolution*, *7*(4), 1192-1205. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv050>
- Grentzinger, T., Oberlin, S., Schott, G., Handler, D., Svozil, J., Barragan-Borrero, V., Humbert, A., Duharcourt, S., Brennecke, J., & Voinnet, O. (2020). A universal method for the rapid isolation of all known classes of functional silencing small RNAs. *Nucleic Acids Research*, *48*(14), e79-e79. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa472>
- Gu, T., & Elgin, S. C. R. (2013). Maternal Depletion of Piwi, a Component of the RNAi System, Impacts Heterochromatin Formation in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, *9*(9), e1003780.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003780>
- Guarino, L. A., Ghosh, A., Dasmahapatra, B., Dasgupta, R., & Kaesberg, P. (1984). Sequence of the black beetle virus subgenomic RNA and its location in the viral genome. *Virology*, *139*(1), 199-203. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90342-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90342-8)
- Guerreiro, M. P. G. (2012). What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity*, *108*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.89>
- Gunawardane, L. S., Saito, K., Nishida, K. M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2007). A Slicer-Mediated Mechanism for Repeat-Associated siRNA 5' End Formation in *Drosophila*. *Science*, *315*(5818), 1587-1590. <https://doi.org/10.1126/science.1140494>
- Guo, C.-J., Liu, D., Wu, Y.-Y., Yang, X.-B., Yang, L.-S., Mi, S., Huang, Y.-X., Luo, Y.-W., Jia, K.-T., Liu, Z.-Y., Chen, W.-J., Weng, S.-P., Yu, X.-Q., & He, J.-G. (2011). Entry of Tiger Frog Virus (an Iridovirus) into HepG2 Cells via a pH-Dependent, Atypical, Caveola-Mediated Endocytosis Pathway. *Journal of Virology*, *85*(13), 6416-6426. <https://doi.org/10.1128/JVI.01500-10>
- Guo, X., & Silva, J. C. (2008). Properties of non-coding DNA and identification of putative cis-regulatory elements in *Theileria parva*. *BMC Genomics*, *9*(1), 582. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-582>
- Guo, Z., Li, Y., & Ding, S.-W. (2019). Small RNA-based antimicrobial immunity. *Nature Reviews Immunology*, *19*(1), 31-44. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0071-x>
- Haase, A. D. (2022). An introduction to PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in the context of metazoan small RNA silencing pathways. *RNA Biology*, *19*(1), 1094-1102. <https://doi.org/10.1080/15476286.2022.2132359>
- Habayeb, M. S., Ekengren, S. K., & Hultmark, D. (2006). Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. *Journal of General Virology*, *87*(10), 3045-3051. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81997-0>
- Han, B. W., Wang, W., Li, C., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2015). PiRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. *Science*, *348*(6236), 817-821. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1264>
- Han, Y.-H., Luo, Y.-J., Wu, Q., Jovel, J., Wang, X.-H., Aliyari, R., Han, C., Li, W.-X., & Ding, S.-W. (2011). RNA-Based Immunity Terminates Viral Infection in Adult *Drosophila* in the Absence of Viral Suppression of RNA Interference : Characterization of Viral Small Interfering RNA Populations in Wild-Type and Mutant Flies. *Journal of Virology*, *85*(24), 13153-13163. <https://doi.org/10.1128/JVI.05518-11>
- Hancks, D. C., & Kazazian, H. H. (2016). Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, *7*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0065-9>
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity : Insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Harris, A. N., & Macdonald, P. M. (2001). Aubergine encodes a *Drosophila* polar granule component required for pole cell formation and related to eIF2C. *Development*, *128*(14), 2823-2832. <https://doi.org/10.1242/dev.128.14.2823>
- Harvey, E., & Holmes, E. C. (2022). Diversity and evolution of the animal virome. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(6), 321-334. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00665-x>

- Hayashi, R., Schnabl, J., Handler, D., Mohn, F., Ameres, S. L., & Brennecke, J. (2016). Genetic and mechanistic diversity of piRNA 3'-end formation. *Nature*, *539*(7630), Article 7630. <https://doi.org/10.1038/nature20162>
- Hayward, A., & Gilbert, C. (2022). Transposable elements. *Current Biology*, *32*(17), R904-R909. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.07.044>
- Hedges, L. M., & Johnson, K. N. (2008). Induction of host defence responses by Drosophila C virus. *Journal of General Virology*, *89*(6), 1497-1501. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83684-0>
- Hickey, D. A. (1982). SELFISH DNA: A SEXUALLY-TRANSMITTED NUCLEAR PARASITE. *Genetics*, *101*(3-4), 519-531. <https://doi.org/10.1093/genetics/101.3-4.519>
- Hill, T., Schlötterer, C., & Betancourt, A. J. (2016). Hybrid Dysgenesis in Drosophila simulans Associated with a Rapid Invasion of the P-Element. *PLOS Genetics*, *12*(3), e1005920. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005920>
- Hof, A. E. van't, Campagne, P., Rigden, D. J., Yung, C. J., Lingley, J., Quail, M. A., Hall, N., Darby, A. C., & Saccheri, I. J. (2016). The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element. *Nature*, *534*(7605), 102-105. <https://doi.org/10.1038/nature17951>
- Hoffmann, J. A. (1995). Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, *7*(1), 4-10. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80022-0](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80022-0)
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of Drosophila. *Nature*, *426*(6962), Article 6962. <https://doi.org/10.1038/nature02021>
- Holden, P. R., Brookfield, J. F. Y., & Jones, P. (1993). Cloning and characterization of an ftsZ homologue from a bacterial symbiont of Drosophila melanogaster. *Molecular and General Genetics MGG*, *240*(2), 213-220. <https://doi.org/10.1007/BF00277059>
- Horjales, S., Li Calzi, M., Francia, M. E., Cayota, A., & Garcia-Silva, M. R. (2023). piRNA pathway evolution beyond gonad context: Perspectives from apicomplexa and trypanosomatids. *Frontiers in Genetics*, *14*, 1129194. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1129194>
- Horwich, M. D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., & Zamore, P. D. (2007). The Drosophila RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Current Biology: CB*, *17*(14), 1265-1272. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.030>
- Hsu, P.-S., Yu, S.-H., Tsai, Y.-T., Chang, J.-Y., Tsai, L.-K., Ye, C.-H., Song, N.-Y., Yau, L.-C., & Lin, S.-P. (2021). More than causing (epi)genomic instability: Emerging physiological implications of transposable element modulation. *Journal of Biomedical Science*, *28*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00754-2>
- Hsu, V. W., Lee, S. Y., & Yang, J.-S. (2009). The evolving understanding of COPI vesicle formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *10*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrm2663>
- Huang, X., Fejes Tóth, K., & Aravin, A. A. (2017). PiRNA Biogenesis in Drosophila melanogaster. *Trends in Genetics*, *33*(11), 882-894. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.09.002>
- Hua-Van, A., Le Rouzic, A., Boutin, T. S., Filée, J., & Capy, P. (2011). The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct*, *6*(1), 19. [164](https://doi.org/10.1186/1745-</a></p></div><div data-bbox=)

- 6150-6-19
- Hublitz, P., Albert, M., Hfmpeters, A., Hublitz, P., Albert, M., & Peters, A. H. F. M. (2009). Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(2-3), Article 2-3. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082717ph>
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). ViralZone : A knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D576-D582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>
- Hussain, M., & Asgari, S. (2014). MicroRNAs as mediators of insect host-pathogen interactions and immunity. *Journal of Insect Physiology*, 70, 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.08.003>
- Huszar, T., & Imler, J. (2008). Chapter 6 Drosophila Viruses and the Study of Antiviral Host-Defense. In *Advances in Virus Research* (Vol. 72, p. 227-265). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00406-5)
- İnce, İ. A., Boeren, S. A., van Oers, M. M., Vervoort, J. J. M., & Vlak, J. M. (2010). Proteomic analysis of Chilo iridescent virus. *Virology*, 405(1), 253-258. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.038>
- İnce, İ. A., Özcan, K., Vlak, J. M., & van Oers, M. M. (2013). Temporal classification and mapping of non-polyadenylated transcripts of an invertebrate iridovirus. *Journal of General Virology*, 94(1), 187-192. <https://doi.org/10.1099/vir.0.046359-0>
- Iwama, R. E., & Moran, Y. (2023). Origins and diversification of animal innate immune responses against viral infections. *Nature Ecology & Evolution*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01951-4>
- Iwasaki, Y. W., Murano, K., Ishizu, H., Shibuya, A., Iyoda, Y., Siomi, M. C., Siomi, H., & Saito, K. (2016). Piwi Modulates Chromatin Accessibility by Regulating Multiple Factors Including Histone H1 to Repress Transposons. *Molecular Cell*, 63(3), 408-419. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.008>
- Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA : Its Biogenesis and Functions. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 405-433. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258>
- Izumi, N., Shoji, K., Suzuki, Y., Katsuma, S., & Tomari, Y. (2020). Zucchini consensus motifs determine the mechanism of pre-piRNA production. *Nature*, 578(7794), Article 7794. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1966-9>
- Jakob, N. J., & Darai, G. (2002). Molecular Anatomy of Chilo Iridescent Virus Genome and the Evolution of Viral Genes. *Virus Genes*, 25(3), 299-316. <https://doi.org/10.1023/A:1020984210358>
- Jakob, N. J., Müller, K., Bahr, U., & Darai, G. (2001). Analysis of the First Complete DNA Sequence of an Invertebrate Iridovirus : Coding Strategy of the Genome of Chilo Iridescent Virus. *Virology*, 286(1), 182-196. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0963>
- Janssen, A., Colmenares, S. U., & Karpen, G. H. (2018). Heterochromatin : Guardian of the Genome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34, 265-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>
- Jensen, P. A., Stuart, J. R., Goodpaster, M. P., Goodman, J. W., & Simmons, M. J. (2008). Cytotype Regulation of P Transposable Elements in *Drosophila melanogaster* :

- Repressor Polypeptides or piRNAs? *Genetics*, 179(4), 1785-1793.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.108.087072>
- Jensen-Seaman, M. I., Furey, T. S., Payseur, B. A., Lu, Y., Roskin, K. M., Chen, C.-F., Thomas, M. A., Haussler, D., & Jacob, H. J. (2004). Comparative Recombination Rates in the Rat, Mouse, and Human Genomes. *Genome Research*, 14(4), 528-538.  
<https://doi.org/10.1101/gr.1970304>
- Jia, K.-T., Wu, Y.-Y., Liu, Z.-Y., Mi, S., Zheng, Y.-W., He, J., Weng, S.-P., Li, S. C., He, J.-G., & Guo, C.-J. (2013). Mandarin Fish Caveolin 1 Interaction with Major Capsid Protein of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus and Its Role in Early Stages of Infection. *Journal of Virology*, 87(6), 3027-3038. <https://doi.org/10.1128/JVI.00552-12>
- Jiang, H., Zheng, X., Wang, L., Du, H., Wang, P., & Bai, X. (2017). Hantavirus infection : A global zoonotic challenge. *Virologica Sinica*, 32(1), 32-43.  
<https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>
- Johnson, K. L., & Ball, L. A. (1997). Replication of flock house virus RNAs from primary transcripts made in cells by RNA polymerase II. *Journal of Virology*, 71(4), 3323-3327.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.3323-3327.1997>
- Johnson, K. N., & Christian, P. D. (1998). The novel genome organization of the insect picorna-like virus Drosophila C virus suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. *Journal of General Virology*, 79(1), 191-203.  
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-1-191>
- Johnson, W. E. (2019). Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 355-370.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0189-2>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.  
<https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jousset, F. X. (1972). Mise en évidence des virions du virus iota de Drosophila immigrans. *Acad Sci Paris C R Ser D*.  
[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Mise+en+evidence+des+virions+du+virus+iota+de+Drosophila+immigrans&author=Jousset%2C+F.X.&publication\\_year=1972](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Mise+en+evidence+des+virions+du+virus+iota+de+Drosophila+immigrans&author=Jousset%2C+F.X.&publication_year=1972)
- Kaminker, J. S., Bergman, C. M., Kronmiller, B., Svirskas, R., Patel, S., Frise, E., Lewis, S. E., Rubin, G. M., Ashburner, M., & Celniker, S. E. (2002). *The transposable elements of the Drosophila melanogaster euchromatin : A genomics perspective*.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.-H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W. E., Oh, B.-H., Kurata, S., & Silverman, N. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature Immunology*, 7(7), Article 7.  
<https://doi.org/10.1038/ni1356>
- Kapitonov, V. V., & Jurka, J. (2001). Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8714-8719.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.151269298>
- Kapitonov, V. V., & Jurka, J. (2006). Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4540-4545.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0600833103>
- Kapitonov, V. V., & Jurka, J. (2008). A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nature Reviews Genetics*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nrg2165-c1>
- Kapun, M., Barrón, M. G., Staubach, F., Obbard, D. J., Wiberg, R. A. W., Vieira, J., Goubert, C., Rota-Stabelli, O., Kankare, M., Bogaerts-Márquez, M., Haudry, A., Waidele, L., Kozeretska, I., Pasyukova, E. G., Loeschcke, V., Pascual, M., Vieira, C. P., Serga, S., Montchamp-Moreau, C., ... González, J. (2020). Genomic Analysis of European *Drosophila melanogaster* Populations Reveals Longitudinal Structure, Continent-Wide Selection, and Previously Unknown DNA Viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 37(9), 2661-2678. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa120>
- Kapun, M., Nolte, V., Flatt, T., & Schlötterer, C. (2010). Host Range and Specificity of the *Drosophila C Virus*. *PLoS ONE*, 5(8), e12421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012421>
- Kapusta, A., Suh, A., & Feschotte, C. (2017). Dynamics of genome size evolution in birds and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), E1460-E1469. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616702114>
- Karlikow, M., Goic, B., Mongelli, V., Salles, A., Schmitt, C., Bonne, I., Zurzolo, C., & Saleh, M.-C. (2016). *Drosophila* cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells. *Scientific Reports*, 6(1), 27085. <https://doi.org/10.1038/srep27085>
- Karlikow, M., Goic, B., & Saleh, M.-C. (2014). RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: Setting up a systemic immune response. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.004>
- Kawakami, T., Mugal, C. F., Suh, A., Nater, A., Burri, R., Smeds, L., & Ellegren, H. (2017). Whole-genome patterns of linkage disequilibrium across flycatcher populations clarify the causes and consequences of fine-scale recombination rate variation in birds. *Molecular Ecology*, 26(16), 4158-4172. <https://doi.org/10.1111/mec.14197>
- Kawamura, Y., Saito, K., Kin, T., Ono, Y., Asai, K., Sunohara, T., Okada, T. N., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2008). *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature*, 453(7196), Article 7196. <https://doi.org/10.1038/nature06938>
- Kazazian Jr, H. H., Wong, C., Youssoufian, H., Scottt, A. F., & Phillips, D. G. (1988). *Haemophilia A resulting from de novo insertion of Ll sequences represents a novel mechanism for mutation in man*.
- Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., Pfeffer, S., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2013a). Broad RNA Interference-Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, 190(2), 650-658. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102486>
- Kemp, C., Mueller, S., Goto, A., Barbier, V., Paro, S., Bonnay, F., Dostert, C., Troxler, L., Hetru, C., Meignin, C., Pfeffer, S., Hoffmann, J. A., & Imler, J.-L. (2013b). Broad RNA Interference-Mediated Antiviral Immunity and Virus-Specific Inducible Responses in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, 190(2), 650-658. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102486>

- Kidwell, M. G., Kidwell, J. F., & Sved, J. A. (1977). HYBRID DYSGENESIS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*: A SYNDROME OF ABERRANT TRAITS INCLUDING MUTATION, STERILITY AND MALE RECOMBINATION. *Genetics*, 86(4), 813-833. <https://doi.org/10.1093/genetics/86.4.813>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907-915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>
- King, L. A., & Moore, N. F. (1988). Evidence for the presence of a genome-linked protein in two insect picornaviruses, cricket paralysis and Drosophila C viruses. *FEMS Microbiology Letters*, 50(1), 41-44. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb02908.x>
- Kingsolver, M. B., Huang, Z., & Hardy, R. W. (2013). Insect Antiviral Innate Immunity : Pathways, Effectors, and Connections. *Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4921-4936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.006>
- Kissinger, J. C., & DeBarry, J. (2011). Genome cartography : Charting the apicomplexan genome. *Trends in Parasitology*, 27(8), 345-354. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.03.006>
- Kochan, G., Gonzalez, D., & Rodriguez, J. F. (2003). Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of Infectious bursal disease virus. *Archives of Virology*, 148(4), 723-744. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0949-5>
- Kofler, R., Hill, T., Nolte, V., Betancourt, A. J., & Schlötterer, C. (2015). The recent invasion of natural Drosophila simulans populations by the P-element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6659-6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500758112>
- Kofler, R., Nolte, V., & Schlötterer, C. (2015). Tempo and Mode of Transposable Element Activity in Drosophila. *PLOS Genetics*, 11(7), e1005406. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005406>
- Kofler, R., Senti, K.-A., Nolte, V., Tobler, R., & Schlötterer, C. (2018). Molecular dissection of a natural transposable element invasion. *Genome Research*, 28(6), 824-835. <https://doi.org/10.1101/gr.228627.117>
- Koito, A., & Ikeda, T. (2013). Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00028>
- Kojima, K. K. (2018). Human transposable elements in Repbase : Genomic footprints from fish to humans. *Mobile DNA*, 9(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0107-y>
- Kojima, K. K., & Jurka, J. (2011). Crypton transposons : Identification of new diverse families and ancient domestication events. *Mobile DNA*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-12>
- Kolliopoulou, A., Santos, D., Taning, C. N. T., Wynant, N., Vanden Broeck, J., Smagghe, G., & Swevers, L. (2019). PIWI pathway against viruses in insects. *WIREs RNA*, 10(6), e1555. <https://doi.org/10.1002/wrna.1555>
- Koonin, E. V., & Krupovic, M. (2017). Polintons, virophages and transpovirons : A tangled web linking viruses, transposons and immunity. *Current Opinion in Virology*, 25, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.008>

- Kopek, B. G., Perkins, G., Miller, D. J., Ellisman, M. H., & Ahlquist, P. (2007). Three-Dimensional Analysis of a Viral RNA Replication Complex Reveals a Virus-Induced Mini-Organelle. *PLOS Biology*, 5(9), e220. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050220>
- Kramerov, D. A., & Vassetzky, N. S. (2005). Short Retroposons in Eukaryotic Genomes. In *International Review of Cytology* (Vol. 247, p. 165-221). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47004-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47004-7)
- Kramerov, D. A., & Vassetzky, N. S. (2011). Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity*, 107(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.43>
- Kunert, N., Marhold, J., Stanke, J., Stach, D., & Lyko, F. (2003). A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development*, 130(21), 5083-5090. <https://doi.org/10.1242/dev.00716>
- Kutzer, M. A. M., Gupta, V., Neophytou, K., Doublet, V., Monteith, K. M., & Vale, P. F. (2023). Intraspecific genetic variation in host vigour, viral load and disease tolerance during *Drosophila C* virus infection. *Open Biology*, 13(3), 230025. <https://doi.org/10.1098/rsob.230025>
- Lachaise, D., Cariou, M.-L., David, J. R., Lemeunier, F., Tsacas, L., & Ashburner, M. (1988). Historical Biogeography of the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. In M. K. Hecht, B. Wallace, & G. T. Prance (Éds.), *Evolutionary Biology* (p. 159-225). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0931-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0931-4_4)
- Lachaise, D., & Silvain, J.-F. (2004). How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: The *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. In P. Capy, P. Gibert, & I. Boussy (Éds.), *Drosophila melanogaster, Drosophila simulans: So Similar, So Different* (p. 17-39). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0965-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0965-2_2)
- Lamiable, O., Arnold, J., de Faria, I. J. da S., Olmo, R. P., Bergami, F., Meignin, C., Hoffmann, J. A., Marques, J. T., & Imler, J.-L. (2016). Analysis of the Contribution of Hemocytes and Autophagy to *Drosophila* Antiviral Immunity. *Journal of Virology*, 90(11), 5415-5426. <https://doi.org/10.1128/JVI.00238-16>
- Lamiable, O., & Imler, J.-L. (2014). Induced antiviral innate immunity in *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology*, 20, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.006>
- Lannoy, N., & Hermans, C. (2016). Principles of genetic variations and molecular diseases: Applications in hemophilia A. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.04.005>
- Lapp, H. E., & Hunter, R. G. (2019). Early life exposures, neurodevelopmental disorders, and transposable elements. *Neurobiology of Stress*, 11, 100174. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2019.100174>
- Laricchia, K. M., Zdraljevic, S., Cook, D. E., & Andersen, E. C. (2017). Natural Variation in the Distribution and Abundance of Transposable Elements Across the *Caenorhabditis elegans* Species. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9), 2187-2202. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx155>
- Lautié-Harivel, N., & Thomas-Orillard, M. (1990). Location of *Drosophila C* virus target organs in *Drosophila* host population by an immunofluorescence technique. *Biology of the Cell*, 69(1), 35-39. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90326-X](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90326-X)



- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Le Thomas, A., Rogers, A. K., Webster, A., Marinov, G. K., Liao, S. E., Perkins, E. M., Hur, J. K., Aravin, A. A., & Tóth, K. F. (2013). Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes & Development*, 27(4), 390-399. <https://doi.org/10.1101/gad.209841.112>
- Lécher, P., Bucheton, A., & Péliisson, A. (1997). Expression of the *Drosophila* retrovirus gypsy as ultrastructurally detectable particles in the ovaries of flies carrying a permissive flamenco allele. *Journal of General Virology*, 78(9), 2379-2388. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2379>
- Lee, J. H., Schütte, D., Wulf, G., Füzesi, L., Radzun, H.-J., Schweyer, S., Engel, W., & Nayernia, K. (2006). Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Human Molecular Genetics*, 15(2), 201-211. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi430>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Lee, Y. C. G., & Karpen, G. H. (2017). Pervasive epigenetic effects of *Drosophila* euchromatic transposable elements impact their evolution. *ELife*, 6, e25762. <https://doi.org/10.7554/eLife.25762>
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051-4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., & Hoffmann, J. A. (1996). The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*, 86(6), 973-983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Lerat, E., Burlet, N., Biémont, C., & Vieira, C. (2011). Comparative analysis of transposable elements in the melanogaster subgroup sequenced genomes. *Gene*, 473(2), 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.11.009>
- Lerat, E., Fablet, M., Modolo, L., Lopez-Maestre, H., & Vieira, C. (2017). TEtools facilitates big data expression analysis of transposable elements and reveals an antagonism between their activity and that of piRNA genes. *Nucleic Acids Research*, gkw953. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw953>
- Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. (1999). Constitutive Activation of Toll-Mediated Antifungal Defense in Serpin-Deficient *Drosophila*. *Science*, 285(5435), 1917-1919. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1917>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2009). Autophagy in aging, disease and death : The true identity of a cell death impostor. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), Article 1.

- <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.139>
- Levine, B., Mizushima, N., & Virgin, H. W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, *469*(7330), Article 7330. <https://doi.org/10.1038/nature09782>
- Lewis, S. H., Quarles, K. A., Y, Y., M, T., L, F., Sa, S., Pp, S., R, C., C, G., I, G., Dh, C., Pd, Z., Ea, M., P, S., & Fm, J. (2018). Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements. *Nature Ecology & Evolution*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0403-4>
- Lewis, S. H., Salmela, H., & Obbard, D. J. (2016). Duplication and Diversification of Dipteran Argonaute Genes, and the Evolutionary Divergence of Piwi and Aubergine. *Genome Biology and Evolution*, *8*(3), 507-518. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw018>
- Li, C., Vagin, V. V., Lee, S., Xu, J., Ma, S., Xi, H., Seitz, H., Horwich, M. D., Szyzycka, M., Honda, B. M., Kittler, E. L. W., Zapp, M. L., Klattenhoff, C., Schulz, N., Theurkauf, W. E., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2009). Collapse of Germline piRNAs in the Absence of Argonaute3 Reveals Somatic piRNAs in Flies. *Cell*, *137*(3), 509-521. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.027>
- Li, C.-X., Shi, M., Tian, J.-H., Lin, X.-D., Kang, Y.-J., Chen, L.-J., Qin, X.-C., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2015). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *eLife*, *4*, e05378. <https://doi.org/10.7554/eLife.05378>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, H., Li, W. X., & Ding, S. W. (2002). Induction and Suppression of RNA Silencing by an Animal Virus. *Science*, *296*(5571), 1319-1321. <https://doi.org/10.1126/science.1070948>
- Li, H., & Stephan, W. (2006). Inferring the Demographic History and Rate of Adaptive Substitution in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, *2*(10), e166. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020166>
- Lidholm, D. A., Lohe, A. R., & Hartl, D. L. (1993). The transposable element mariner mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *134*(3), 859-868. <https://doi.org/10.1093/genetics/134.3.859>
- Lindsay, S. A., & Wasserman, S. A. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Developmental & Comparative Immunology*, *42*(1), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.011>
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2005). The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Reports*, *6*(12), 1149-1155. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400583>
- Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., & Martienssen, R. (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biology*, *1*(3), E67. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000067>
- Lisch, D. (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews Genetics*,

- 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrg3374>
- Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., & Ecker, J. R. (2008). Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis. *Cell*, 133(3), 523-536. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.029>
- Liu, B., Behura, S. K., Clem, R. J., Schneemann, A., Becnel, J., Severson, D. W., & Zhou, L. (2013). P53-Mediated Rapid Induction of Apoptosis Conveys Resistance to Viral Infection in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens*, 9(2), e1003137. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003137>
- Liu, S., Han, Y., Li, W.-X., & Ding, S.-W. (2023). Infection Defects of RNA and DNA Viruses Induced by Antiviral RNA Interference. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 0(0), e00035-22. <https://doi.org/10.1128/membr.00035-22>
- Liu, S., Yeh, C.-T., Ji, T., Ying, K., Wu, H., Tang, H. M., Fu, Y., Nettleton, D., & Schnable, P. S. (2009). Mu Transposon Insertion Sites and Meiotic Recombination Events Co-Localize with Epigenetic Marks for Open Chromatin across the Maize Genome. *PLoS Genetics*, 5(11), e1000733. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000733>
- Liu, X., Jiang, F., Kalidas, S., Smith, D., & Liu, Q. (2006). Dicer-2 and R2D2 coordinately bind siRNA to promote assembly of the siRISC complexes. *RNA*, 12(8), 1514-1520. <https://doi.org/10.1261/rna.101606>
- Liu, X., Liu, Z., Wu, Z., Ren, J., Fan, Y., Sun, L., Cao, G., Niu, Y., Zhang, B., Ji, Q., Jiang, X., Wang, C., Wang, Q., Ji, Z., Li, L., Esteban, C. R., Yan, K., Li, W., Cai, Y., ... Liu, G.-H. (2023). Resurrection of endogenous retroviruses during aging reinforces senescence. *Cell*, 186(2), 287-304.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.017>
- Liu, Y., Tran, B. N., Wang, F., Ounjai, P., Wu, J., & Hew, C. L. (2016). Visualization of Assembly Intermediates and Budding Vacuoles of Singapore Grouper Iridovirus in Grouper Embryonic Cells. *Scientific Reports*, 6(1), 18696. <https://doi.org/10.1038/srep18696>
- Loiseau, V., Herniou, E. A., Moreau, Y., Lévêque, N., Meignin, C., Daeffler, L., Federici, B., Cordaux, R., & Gilbert, C. (2020). Wide spectrum and high frequency of genomic structural variation, including transposable elements, in large double-stranded DNA viruses. *Virus Evolution*, 6(1), vez060. <https://doi.org/10.1093/ve/vez060>
- Loiseau, V., Peccoud, J., Bouzar, C., Guillier, S., Fan, J., Gueli Alletti, G., Meignin, C., Herniou, E. A., Federici, B. A., Wennmann, J. T., Jehle, J. A., Cordaux, R., & Gilbert, C. (2021). Monitoring Insect Transposable Elements in Large Double-Stranded DNA Viruses Reveals Host-to-Virus and Virus-to-Virus Transposition. *Molecular Biology and Evolution*, 38(9), 3512-3530. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab198>
- Lombardo, E., Maraver, A., Castón, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L., & Rodriguez, J. F. (1999). VP1, the Putative RNA-Dependent RNA Polymerase of Infectious Bursal Disease Virus, Forms Complexes with the Capsid Protein VP3, Leading to Efficient Encapsidation into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 73(8), 6973-6983. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6973-6983.1999>
- Longdon, B., Cao, C., Martinez, J., & Jiggins, F. M. (2013). Previous Exposure to an RNA Virus Does Not Protect against Subsequent Infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 8(9), e73833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073833>
- Longdon, B., Murray, G. G. R., Palmer, W. J., Day, J. P., Parker, D. J., Welch, J. J., Obbard,

- D. J., & Jiggins, F. M. (2015). The evolution, diversity, and host associations of rhabdoviruses. *Virus Evolution*, *1*(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vev014>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, M. Y., & Chtarbanova, S. (2022). The role of micro RNAs (miRNAs) in the regulation of *Drosophila melanogaster*'s innate immunity. *Fly*, *16*(1), 382-396. <https://doi.org/10.1080/19336934.2022.2149204>
- Lu, R., Maduro, M., Li, F., Li, H. W., Broitman-Maduro, G., Li, W. X., & Ding, S. W. (2005). Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *436*(7053), 1040-1043. <https://doi.org/10.1038/nature03870>
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., & Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans : Cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrm1660>
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, *303*(5654), 95-98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>
- Luo, Y., He, P., Kanrar, N., Toth, K. F., & Aravin, A. A. (2022). *Maternally inherited siRNAs initiate piRNA cluster formation* (p. 2022.02.08.479612). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.02.08.479612>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family : A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, *19*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., & Maleszka, R. (2010). The Honey Bee Epigenomes : Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLOS Biology*, *8*(11), e1000506. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000506>
- Macchietto, M. G., Langlois, R. A., & Shen, S. S. (2020). Virus-induced transposable element expression up-regulation in human and mouse host cells. *Life Science Alliance*, *3*(2). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900536>
- Machado, P. M., Brandão, R. D., Cavaco, B. M., Eugénio, J., Bento, S., Nave, M., Rodrigues, P., Fernandes, A., & Vaz, F. (2007). Screening for a BRCA2 Rearrangement in High-Risk Breast/Ovarian Cancer Families : Evidence for a Founder Effect and Analysis of the Associated Phenotypes. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(15), 2027-2034. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.06.9443>
- Magwire, M. M., Bayer, F., Webster, C. L., Cao, C., & Jiggins, F. M. (2011). Successive increases in the resistance of *Drosophila* to viral infection through a transposon insertion followed by a Duplication. *PLoS Genetics*, *7*(10), e1002337. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002337>
- Magwire, M. M., Fabian, D. K., Schweyen, H., Cao, C., Longdon, B., Bayer, F., & Jiggins, F. M. (2012). Genome-Wide Association Studies Reveal a Simple Genetic Basis of Resistance to Naturally Coevolving Viruses in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genetics*, *8*(11), e1003057. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003057>
- Malone, C. D., Brennecke, J., Dus, M., Stark, A., McCombie, W. R., Sachidanandam, R., &

- Hannon, G. J. (2009). Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the *Drosophila* Ovary. *Cell*, *137*(3), 522-535. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.040>
- Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., González, D., Clemente, R., Ruiz-Díaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F., & Rodriguez, J. F. (2003). The Oligomerization Domain of VP3, the Scaffolding Protein of Infectious Bursal Disease Virus, Plays a Critical Role in Capsid Assembly. *Journal of Virology*, *77*(11), 6438-6449. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.11.6438-6449.2003>
- Marques, J. T., Kim, K., Wu, P.-H., Alleyne, T. M., Jafari, N., & Carthew, R. W. (2010). Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1735>
- Marques, J. T., Wang, J.-P., Wang, X., Oliveira, K. P. V. de, Gao, C., Aguiar, E. R. G. R., Jafari, N., & Carthew, R. W. (2013). Functional Specialization of the Small Interfering RNA Pathway in Response to Virus Infection. *PLOS Pathogens*, *9*(8), e1003579. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003579>
- Martens, J. H., O'Sullivan, R. J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., & Jenuwein, T. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *The EMBO Journal*, *24*(4), 800-812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600545>
- Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2009). A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*, *461*(7267), Article 7267. <https://doi.org/10.1038/nature08498>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, *3*. <https://doi.org/doi:10.14806/ej.17.1.200>
- Martinez, J., Bruner-Montero, G., Arunkumar, R., Smith, S. C. L., Day, J. P., Longdon, B., & Jiggins, F. M. (2019). Virus evolution in *Wolbachia*-infected *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1914), 20192117. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2117>
- Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.-S., Miller, W. J., Bourtzis, K., Teixeira, L., & Jiggins, F. M. (2014). Symbionts Commonly Provide Broad Spectrum Resistance to Viruses in Insects: A Comparative Analysis of *Wolbachia* Strains. *PLoS Pathogens*, *10*(9), e1004369. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004369>
- Martins, N. E., Faria, V. G., Teixeira, L., Magalhães, S., & Sucena, É. (2013). Host Adaptation Is Contingent upon the Infection Route Taken by Pathogens. *PLoS Pathogens*, *9*(9), e1003601. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003601>
- Martins, N., Lemoine, A., Santiago, E., Paro, S., Imler, J.-L., & Meignin, C. (2019). A Transgenic Flock House Virus Replicon Reveals an RNAi Independent Antiviral Mechanism Acting in *Drosophila* Follicular Somatic Cells. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, *9*(2), 403-412. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200872>
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *36*(6), 344-355. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
- McClintock, B. (1951). Chromosome Organisation and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *16*(0), 13-47.

- <https://doi.org/10.1101/SQB.1951.016.01.004>
- McClintock, B. (1953). Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics*, 38(6), 579-599.
- McClintock, B. (1956). Controlling Elements and the Gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21, 197-216. <https://doi.org/10.1101/SQB.1956.021.01.017>
- Medd, N. C., Fellous, S., Waldron, F. M., Xuéreb, A., Nakai, M., Cross, J. V., & Obbard, D. J. (2018). The virome of *Drosophila suzukii*, an invasive pest of soft fruit. *Virus Evolution*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey009>
- Mérel, V., Boulesteix, M., Fablet, M., & Vieira, C. (2020). Transposable elements in *Drosophila*. *Mobile DNA*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13100-020-00213-z>
- Merenciano, M. (2020). *Deciphering the molecular and phenotypic effects of a Drosophila melanogaster transposable element located in a unique insertional cluster*. <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/180959>
- Merenciano, M., & González, J. (2023). The Interplay Between Developmental Stage and Environment Underlies the Adaptive Effect of a Natural Transposable Element Insertion. *Molecular Biology and Evolution*, 40(3), msad044. <https://doi.org/10.1093/molbev/msad044>
- Merenciano, M., Ullastres, A., de Cara, M. A. R., Barrón, M. G., & González, J. (2016). Multiple Independent Retroelement Insertions in the Promoter of a Stress Response Gene Have Variable Molecular and Functional Effects in *Drosophila*. *PLOS Genetics*, 12(8), e1006249. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006249>
- Merkling, S. H., Bronkhorst, A. W., Kramer, J. M., Overheul, G. J., Schenck, A., & Van Rij, R. P. (2015). The Epigenetic Regulator G9a Mediates Tolerance to RNA Virus Infection in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, 11(4), e1004692. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004692>
- Merkling, S. H., & van Rij, R. P. (2013). Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 159-170. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.07.004>
- Merkling, S. H., & van Rij, R. P. (2015a). Analysis of resistance and tolerance to virus infection in *Drosophila*. *Nature Protocols*, 10(7), 1084-1097. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.071>
- Merkling, S. H., & van Rij, R. P. (2015b). Analysis of resistance and tolerance to virus infection in *Drosophila*. *Nature Protocols*, 10(7), 1084-1097. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.071>
- Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.-Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C., & McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403(6771), Article 6771. <https://doi.org/10.1038/35001608>
- Miesen, P., Joosten, J., & Rij, R. P. van. (2016). PIWIs Go Viral : Arbovirus-Derived piRNAs in Vector Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, 12(12), e1006017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006017>
- Miller, D. J., & Ahlquist, P. (2002). Flock House Virus RNA Polymerase Is a Transmembrane Protein with Amino-Terminal Sequences Sufficient for Mitochondrial Localization and Membrane Insertion. *Journal of Virology*, 76(19), 9856-9867.

- <https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9856-9867.2002>
- Miller, D. J., Schwartz, M. D., & Ahlquist, P. (2001). Flock House Virus RNA Replicates on Outer Mitochondrial Membranes in *Drosophila* Cells. *Journal of Virology*, *75*(23), 11664-11676. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.23.11664-11676.2001>
- Mohamed, M., Dang, N. T.-M., Ogyama, Y., Burlet, N., Mugat, B., Boulesteix, M., Mérel, V., Veber, P., Salces-Ortiz, J., Severac, D., Péliisson, A., Vieira, C., Sabot, F., Fablet, M., & Chambeyron, S. (2020). A Transposon Story: From TE Content to TE Dynamic Invasion of *Drosophila* Genomes Using the Single-Molecule Sequencing Technology from Oxford Nanopore. *Cells*, *9*(8), 1776. <https://doi.org/10.3390/cells9081776>
- Mohn, F., Handler, D., & Brennecke, J. (2015). PiRNA-guided slicing specifies transcripts for Zucchini-dependent, phased piRNA biogenesis. *Science*, *348*(6236), 812-817. <https://doi.org/10.1126/science.aaa1039>
- Mondotte, J. A., Gausson, V., Frangeul, L., Blanc, H., Lambrechts, L., & Saleh, M.-C. (2018). Immune priming and clearance of orally acquired RNA viruses in *Drosophila*. *Nature Microbiology*, *3*(12), 1394-1403. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0265-9>
- Mondotte, J. A., & Saleh, M.-C. (2018). Antiviral Immune Response and the Route of Infection in *Drosophila melanogaster*. In *Advances in Virus Research* (Vol. 100, p. 247-278). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.006>
- Mongelli, V., Lequime, S., Kousathanas, A., Gausson, V., Blanc, H., Nigg, J., Quintana-Murci, L., Elena, S. F., & Saleh, M.-C. (2022). Innate immune pathways act synergistically to constrain RNA virus evolution in *Drosophila melanogaster*. *Nature Ecology & Evolution*, *6*(5), 565-578. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01697-z>
- Monsanto-Hearne, V., Asad, S., Asgari, S., & Johnson, K. N. (2017). *Drosophila* microRNA modulates viral replication by targeting a homologue of mammalian cJun. *Journal of General Virology*, *98*(7), 1904-1912. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000831>
- Monsanto-Hearne, V., & Johnson, K. N. (2018). MiRNAs in Insects Infected by Animal and Plant Viruses. *Viruses*, *10*(7), 354. <https://doi.org/10.3390/v10070354>
- Monsanto-Hearne, V., & Johnson, K. N. (2019). Micro-RNA Modulation of Insect Virus Replication. *Current Issues in Molecular Biology*, *34*(1), Article 1. <https://doi.org/10.21775/cimb.034.061>
- Monsion, B., Incarbone, M., Hleibieh, K., Poignavent, V., Ghannam, A., Dunoyer, P., Daeffler, L., Tilsner, J., & Ritzenthaler, C. (2018). Efficient Detection of Long dsRNA in Vitro and in Vivo Using the dsRNA Binding Domain from FHV B2 Protein. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 70. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00070>
- Moore, N. F., Kearns, A., & Pullin, J. S. K. (1980). Characterization of Cricket Paralysis Virus-Induced Polypeptides in *Drosophila* Cells. *Journal of Virology*, *33*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1128/jvi.33.1.1-9.1980>
- Moore, N. F., Reavy, B., Pullin, J. S. K., & Plus, N. (1981). The polypeptides induced in *Drosophila* cells by *Drosophila C* virus (strain Ouarzazate). *Virology*, *112*(2), 411-416. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90288-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90288-9)
- Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G. B., & Worm, B. (2011). How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, *9*(8), e1001127. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001127>
- Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2012).

- Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent piRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma. *PLOS Pathogens*, 8(1), e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>
- Moreira, L. R., Serrano, F. R., & Osuna, A. (2019). Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes : Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007163. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007163>
- Moy, R. H., Gold, B., Molleston, J. M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M.-V., Yagi, Y., Fitzgerald, K. A., Stanger, B. Z., Soldan, S. S., & Cherry, S. (2014). Antiviral Autophagy Restricts Rift Valley Fever Virus Infection and Is Conserved from Flies to Mammals. *Immunity*, 40(1), 51-65. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.020>
- Mukherjee, S., & Hanley, K. A. (2010). RNA interference modulates replication of dengue virus in *Drosophila melanogaster* cells. *BMC Microbiology*, 10(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-127>
- Mundt, E., Köllner, B., & Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, 71(7), 5647-5651. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.7.5647-5651.1997>
- Mussabekova, A., Daeffler, L., & Imler, J.-L. (2017). Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(11), 2039-2054. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2453-9>
- Myers, S., Freeman, C., Auton, A., Donnelly, P., & McVean, G. (2008). A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nature Genetics*, 40(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/ng.213>
- Myles, K. M., Wiley, M. R., Morazzani, E. M., & Adelman, Z. N. (2008). Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 19938-19943. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803408105>
- Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(6), 377-385. <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämet, M. (2014). The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3455-3462. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309>
- Nagy, E., & Dobos, P. (1984). Coding assignments of *drosophila* X virus genome Segments : In vitro translation of native and denatured virion dsRNA. *Virology*, 137(1), 58-66. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90008-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90008-4)
- Nainu, F., Tanaka, Y., Shiratsuchi, A., & Nakanishi, Y. (2015). Protection of Insects against Viral Infection by Apoptosis-Dependent Phagocytosis. *The Journal of Immunology*, 195(12), 5696-5706. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500613>
- Naitza, S., Rossé, C., Kappler, C., Georgel, P., Belvin, M., Gubb, D., Camonis, J., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J.-M. (2002). The *Drosophila* Immune Defense against Gram-Negative Infection Requires the Death Protein dFADD. *Immunity*, 17(5), 575-581. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00454-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00454-5)
- Nakamoto, M., Moy, R. H., Xu, J., Bambina, S., Yasunaga, A., Shelly, S. S., Gold, B., & Cherry, S. (2012). Virus Recognition by Toll-7 Activates Antiviral Autophagy in *Drosophila*. *Immunity*, 36(4), 658-667. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.003>



- Nalçacıoğlu, R., Marks, H., Vlak, J. M., Demirbağ, Z., & van Oers, M. M. (2003). Promoter analysis of the Chilo iridescent virus DNA polymerase and major capsid protein genes. *Virology*, *317*(2), 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.007>
- Nalçacıoğlu, R., Ince, I. A., & Demirbağ, Z. (2009). The biology of Chilo iridescent virus. *Virologica Sinica*, *24*(4), 285-294. <https://doi.org/10.1007/s12250-009-3051-2>
- Nangia, S., Boyd, K. J., & May, E. R. (2020). Molecular dynamics study of membrane permeabilization by wild-type and mutant lytic peptides from the non-enveloped Flock House virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1862*(2), 183102. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183102>
- Nayak, A., Berry, B., Tassetto, M., Kunitomi, M., Acevedo, A., Deng, C., Krutchinsky, A., Gross, J., Antoniewski, C., & Andino, R. (2010). Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in Drosophila. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1810>
- Nayak, A., Tassetto, M., Kunitomi, M., & Andino, R. (2013). RNA Interference-Mediated Intrinsic Antiviral Immunity in Invertebrates. In B. R. Cullen (Éd.), *Intrinsic Immunity* (p. 183-200). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37765-5_7)
- Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(11), a028423. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
- Neyen, C., Bretscher, A. J., Binggeli, O., & Lemaitre, B. (2014). Methods to study Drosophila immunity. *Methods*, *68*(1), 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.023>
- Nicetto, D., & Zaret, K. S. (2019). Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current Opinion in Genetics & Development*, *55*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.013>
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, *4*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Niu, X.-M., Xu, Y.-C., Li, Z.-W., Bian, Y.-T., Hou, X.-H., Chen, J.-F., Zou, Y.-P., Jiang, J., Wu, Q., Ge, S., Balasubramanian, S., & Guo, Y.-L. (2019). Transposable elements drive rapid phenotypic variation in *Capsella rubella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(14), 6908-6913. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811498116>
- Nowoshilow, S., Schloissnig, S., Fei, J.-F., Dahl, A., Pang, A. W. C., Pippel, M., Winkler, S., Hastie, A. R., Young, G., Roscito, J. G., Falcon, F., Knapp, D., Powell, S., Cruz, A., Cao, H., Habermann, B., Hiller, M., Tanaka, E. M., & Myers, E. W. (2018). The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*, *554*(7690), Article 7690. <https://doi.org/10.1038/nature25458>
- Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature*, *287*(5785), Article 5785. <https://doi.org/10.1038/287795a0>
- Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H., & Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1513), 99-115. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>

- Obbard, D. J., Jiggins, F. M., Halligan, D. L., & Little, T. J. (2006). Natural Selection Drives Extremely Rapid Evolution in Antiviral RNAi Genes. *Current Biology*, *16*(6), 580-585. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.065>
- Obbard, D. J., MacLennan, J., Kim, K.-W., Rambaut, A., O'Grady, P. M., & Jiggins, F. M. (2012). Estimating Divergence Dates and Substitution Rates in the *Drosophila* Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(11), 3459-3473. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss150>
- O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J., & Atkinson, P. W. (1994). *Interplasmid transposition of Drosophilahoboelements in non-drosophilid insects*.
- Odegard, A., Banerjee, M., & Johnson, J. E. (2010). Flock House Virus : A Model System for Understanding Non-Enveloped Virus Entry and Membrane Penetration. In J. E. Johnson (Éd.), *Cell Entry by Non-Enveloped Viruses* (Vol. 343, p. 1-22). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_35](https://doi.org/10.1007/82_2010_35)
- O'Grady, P. M., & DeSalle, R. (2018). Phylogeny of the Genus *Drosophila*. *Genetics*, *209*(1), 1-25. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300583>
- Okada, N., & Hamada, M. (1997). The 3' ends of tRNA-derived SINEs originated from the 3' ends of LINEs: A new example from the bovine genome. *Journal of Molecular Evolution*, *44*(1), S52-S56. <https://doi.org/10.1007/PL00000058>
- Okamura, K., Chung, W.-J., Ruby, J. G., Guo, H., Bartel, D. P., & Lai, E. C. (2008). The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature*, *453*(7196), Article 7196. <https://doi.org/10.1038/nature07015>
- Okamura, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & Development*, *18*(14), 1655-1666. <https://doi.org/10.1101/gad.1210204>
- Oliveira, D. S., Fablet, M., Larue, A., Vallier, A., Carareto, C. M. A., Rebollo, R., & Vieira, C. (2022). *ChimeraTE : A pipeline to detect chimeric transcripts derived from genes and transposable elements* [Preprint]. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/2022.09.05.505575>
- Olmo, R. P., Martins, N. E., Aguiar, E. R. G. R., Marques, J. T., & Imler, J.-L. (2019). The insect reservoir of biodiversity for viruses and for antiviral mechanisms. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *91*(suppl 3), e20190122. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190122>
- Orban, T. I., & Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA*, *11*(4), 459-469. <https://doi.org/10.1261/rna.7231505>
- Orgel, L. E., & Crick, F. H. C. (1980). Selfish DNA : The ultimate parasite. *Nature*, *284*(5757), Article 5757. <https://doi.org/10.1038/284604a0>
- Padmanabha, D., & Baker, K. D. (2014). *Drosophila* gains traction as a repurposed tool to investigate metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *25*(10), 518-527. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.03.011>
- Pal-Bhadra, M., Leibovitch, B. A., Gandhi, S. G., Rao, M., Bhadra, U., Birchler, J. A., & Elgin, S. C. R. (2004). Heterochromatic Silencing and HP1 Localization in *Drosophila* Are Dependent on the RNAi Machinery. *Science*, *303*(5658), 669-672. <https://doi.org/10.1126/science.1092653>

- Palmer, W., Varghese, F., & van Rij, R. (2018). Natural Variation in Resistance to Virus Infection in Dipteran Insects. *Viruses*, *10*(3), 118. <https://doi.org/10.3390/v10030118>
- Pan, M.-R., Hsu, M.-C., Chen, L.-T., & Hung, W.-C. (2018). Orchestration of H3K27 methylation : Mechanisms and therapeutic implication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(2), 209-223. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8>
- Panek, J., Alaoui, H. E., Mone, A., Urbach, S., Demette, E., Texier, C., Brun, C., Zanzoni, A., Peyretailade, E., Parisot, N., Lerat, E., Peyret, P., Delbac, F., & Biron, D. G. (2014). Hijacking of Host Cellular Functions by an Intracellular Parasite, the Microsporidian *Anncaliia algerae*. *PLOS ONE*, *9*(6), e100791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100791>
- Paquette, N., Broemer, M., Aggarwal, K., Chen, L., Husson, M., Ertürk-Hasdemir, D., Reichhart, J.-M., Meier, P., & Silverman, N. (2010). Caspase-Mediated Cleavage, IAP Binding, and Ubiquitination : Linking Three Mechanisms Crucial for Drosophila NF- $\kappa$ B Signaling. *Molecular Cell*, *37*(2), 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.036>
- Paradkar, P. N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.-B., & Walker, P. J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in Culex mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(46), 18915-18920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205231109>
- Pardue, M.-L., & DeBaryshe, P. G. (2003). Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. *Annual Review of Genetics*, *37*(1), 485-511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.093115>
- Paul, A. V., & Wimmer, E. (2015). Initiation of protein-primed picornavirus RNA synthesis. *Virus Research*, *206*, 12-26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.12.028>
- Perrat, P. N., DasGupta, S., Wang, J., Theurkauf, W., Weng, Z., Rosbash, M., & Waddell, S. (2013). Transposition-Driven Genomic Heterogeneity in the Drosophila Brain. *Science*, *340*(6128), 91-95. <https://doi.org/10.1126/science.1231965>
- Petit, M. (2016). *Characterization of the piRNA pathway during viral infection in Drosophila Melanogaster* [Université Pierre et Marie Curie]. <https://theses.hal.science/tel-01444696>
- Petit, M., Mongelli, V., Frangeul, L., Blanc, H., Jiggins, F., & Saleh, M.-C. (2016). PiRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1607952113>
- Petrillo, J. E., Venter, P. A., Short, J. R., Gopal, R., Deddouche, S., Lamiable, O., Imler, J.-L., & Schneemann, A. (2013). Cytoplasmic Granule Formation and Translational Inhibition of Nodaviral RNAs in the Absence of the Double-Stranded RNA Binding Protein B2. *Journal of Virology*, *87*(24), 13409-13421. <https://doi.org/10.1128/JVI.02362-13>
- Pimpinelli, S., Gatti, M., & De Marco, A. (1975). Evidence for heterogeneity in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, *256*(5515), Article 5515. <https://doi.org/10.1038/256335a0>
- Plus, N., Croizier, G., Jousset, F., & David, J. (1975). Picornaviruses of laboratory and wild *Drosophila melanogaster* : Geographical distribution and serotypic composition. *Annales de microbiologie*, *126*(1), 107—117.

- Poirier, E. Z., Goic, B., Tomé-Poderti, L., Frangeul, L., Boussier, J., Gausson, V., Blanc, H., Vallet, T., Loyd, H., Levi, L. I., Lanciano, S., Baron, C., Merklings, S. H., Lambrechts, L., Mirouze, M., Carpenter, S., Vignuzzi, M., & Saleh, M.-C. (2018). Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects. *Cell Host & Microbe*, *23*(3), 353-365.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.02.001>
- Prangishvili, D., Forterre, P., & Garrett, R. A. (2006). Viruses of the Archaea : A unifying view. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(11), 837-848. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1527>
- Pritham, E. J., Putliwala, T., & Feschotte, C. (2007). Mavericks, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene*, *390*(1), 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.008>
- Quadrana, L., Bortolini Silveira, A., Mayhew, G. F., LeBlanc, C., Martienssen, R. A., Jeddloh, J. A., & Colot, V. (2016). The Arabidopsis thaliana mobilome and its impact at the species level. *eLife*, *5*, e15716. <https://doi.org/10.7554/eLife.15716>
- Rebollo, R., Karimi, M. M., Bilenky, M., Gagnier, L., Miceli-Royer, K., Zhang, Y., Goyal, P., Keane, T. M., Jones, S., Hirst, M., Lorincz, M. C., & Mager, D. L. (2011). Retrotransposon-Induced Heterochromatin Spreading in the Mouse Revealed by Insertional Polymorphisms. *PLoS Genetics*, *7*(9), e1002301. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002301>
- Rech, G. E., Bogaerts-Márquez, M., Barrón, M. G., Merenciano, M., Villanueva-Cañas, J. L., Horváth, V., Fiston-Lavier, A.-S., Luyten, I., Venkataram, S., Quesneville, H., Petrov, D. A., & González, J. (2019). Stress response, behavior, and development are shaped by transposable element-induced mutations in Drosophila. *PLOS Genetics*, *15*(2), e1007900. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007900>
- Reed, L. J., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, *27*(3), 493-497. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Revet, B., & Delain, E. (1982). The Drosophila X virus contains a 1- $\mu$ M double-stranded RNA circularized by a 67-kd terminal protein : High-resolution denaturation mapping of its genome. *Virology*, *123*(1), 29-44. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(82\)90292-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(82)90292-6)
- Riegler, M., Sidhu, M., Miller, W. J., & O'Neill, S. L. (2005). Evidence for a Global Wolbachia Replacement in Drosophila melanogaster. *Current Biology*, *15*(15), 1428-1433. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.069>
- Roberts, A., & Pachter, L. (2013). Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nature Methods*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2251>
- Rodriguez-Terrones, D., & Torres-Padilla, M.-E. (2018). Nimble and Ready to Mingle : Transposon Outbursts of Early Development. *Trends in Genetics*, *34*(10), 806-820. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.06.006>
- Romans, P., Bhattacharyya, R. K., & Colavita, A. (1998). Ikirara, a novel transposon family from the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. *Insect Molecular Biology*, *7*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.1998.71046.x>
- Rosch, R., Burrows, D. R. W., Jones, L. B., Peters, C. H., Ruben, P., & Samarut, É. (2019). Functional Genomics of Epilepsy and Associated Neurodevelopmental Disorders Using

- Simple Animal Models: From Genes, Molecules to Brain Networks. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2019.00556>
- Rosendo Machado, S., van der Most, T., & Miesen, P. (2021). Genetic determinants of antiviral immunity in dipteran insects – Compiling the experimental evidence. *Developmental & Comparative Immunology*, 119, 104010. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104010>
- Ross, R. J., Weiner, M. M., & Lin, H. (2014). PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*, 505(7483), 353-359. <https://doi.org/10.1038/nature12987>
- Roy, M., Viginier, B., Mayeux, C. A., Ratinier, M., & Fablet, M. (2021). Infections by Transovarially Transmitted DMelSV in *Drosophila* Have No Impact on Ovarian Transposable Element Transcripts but Increase Their Amounts in the Soma. *Genome Biology and Evolution*, 13(9), evab207. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab207>
- Roy, M., Viginier, B., Saint-Michel, É., Arnaud, F., Ratinier, M., & Fablet, M. (2020). Viral infection impacts transposable element transcript amounts in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(22), 12249-12257. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006106117>
- Rozhkov, N. V., Hammell, M., & Hannon, G. J. (2013). Multiple roles for Piwi in silencing *Drosophila* transposons. *Genes & Development*, 27(4), 400-412. PubMed. <https://doi.org/10.1101/gad.209767.112>
- Saadin, A., & Starz-Gaiano, M. (2016). Identification of Novel Regulators of the JAK/STAT Signaling Pathway that Control Border Cell Migration in the *Drosophila* Ovary. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 6(7), 1991-2002. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028100>
- Sabatier, L., Jouanguy, E., Dostert, C., Zachary, D., Dimarcq, J.-L., Bulet, P., & Imler, J.-L. (2003). Pherokine-2 and -3. *European Journal of Biochemistry*, 270(16), 3398-3407. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03725.x>
- Sabin, L. R., Zheng, Q., Thekkat, P., Yang, J., Hannon, G. J., Gregory, B. D., Tudor, M., & Cherry, S. (2013). Dicer-2 Processes Diverse Viral RNA Species. *PLOS ONE*, 8(2), e55458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055458>
- Sackton, T. B., Lazzaro, B. P., Schlenke, T. A., Evans, J. D., Hultmark, D., & Clark, A. G. (2007). Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*. *Nature Genetics*, 39(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.60>
- Saito, K., Ishizuka, A., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2005). Processing of Pre-microRNAs by the Dicer-1–Loquacious Complex in *Drosophila* Cells. *PLOS Biology*, 3(7), e235. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030235>
- Saleh, M.-C., Tassetto, M., van Rij, R. P., Goic, B., Gausson, V., Berry, B., Jacquier, C., Antoniewski, C., & Andino, R. (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458(7236), 346-350. <https://doi.org/10.1038/nature07712>
- Saleh, M.-C., van Rij, R. P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O’Farrell, P. H., & Andino, R. (2006). The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nature Cell Biology*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/ncb1439>
- Samuelson, L. C., Wiebauer, K., Snow, C. M., & Meisler, M. H. (1990). Retroviral and Pseudogene Insertion Sites Reveal the Lineage of Human Salivary and Pancreatic Amylase Genes from a Single Gene during Primate Evolution. *Molecular and Cellular*

- Biology*, 10(6), 2513-2520. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.6.2513-2520.1990>
- Sánchez, A. B., & Rodriguez, J. F. (1999). Proteolytic Processing in Infectious Bursal Disease Virus : Identification of the Polyprotein Cleavage Sites by Site-Directed Mutagenesis. *Virology*, 262(1), 190-199. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9910>
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733-9748. <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>
- Santos, D., Feng, M., Kolliopoulou, A., Taning, C. N. T., Sun, J., & Swevers, L. (2023). What Are the Functional Roles of Piwi Proteins and piRNAs in Insects? *Insects*, 14(2), 187. <https://doi.org/10.3390/insects14020187>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863-864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., Liang, C., Zhang, J., Fulton, L., Graves, T. A., Minx, P., Reily, A. D., Courtney, L., Kruchowski, S. S., Tomlinson, C., Strong, C., Delehaunty, K., Fronick, C., Courtney, B., ... Wilson, R. K. (2009). The B73 Maize Genome : Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science*, 326(5956), 1112-1115. <https://doi.org/10.1126/science.1178534>
- Schneemann, A., Reddy, V., & Johnson, J. E. (1998). The Structure and Function of Nodavirus Particles : A Paradigm for Understanding Chemical Biology. In K. Maramorosch, F. A. Murphy, & A. J. Shatkin (Éds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 50, p. 381-446). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60812-X](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60812-X)
- Schneider, J., & Imler, J.-L. (2021). Sensing and signalling viral infection in drosophila. *Developmental & Comparative Immunology*, 117, 103985. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103985>
- Schnettler, E., Sterken, M. G., Leung, J. Y., Metz, S. W., Geertsema, C., Goldbach, R. W., Vlak, J. M., Kohl, A., Khromykh, A. A., & Pijlman, G. P. (2012). Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 86(24), 13486-13500. <https://doi.org/10.1128/jvi.01104-12>
- Schrader, L., & Schmitz, J. (2019). The impact of transposable elements in adaptive evolution. *Molecular Ecology*, 28(6), 1537-1549. <https://doi.org/10.1111/mec.14794>
- Schultz, M. J., Frydman, H. M., & Connor, J. H. (2018). Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in Aedes mosquito cells. *Virology*, 518, 406-413. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.022>
- Scotti, P. D., Dearing, S. C., & Mosso, D. W. (1983). *Flock House Virus : A Nodavirus Isolated from Coslelgra Zealandica (White) (Coleoptera : Searabaeidae)*.
- Seeholzer, L. F., Seppo, M., Stern, D. L., & Ruta, V. (2018). Evolution of a central neural circuit underlies Drosophila mate preferences. *Nature*, 559(7715), Article 7715. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0322-9>
- Selvaraju, D., Wierzbicki, F., & Kofler, R. (2022). *P-element invasions in Drosophila erecta shed light on the establishment of host control over a transposable element* (p. 2022.12.22.521571). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.12.22.521571>
- Sessegolo, C., Bulet, N., & Haudry, A. (2016). Strong phylogenetic inertia on genome size and transposable element content among 26 species of flies. *Biology Letters*, 12(8), 20160407. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0407>
- Settles, E. W., & Friesen, P. D. (2008). Flock House Virus Induces Apoptosis by Depletion of

- Drosophila* Inhibitor-of-Apoptosis Protein DIAP1. *Journal of Virology*, 82(3), 1378-1388. <https://doi.org/10.1128/JVI.01941-07>
- Shao, C., Sun, S., Liu, K., Wang, J., Li, S., Liu, Q., Deagle, B. E., Seim, I., Biscontin, A., Wang, Q., Liu, X., Kawaguchi, S., Liu, Y., Jarman, S., Wang, Y., Wang, H.-Y., Huang, G., Hu, J., Feng, B., ... Fan, G. (2023). The enormous repetitive Antarctic krill genome reveals environmental adaptations and population insights. *Cell*, 186(6), 1279-1294.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.005>
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects : The same, with differences ? *Virulence*, 9(1), 1625-1639. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., & Cherry, S. (2009). Autophagy Is an Essential Component of *Drosophila* Immunity against Vesicular Stomatitis Virus. *Immunity*, 30(4), 588-598. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.009>
- Shen, E.-Z., Chen, H., Ozturk, A. R., Tu, S., Shirayama, M., Tang, W., Ding, Y.-H., Dai, S.-Y., Weng, Z., & Mello, C. C. (2018). Identification of piRNA Binding Sites Reveals the Argonaute Regulatory Landscape of the *C. elegans* Germline. *Cell*, 172(5), 937-951.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.002>
- Shen, R., Zheng, K., Zhou, Y., Chi, X., Pan, H., Wu, C., Yang, Y., Zheng, Y., Pan, D., & Liu, B. (2022). A dRASSF-STRIPAK-Imd-JAK/STAT axis controls antiviral immune response in *Drosophila*. *Cell Reports*, 40(4), 111143. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111143>
- Shi, M., Lin, X.-D., Tian, J.-H., Chen, L.-J., Chen, X., Li, C.-X., Qin, X.-C., Li, J., Cao, J.-P., Eden, J.-S., Buchmann, J., Wang, W., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2016). Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*, 540(7634), 539-543. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- Shi, M., Lin, X.-D., Vasilakis, N., Tian, J.-H., Li, C.-X., Chen, L.-J., Eastwood, G., Diao, X.-N., Chen, M.-H., Chen, X., Qin, X.-C., Widen, S. G., Wood, T. G., Tesh, R. B., Xu, J., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2015). Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *Journal of Virology*, 90(2), 659-669. <https://doi.org/10.1128/JVI.02036-15>
- Sienski, G., Dönertas, D., & Brennecke, J. (2012). Transcriptional Silencing of Transposons by Piwi and Maelstrom and Its Impact on Chromatin State and Gene Expression. *Cell*, 151(5), 964-980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040>
- Signor, S. (2020). Transposable elements in individual genotypes of *Drosophila simulans*. *Ecology and Evolution*, 10(7), 3402-3412. <https://doi.org/10.1002/ece3.6134>
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., & Chandler, M. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. In N. L. Craig, M. Chandler, M. Gellert, A. M. Lambowitz, P. A. Rice, & S. B. Sandmeyer (Éds.), *Mobile DNA III* (p. 555-590). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555819217.ch26>
- Simões, P. M., Mialdea, G., Reiss, D., Sagot, M.-F., & Charlat, S. (2011). Wolbachia detection : An assessment of standard PCR Protocols. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 567-572. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02955.x>
- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2009). On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457(7228), Article 7228. <https://doi.org/10.1038/nature07754>

- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs : The vanguard of genome defence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3089>
- Sironi, M., Hasnain, S. E., Rosenthal, B., Phan, T., Luciani, F., Shaw, M.-A., Sallum, M. A., Mirhashemi, M. E., Morand, S., & González-Candelas, F. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19: A genetic, epidemiological, and evolutionary perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, *84*, 104384. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104384>
- Siudeja, K., van den Beek, M., Riddiford, N., Boumard, B., Wurmser, A., Stefanutti, M., Lameiras, S., & Bardin, A. J. (2021). Unraveling the features of somatic transposition in the *Drosophila* intestine. *The EMBO Journal*, *40*(9), e106388. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106388>
- Skalsky, R. L., & Cullen, B. R. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 123-141. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134243>
- Skvortsova, K., Iovino, N., & Bogdanović, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>
- Slotkin, R. K., & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, *8*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrg2072>
- Son, K.-N., Liang, Z., & Lipton, H. L. (2015). Double-Stranded RNA Is Detected by Immunofluorescence Analysis in RNA and DNA Virus Infections, Including Those by Negative-Stranded RNA Viruses. *Journal of Virology*, *89*(18), 9383-9392. <https://doi.org/10.1128/JVI.01299-15>
- Song, W. J., Qin, Q. W., Qiu, J., Huang, C. H., Wang, F., & Hew, C. L. (2004). Functional Genomics Analysis of Singapore Grouper Iridovirus: Complete Sequence Determination and Proteomic Analysis. *Journal of Virology*, *78*(22), 12576-12590. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12576-12590.2004>
- Song, X., & Cao, X. (2017). Transposon-mediated epigenetic regulation contributes to phenotypic diversity and environmental adaptation in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, *36*, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.02.004>
- Sousa-Victor, P., Ayyaz, A., Hayashi, R., Qi, Y., Madden, D. T., Lunyak, V. V., & Jasper, H. (2017). Piwi Is Required to Limit Exhaustion of Aging Somatic Stem Cells. *Cell Reports*, *20*(11), 2527-2537. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.059>
- Spaller, T., Kling, E., Glöckner, G., Hillmann, F., & Winckler, T. (2016). Convergent evolution of tRNA gene targeting preferences in compact genomes. *Mobile DNA*, *7*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13100-016-0073-9>
- Spradling, A. C., Bellen, H. J., & Hoskins, R. A. (2011). *Drosophila* P elements preferentially transpose to replication origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(38), 15948-15953. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112960108>
- Stec, W., Vidal, O., & Zeidler, M. P. (2013). *Drosophila* SOCS36E negatively regulates JAK/STAT pathway signaling via two separable mechanisms. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(18), 3000-3009. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0275>
- Stork, N. E. (2018). How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There



- on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63(1), 31-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Stöven, S., Silverman, N., Junell, A., Hedengren-Olcott, M., Erturk, D., Engström, Y., Maniatis, T., & Hultmark, D. (2003). Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF- $\kappa$ B factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5991-5996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1035902100>
- Strand, M. R. (2008). *Insect hemocytes and their role in immunity* (Vol. 32). Insect immunology.
- Strobel, E., Dunsmuir, P., & Rubin, G. M. (1979). Polymorphisms in the chromosomal locations of elements of the 412, copia and 297 dispersed repeated gene families in *drosophila*. *Cell*, 17(2), 429-439. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90169-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90169-7)
- Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. A. (2008). Phagocytosis and comparative innate immunity : Learning on the fly. *Nature Reviews Immunology*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nri2240>
- Sturtevant, A. H. (1920). Genetic Studies on DROSOPHILA SIMULANS. I. Introduction. Hybrids with DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics*, 5(5), 488-500.
- Sultana, T., van Essen, D., Siol, O., Bailly-Bechet, M., Philippe, C., Zine El Aabidine, A., Pioger, L., Nigumann, P., Sacconi, S., Andrau, J.-C., Gilbert, N., & Cristofari, G. (2019). The Landscape of L1 Retrotransposons in the Human Genome Is Shaped by Pre-insertion Sequence Biases and Post-insertion Selection. *Molecular Cell*, 74(3), 555-570.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.036>
- Sultana, T., Zamborlini, A., Cristofari, G., & Lesage, P. (2017). Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nature Reviews Genetics*, 18(5), 292-308. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.7>
- Sundaram, V., & Wysocka, J. (2020). Transposable elements as a potent source of diverse cis-regulatory sequences in mammalian genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1795), 20190347. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0347>
- Suvorov, A., Kim, B. Y., Wang, J., Armstrong, E. E., Peede, D., D'Agostino, E. R. R., Price, D. K., Waddell, P. J., Lang, M., Courtier-Orgogozo, V., David, J. R., Petrov, D., Matute, D. R., Schrider, D. R., & Comeault, A. A. (2022). Widespread introgression across a phylogeny of 155 *Drosophila* genomes. *Current Biology*, 32(1), 111-123.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.10.052>
- Suzuki, Y., Frangeul, L., Dickson, L. B., Blanc, H., Verdier, Y., Vinh, J., Lambrechts, L., & Saleh, M.-C. (2017). Uncovering the Repertoire of Endogenous Flaviviral Elements in *Aedes* Mosquito Genomes. *Journal of Virology*, 91(15), e00571-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00571-17>
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., & Shinkai, Y. (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 25309-25317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101914200>
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., & Shinkai, Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early

- embryogenesis. *Genes & Development*, *16*(14), 1779-1791. <https://doi.org/10.1101/gad.989402>
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., & Shinkai, Y. (2005). Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes & Development*, *19*(7), 815-826. <https://doi.org/10.1101/gad.1284005>
- Tacken, M. G. J., Peeters, B. P. H., Thomas, A. A. M., Rottier, P. J. M., & Boot, H. J. (2002). Infectious Bursal Disease Virus Capsid Protein VP3 Interacts both with VP1, the RNA-Dependent RNA Polymerase, and with Viral Double-Stranded RNA. *Journal of Virology*, *76*(22), 11301-11311. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.22.11301-11311.2002>
- Tafesh-Edwards, G., & Eleftherianos, I. (2020). Drosophila immunity against natural and nonnatural viral pathogens. *Virology*, *540*, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.12.001>
- Tang, X., Liu, N., Qi, H., & Lin, H. (2023). Piwi maintains homeostasis in the Drosophila adult intestine. *Stem Cell Reports*, *18*(2), 503-518. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.01.001>
- Tassetto, M., Kunitomi, M., & Andino, R. (2017). Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in Drosophila. *Cell*, *169*(2), 314-325.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.033>
- Teixeira, L., Ferreira, Á., & Ashburner, M. (2008). The Bacterial Symbiont Wolbachia Induces Resistance to RNA Viral Infections in Drosophila melanogaster. *PLoS Biology*, *6*(12), e1000002. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000002>
- Tenaillon, M. I., Hollister, J. D., & Gaut, B. S. (2010). A triptych of the evolution of plant transposable elements. *Trends in Plant Science*, *15*(8), 471-478. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.003>
- Teninges, D., Ohanessian, A., Richard-Molard, C., & Contamine, D. (1979). Isolation and Biological Properties of Drosophila X Virus. *Journal of General Virology*, *42*(2), 241-254. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-42-2-241>
- Terzian, C., Péliisson, A., & Bucheton, A. (2001). Evolution and phylogeny of insect endogenous retroviruses. *BMC Evolutionary Biology*, *1*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-1-3>
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, *408*(6814), Article 6814. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Thomas, J., & Pritham, E. J. (2015). Helitrons, the Eukaryotic Rolling-circle Transposable Elements. In *Mobile DNA III* (p. 891-924). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1128/9781555819217.ch40>
- Thomson, T. C., Schneemann, A., & Johnson, J. (2012). Oocyte destruction is activated during viral infection. *Genesis*, *50*(6), 453-465. <https://doi.org/10.1002/dvg.22004>
- Tie, C. H., & Rowe, H. M. (2017). Epigenetic control of retrotransposons in adult tissues : Implications for immune regulation. *Current Opinion in Virology*, *25*, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.06.007>
- Todeschini, A.-L., Teyssset, L., Delmarre, V., & Ronsseray, S. (2010). The Epigenetic Trans-Silencing Effect in Drosophila Involves Maternally-Transmitted Small RNAs Whose

- Production Depends on the piRNA Pathway and HP1. *PLOS ONE*, 5(6), e11032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011032>
- Touret, F., Guiguen, F., & Terzian, C. (2014). *Wolbachia* Influences the Maternal Transmission of the *gypsy* Endogenous Retrovirus in *Drosophila melanogaster*. *MBio*, 5(5), e01529-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01529-14>
- Trivedi, S., & Starz-Gaiano, M. (2018). *Drosophila* Jak/STAT Signaling: Regulation and Relevance in Human Cancer and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms19124056>
- Tsai, C.-T., Lin, C.-H., & Chang, C.-Y. (2007). Analysis of codon usage bias and base compositional constraints in iridovirus genomes. *Virus Research*, 126(1), 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.03.001>
- Tsukahara, S., Kawabe, A., Kobayashi, A., Ito, T., Aizu, T., Shin-i, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Tarutani, Y., & Kakutani, T. (2012). Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of *Arabidopsis lyrata*. *Genes & Development*, 26(7), 705-713. <https://doi.org/10.1101/gad.183871.111>
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., & Kakutani, T. (2009). Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature*, 461(7262), 423-426. <https://doi.org/10.1038/nature08351>
- Turelli, M., Katznelson, A., & Ginsberg, P. S. (2022). Why *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is so common. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(47), e2211637119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2211637119>
- Ullastres, A., Merenciano, M., & González, J. (2021). Regulatory regions in natural transposable element insertions drive interindividual differences in response to immune challenges in *Drosophila*. *Genome Biology*, 22(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02471-3>
- Unckless, R. L. (2011). A DNA Virus of *Drosophila*. *PLoS ONE*, 6(10), e26564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026564>
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämet, M. (2011). The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2), 649-656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Valli, A., Busnadiago, I., Maliogka, V., Ferrero, D., Castón, J. R., Rodríguez, J. F., & García, J. A. (2012). The VP3 Factor from Viruses of Birnaviridae Family Suppresses RNA Silencing by Binding Both Long and Small RNA Duplexes. *PLOS ONE*, 7(9), e45957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045957>
- van Cleef, K. W. R., van Mierlo, J. T., Miesen, P., Overheul, G. J., Fros, J. J., Schuster, S., Marklewitz, M., Pijlman, G. P., Junglen, S., & van Rij, R. P. (2014). Mosquito and *Drosophila* entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Research*, 42(13), 8732-8744. <https://doi.org/10.1093/nar/gku528>
- van Mierlo, J. T., Bronkhorst, A. W., Overheul, G. J., Sadanandan, S. A., Ekström, J.-O., Heestermans, M., Hultmark, D., Antoniewski, C., & van Rij, R. P. (2012). Convergent Evolution of Argonaute-2 Slicer Antagonism in Two Distinct Insect RNA Viruses. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002872. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002872>
- van Rij, R. P., Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., & Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes & Development*, 20(21), 2985-2995.

- <https://doi.org/10.1101/gad.1482006>
- Venes, D. (2017). *Taber's Cyclopedic Medical Dictionary*. F.A. Davis.
- Venkataraman, S., Prasad, B. V. L. S., & Selvarajan, R. (2018). RNA Dependent RNA Polymerases : Insights from Structure, Function and Evolution. *Viruses*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/v10020076>
- Venter, P. A., & Schneemann, A. (2008). Recent insights into the biology and biomedical applications of Flock House virus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*(17), 2675-2687. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8037-y>
- Vicient, C. M., & Casacuberta, J. M. (2017). Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. *Annals of Botany*, *120*(2), 195-207. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx078>
- Vidal, N. M., Ludwig, A., & Loreto, E. L. S. (2009). Evolution of Tom, 297, 17.6 and rover retrotransposons in Drosophilidae species. *Molecular Genetics and Genomics*, *282*(4), 351-362. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0468-0>
- Vieira, C., Lepetit, D., Dumont, S., & Biémont, C. (1999). Wake up of transposable elements following *Drosophila simulans* worldwide colonization. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(9), 1251-1255. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026215>
- Vieira, C., Nardon, C., Arpin, C., Lepetit, D., & Biémont, C. (2002). Evolution of Genome Size in *Drosophila*. Is the Invader's Genome Being Invaded by Transposable Elements? *Molecular Biology and Evolution*, *19*(7), 1154-1161. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004173>
- Vieira, J., Vieira, C. P., Hartl, D. L., & Lozovskaya, E. R. (1998). Factors contributing to the hybrid dysgenesis syndrome in *Drosophila virilis*. *Genetical Research*, *71*(2), 109-117. <https://doi.org/10.1017/S001667239800322X>
- Wallace, M. A., Coffman, K. A., Gilbert, C., Ravindran, S., Albery, G. F., Abbott, J., Argyridou, E., Bellosta, P., Betancourt, A. J., Colinet, H., Eric, K., Glaser-Schmitt, A., Grath, S., Jelic, M., Kankare, M., Kozeretska, I., Loeschcke, V., Montchamp-Moreau, C., Ometto, L., ... Obbard, D. J. (2021). The discovery, distribution, and diversity of DNA viruses associated with *Drosophila melanogaster* in Europe. *Virus Evolution*, *7*(1), veab031. <https://doi.org/10.1093/ve/veab031>
- Walsh, E., Torres, T. Z. B., & Rückert, C. (2022). *Culex* Mosquito Piwi4 Is Antiviral against Two Negative-Sense RNA Viruses. *Viruses*, *14*(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/v14122758>
- Walter, A. (2020). *Methods*. The Walter Lab. <https://www.walter-lab.com/methods>
- Wang, L., Tracy, L., Su, W., Yang, F., Feng, Y., Silverman, N., & Zhang, Z. Z. Z. (2022). Retrotransposon activation during *Drosophila* metamorphosis conditions adult antiviral responses. *Nature Genetics*, *54*(12), 1933-1945. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01214-9>
- Wang, S., Huang, X., Huang, Y., Hao, X., Xu, H., Cai, M., Wang, H., & 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*(22), 13047-13063. <https://doi.org/10.1128/JVI.01744-14>
- Wang, W., Han, B. W., Tipping, C., Ge, D. T., Zhang, Z., Weng, Z., & Zamore, P. D. (2015). Slicing and Binding by Ago3 or Aub Trigger Piwi-Bound piRNA Production by Distinct Mechanisms. *Molecular Cell*, *59*(5), 819-830.

- <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.007>
- Wang, X.-H., Aliyari, R., Li, W.-X., Li, H.-W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., & Ding, S.-W. (2006). RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult *Drosophila*. *Science*, *312*(5772), 452-454. <https://doi.org/10.1126/science.1125694>
- Wang, Y., Jin, B., Liu, P., Li, J., Chen, X., & Gu, J. (2018). PiRNA Profiling of Dengue Virus Type 2-Infected Asian Tiger Mosquito and Midgut Tissues. *Viruses*, *10*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/v10040213>
- Wang, Y., McNeil, P., Abdulazeez, R., Pascual, M., Johnston, S. E., Keightley, P. D., & Obbard, D. J. (2023). Variation in mutation, recombination, and transposition rates in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.277383.122>
- Wang, Z., Ye, X., Huang, J., & Chen, X. (2022). Virus and endogenous viral element-derived small non-coding RNAs and their roles in insect–virus interaction. *Current Opinion in Insect Science*, *49*, 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.12.007>
- Wasik, B. R., & Turner, P. E. (2013). On the Biological Success of Viruses. *Annual Review of Microbiology*, *67*(1), 519-541. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102833>
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R., & Paludan, S. R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *Journal of Virology*, *80*(10), 5059-5064. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5059-5064.2006>
- Webster, C. L., Longdon, B., Lewis, S. H., & Obbard, D. J. (2016). Twenty-Five New Viruses Associated with the Drosophilidae (Diptera). *Evolutionary Bioinformatics*, *12s2*, EBO.S39454. <https://doi.org/10.4137/EBO.S39454>
- Webster, C. L., Waldron, F. M., Robertson, S., Crowson, D., Ferrari, G., Quintana, J. F., Brouqui, J.-M., Bayne, E. H., Longdon, B., Buck, A. H., Lazzaro, B. P., Akorli, J., Hadrill, P. R., & Obbard, D. J. (2015a). The Discovery, Distribution, and Evolution of Viruses Associated with *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology*, *13*(7), e1002210. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210>
- Webster, C. L., Waldron, F. M., Robertson, S., Crowson, D., Ferrari, G., Quintana, J. F., Brouqui, J.-M., Bayne, E. H., Longdon, B., Buck, A. H., Lazzaro, B. P., Akorli, J., Hadrill, P. R., & Obbard, D. J. (2015b). The Discovery, Distribution, and Evolution of Viruses Associated with *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology*, *13*(7), e1002210. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002210>
- Weick, E.-M., & Miska, E. A. (2014). piRNAs : From biogenesis to function. *Development (Cambridge, England)*, *141*(18), 3458-3471. <https://doi.org/10.1242/dev.094037>
- Wein, T., & Sorek, R. (2022). Bacterial origins of human cell-autonomous innate immune mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, *22*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00705-4>
- Weiss, R. A. (2006). The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*, *3*(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-67>
- Wells, J. N., & Feschotte, C. (2020). A Field Guide to Eukaryotic Transposable Elements. *Annual Review of Genetics*, *54*(1), 539-561. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-040620-022145>
- West, C., & Silverman, N. (2018a). P38b and JAK-STAT signaling protect against Invertebrate

- iridescent virus 6 infection in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, *14*(5), e1007020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007020>
- West, C., & Silverman, N. (2018b). P38b and JAK-STAT signaling protect against Invertebrate iridescent virus 6 infection in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, *14*(5), e1007020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007020>
- Whitley, D. S., Yu, K., Sample, R. C., Sinning, A., Henegar, J., Norcross, E., & Chinchar, V. G. (2010). Frog virus 3 ORF 53R, a putative myristoylated membrane protein, is essential for virus replication in vitro. *Virology*, *405*(2), 448-456. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.034>
- Wicker, T., Gundlach, H., Spannagl, M., Uauy, C., Borrill, P., Ramírez-González, R. H., De Oliveira, R., Mayer, K. F. X., Paux, E., Choulet, F., & International Wheat Genome Sequencing Consortium. (2018). Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. *Genome Biology*, *19*(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1479-0>
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., & Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, *8*(12), 973-982. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
- Wierzbicki, F., & Kofler, R. (2023). *The composition of piRNA clusters in Drosophila melanogaster deviates from expectations under the trap model* (p. 2023.02.14.528490). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.02.14.528490>
- Wildy, P. (1971). *Classification and Nomenclature of Viruses* | Karger Book. <https://www.karger.com/Book/Home/218074>
- Williams, T. (1998). Invertebrate Iridescent Viruses. In L. K. Miller & L. A. Ball (Éds.), *The Insect Viruses* (p. 31-68). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5341-0_2)
- Williams, T. (2008). Iridoviruses of Invertebrates. In *Encyclopedia of Virology* (p. 161-167). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00513-6>
- Williams, T., Barbosa-Solomieu, V., & Chinchar, V. G. (2005). A Decade of Advances in Iridovirus Research. In *Advances in Virus Research* (Vol. 65, p. 173-248). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(05\)65006-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(05)65006-3)
- Willis, D. B., Goorha, R., & Granoff, A. (1984). DNA methyltransferase induced by frog virus 3. *Journal of Virology*, *49*(1), 86-91. <https://doi.org/10.1128/jvi.49.1.86-91.1984>
- Witherspoon, D. J., Watkins, W. S., Zhang, Y., Xing, J., Tolpinrud, W. L., Hedges, D. J., Batzer, M. A., & Jorde, L. B. (2009). Alu repeats increase local recombination rates. *BMC Genomics*, *10*(1), 530. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-530>
- Wong, L. H., & Choo, K. H. A. (2004). Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *Trends in Genetics*, *20*(12), 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.09.011>
- Wong, Z. S., Brownlie, J. C., & Johnson, K. N. (2016). Impact of ERK activation on fly survival and Wolbachia-mediated protection during virus infection. *Journal of General Virology*, *97*(6), 1446-1452. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000456>
- Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E. C., Li, W.-X., & Ding, S.-W. (2010). Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(4), 1606-1611.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0911353107>
- Wu, Q., Wang, X., & Ding, S.-W. (2010). Viral Suppressors of RNA-Based Viral Immunity : Host Targets. *Cell Host & Microbe*, 8(1), 12-15. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.009>
- Xeros, N. (1954). A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, 174, 562-563.
- Xu, J., & Cherry, S. (2014). Viruses and antiviral immunity in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology*, 42(1), 67-84. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.002>
- Yamaguchi, M., & Yoshida, H. (2018). *Drosophila* as a Model Organism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1076, 1-10. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0_1)
- Yamaguchi, S., Naganuma, M., Nishizawa, T., Kusakizako, T., Tomari, Y., Nishimasu, H., & Nureki, O. (2022). Structure of the Dicer-2–R2D2 heterodimer bound to a small RNA duplex. *Nature*, 607(7918), Article 7918. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04790-2>
- Yamashiro, H., & Siomi, M. C. (2018). PIWI-Interacting RNA in *Drosophila* : Biogenesis, Transposon Regulation, and Beyond. *Chemical Reviews*, 118(8), 4404-4421. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00393>
- Yan, X., Yu, Z., Zhang, P., Battisti, A. J., Holdaway, H. A., Chipman, P. R., Bajaj, C., Bergoin, M., Rossmann, M. G., & Baker, T. S. (2009). The Capsid Proteins of a Large, Icosahedral dsDNA Virus. *Journal of Molecular Biology*, 385(4), 1287-1299. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.11.002>
- Yanagawa, S., Lee, J.-S., & Ishimoto, A. (1998). Identification and Characterization of a Novel Line of *Drosophila* Schneider S2 Cells That Respond to Wingless Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 32353-32359. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32353>
- Yang, S., Yu, J., Fan, Z., Gong, S., Tang, H., & Pan, L. (2018). Bub1 Facilitates Virus Entry through Endocytosis in a Model of *Drosophila* Pathogenesis. *Journal of Virology*, 92(18), 10.1128/jvi.00254-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00254-18>
- Yao, Y., Li, Y., Zhu, X., Zhao, C., Yang, L., Huang, X., & Wang, L. (2023). The emerging role of the piRNA/PIWI complex in respiratory tract diseases. *Respiratory Research*, 24(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02367-9>
- Yashiro, R., Murota, Y., Nishida, K. M., Yamashiro, H., Fujii, K., Ogai, A., Yamanaka, S., Negishi, L., Siomi, H., & Siomi, M. C. (2018). Piwi Nuclear Localization and Its Regulatory Mechanism in *Drosophila* Ovarian Somatic Cells. *Cell Reports*, 23(12), 3647-3657. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.051>
- Yin, H., & Lin, H. (2007). An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 450(7167), Article 7167. <https://doi.org/10.1038/nature06263>
- Yordy, B., Tal, M. C., Hayashi, K., Arojo, O., & Iwasaki, A. (2013). Autophagy and selective deployment of Atg proteins in antiviral defense. *International Immunology*, 25(1), 1-10. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs101>
- Younes, S., Al-Sulaiti, A., Nasser, E. A. A., Najjar, H., & Kamareddine, L. (2020). *Drosophila* as a Model Organism in Host–Pathogen Interaction Studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 214. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00214>
- Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., & He, Q.-Y. (2012). clusterProfiler : An R Package for

- Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284-287. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>
- Yuan, Y.-W., & Wessler, S. R. (2011). The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), 7884-7889. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104208108>
- Yutin, N., Shevchenko, S., Kapitonov, V., Krupovic, M., & Koonin, E. V. (2015). A novel group of diverse Polinton-like viruses discovered by metagenome analysis. *BMC Biology*, 13(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0207-4>
- Zambon, R. A., Nandakumar, M., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(20), 7257-7262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409181102>
- Zambon, R. A., Vakharia, V. N., & Wu, L. P. (2006). RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology*, 8(5), 880-889. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00688.x>
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., & Zilberman, D. (2010). Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 328(5980), 916-919. <https://doi.org/10.1126/science.1186366>
- Zhang, J., Zhang, W., Liu, Y., Pi, M., Jiang, Y., Ainiwaer, A., Mao, S., Chen, H., Ran, Y., Sun, S., Li, W., Yao, X., Chang, Z., & Yan, Y. (2023). Emerging roles and potential application of PIWI-interacting RNA in urological tumors. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 1054216. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1054216>
- Zhang, X., Zhao, M., McCarty, D. R., & Lisch, D. (2020). Transposable elements employ distinct integration strategies with respect to transcriptional landscapes in eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 48(12), 6685-6698. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa370>
- Zhou, R., & Rana, T. M. (2013). RNA-based mechanisms regulating host-virus interactions. *Immunological Reviews*, 253(1), 97-111. <https://doi.org/10.1111/imr.12053>
- Zug, R., & Hammerstein, P. (2012). Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLOS ONE*, 7(6), e38544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>





# 1. Infections by Transovarially Transmitted DMelSV in *Drosophila* Have No Impact on Ovarian Transposable Element Transcripts but Increase Their Amounts in the Soma

GBE

## Infections by Transovarially Transmitted DMelSV in *Drosophila* Have No Impact on Ovarian Transposable Element Transcripts but Increase Their Amounts in the Soma

Marlène Roy<sup>1,2,3,†</sup>, Barbara Viginier<sup>2,†</sup>, Camille A. Mayeux<sup>1</sup>, Maxime Ratinier<sup>2,\*‡</sup>, and Marie Fablet<sup>1,\*‡</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Villeurbanne, France

<sup>2</sup>EPHE, PSL Research University, INRA, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon1, UMR754, IVPC, Lyon, France

<sup>3</sup>Present address: University College of Dublin School of Veterinary Medicine, Belfield, Dublin, Ireland

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work as first authors.

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work as last authors.

\*Corresponding authors: E-mails: marie.fablet@univ-lyon1.fr; maxime.ratinier@univ-lyon1.fr.

Accepted: 1 September 2021

### Abstract

Transposable elements (TEs) are genomic parasites, which activity is tightly controlled in germline cells. Using Sindbis virus, it was recently demonstrated that viral infections affect TE transcript amounts in somatic tissues. However, the strongest evolutionary impacts are expected in gonads, because that is where the genomes of the next generations lie. Here, we investigated this aspect using the *Drosophila melanogaster* Sigma virus. It is particularly relevant in the genome/TE interaction given its tropism to ovaries, which is the organ displaying the more sophisticated TE control pathways. Our results in *Drosophila simulans* flies allowed us to confirm the existence of a strong homeostasis of the TE transcriptome in ovaries upon infection, which, however, rely on TE-derived small RNA modulations. In addition, we performed a meta-analysis of RNA-seq data and propose that the immune pathway that is triggered upon viral infection determines the direction of TE transcript modulation in somatic tissues.

**Key words:** sigma virus, RNA interference, siRNAs, piRNAs, transcription regulation, genomic parasites.

### Significance

Transposable elements (TEs) are genomic parasites that are found in all genomes. However, the determinism of their activity is still incompletely known. Here we show that infections by the *Drosophila melanogaster* Sigma virus (DMelSV) increase somatic TE transcript amounts. A survey of other RNA-seq data sets suggests that somatic TE transcript modulation upon viral infection is a general rule and that the direction of the modulation depends on the host immune pathways that are triggered. In addition, although DMelSV is known to display tropism to ovaries, this study uncovers a strong homeostasis of ovarian TE transcript amounts upon infection, whereas TE-derived small RNAs increase. This potential modulation of the maternally transmitted TE-derived small RNA repertoires could have evolutionary impacts on genomes.

### Introduction

Both quantitatively and qualitatively, transposable elements (TEs) are major components of genomes. Quantitatively, they are repeated sequences that can make a few percents of chromosome sequences up to 90% in some plants (Biémont 2010; Wells and Feschotte 2020). Qualitatively,

they are mobile sequences that may modify DNA sequences and epigenetic landscapes (Rebollo et al. 2012; Lee and Karpen 2017; Quadrana et al. 2019). Research work of the last decade showed that one of the ways of controlling TE activity relies on epigenetic mechanisms (Slotkin and Martienssen 2007). In insects, these are essentially RNA

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

interference (RNAi) pathways. In *Drosophila*, the activity of piRNAs (PIWI-interacting small interfering RNAs) is predominant in gonads. *Drosophila* ovaries are composed of germline tissue and somatic support cells; piRNAs and functional piRNA pathways are present in both ovarian tissues, the germline and somatic follicle cells. piRNAs are 23–30 nt-long single-stranded RNA molecules that recognize TE transcripts by sequence similarity, and trigger their slicing thanks to the RNase activity of the PIWI proteins they are associated with. Some of these loaded piRNAs also translocate into the nucleus and induce the heterochromatic silencing of the corresponding TE sequences (Siomi et al. 2011; Czech and Hannon 2016). In somatic tissues, the small interfering RNA (siRNA) pathway is also at play in the transcriptional control of TEs. In addition, this RNAi pathway is the first defense line against viral infections (Galiana-Arnoux et al. 2006). siRNAs are 21-nt-long single-stranded RNA molecules, which are processed by Dicer-2 from double-stranded viral RNA (dsRNA) intermediates. These siRNAs are then loaded onto the Ago2 protein, which cleaves viral fragments sharing sequence complementarity to the siRNA (Galiana-Arnoux et al. 2006; van Rij et al. 2006; Mussabekova et al. 2017).

TE transcriptional and transpositional activities vary a lot across the tree of life (Wells and Feschotte 2020), and the determinisms of these activities are still incompletely known. Using a *Drosophila* system, we have recently shown that viral infection modulates somatic TE transcript amounts, through changes of TE-derived small RNA repertoires (Roy et al. 2020). Infections of wild-type flies by the Sindbis arbovirus (SINV) resulted in a decrease in somatic TE transcript amounts. However, infections of loss-of-function mutants of the siRNA pathway induced a strong increase in somatic TE transcript amounts. In both cases, ovarian TE transcript amounts were virtually unmodulated. The impacts of viral infections on germline TE transcripts is still a matter of debate because SINV does not enter ovaries (Roy et al. 2020). Indeed, contrary to somatic TE modulation, only germline TE modulation is expected to have evolutionary genomic consequences. These are the reasons why we used the same Makindu *Drosophila simulans* strain and infected it using another virus: the *Drosophila melanogaster* Sigma virus (DMelSV). DMelSV is a natural pathogen of *D. melanogaster*, and it is one of the few characterized *Drosophila* viruses known to infect ovarian tissues (L'Héritier 1958; Jousset and Plus 1975; Louis et al. 1988), which is the very place where TEs are strongly silenced, due to the piRNA pathway. DMelSV belongs to the *Rhabdoviridae*. It is an enveloped virus, displaying a single-stranded RNA genome of negative polarity. It was discovered in *D. melanogaster* (L'Héritier 1948), and found to naturally infect different species of *Drosophila*; however, *D. simulans* is not one of these (Webster et al. 2015). DMelSV is particular among *Drosophila* viruses in that it is vertically transmitted through eggs and sperm, whereas horizontal transmission does not seem to occur (L'Héritier 1958; Fleuriot 1988). Using a previously characterized *D. simulans* strain, we

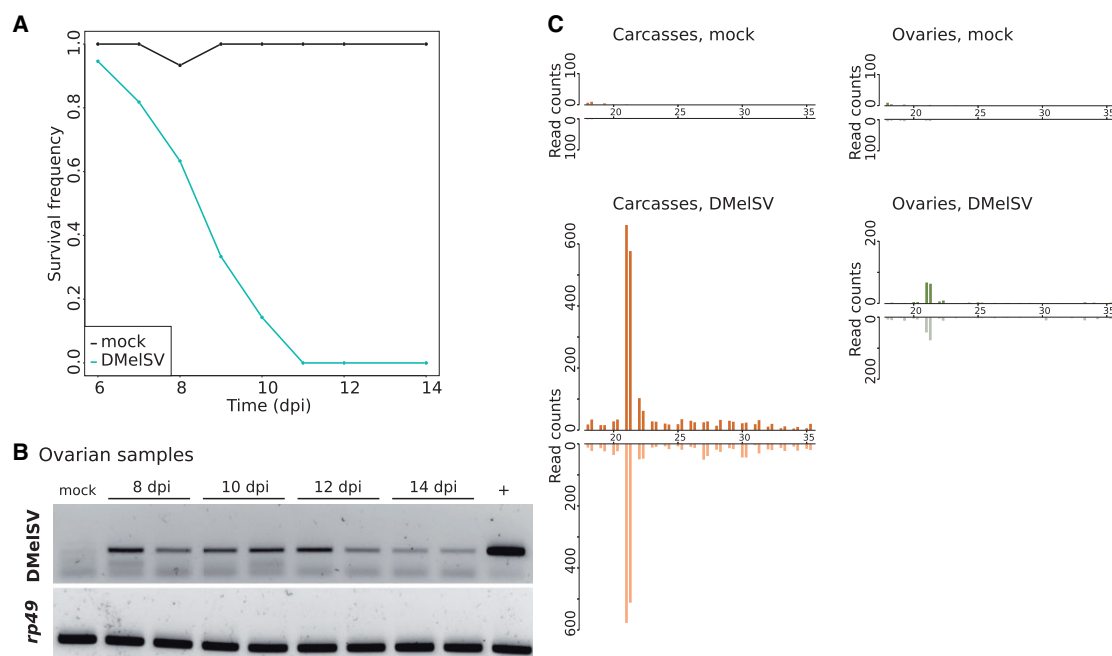
show that TE transcript amounts increase in somatic tissues upon DMelSV infection. We observe only very weak modulation of ovarian TE transcript amounts, reinforcing the idea that ovaries are strongly protected against modulations of TE transcript amounts. However, ovarian TE-derived small RNAs are significantly more abundant upon infection, suggesting that TE control may vary in the zygotes. In addition, we performed a meta-analysis of previously released RNA-seq data upon viral infection, and we uncover that the direction of the somatic TE modulation is virus-specific. We propose that it relies on the particular immune pathways that are triggered upon infection. Indeed, it is known that they vary a lot regarding the virus and the route of infection (Mondotte and Saleh 2018; Palmer, Varghese, et al. 2018).

## Results

### DMelSV Replicates in *D. simulans*

In order to go deeper into the understanding of the impact of viral infections on the germline activity of TEs, we considered DMelSV, which is one of the few characterized *Drosophila* viruses known to replicate in ovaries. In addition, in order to take advantage of our previous thorough analyses (Roy et al. 2020), we decided to use again the Makindu wild-type strain of *D. simulans*. As DMelSV is not naturally found in *D. simulans* (Webster et al. 2015), we first checked whether it replicated in Makindu. Similarly to the test used in *D. melanogaster*, we anesthetized flies using carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), and we computed the frequency of infected flies as the frequency of flies which did not recover from anesthesia (within 24 h). All flies were dead 11 days after infection (fig. 1A), indicating that DMelSV indeed replicated in this experimental system, and that 100% of the flies were successfully infected. The presence of DMelSV genome in the ovaries of infected flies was confirmed using RT-PCR, up until 14 days post infection (dpi) (fig. 1B). Eight days after infection, we could detect DMelSV-derived 21 nt-long small RNAs in carcasses and ovaries, although less abundantly in the later (fig. 1C). Sense and anti-sense viral siRNAs were found in equivalent proportions (fig. 1C) and mapped all along the viral genome (supplementary fig. S1, Supplementary Material online). The size distribution of small RNA reads aligning to DMelSV indicated that they corresponded to 21 nt-long small RNAs in the majority, that is, siRNAs (fig. 1C), as described previously by others (Petit et al. 2016).

Detailed analyses of the small RNA-seq data revealed viral sequences other than DMelSV (supplementary fig. S2, Supplementary Material online). Similar to our previous work (Roy et al. 2020), Nora Virus (NoraV) reads were detected in mock as well as DMelSV-infected conditions, and supposed not to interfere with the immune answer to the experimental infection. We also identified *Drosophila A virus* (DAV) small RNA reads, although only in DMelSV-infected *D. simulans*



**Fig. 1.**—DMelSV infection in *D. simulans*. (A) Proportion of flies which recovered after CO<sub>2</sub> anesthesia through time. In these experimental conditions, 100% of the flies were successfully infected with DMelSV. (B) DMelSV detection in ovaries of infected flies using RT-PCR. (C) Size distributions (nt) for DMelSV-mapping small RNAs. Raw read counts. Sense and antisense alignments are counted above and below the x axes, respectively. Double bars correspond to both sequencing replicates. As expected, the majority of these small RNAs are 21 nt long.

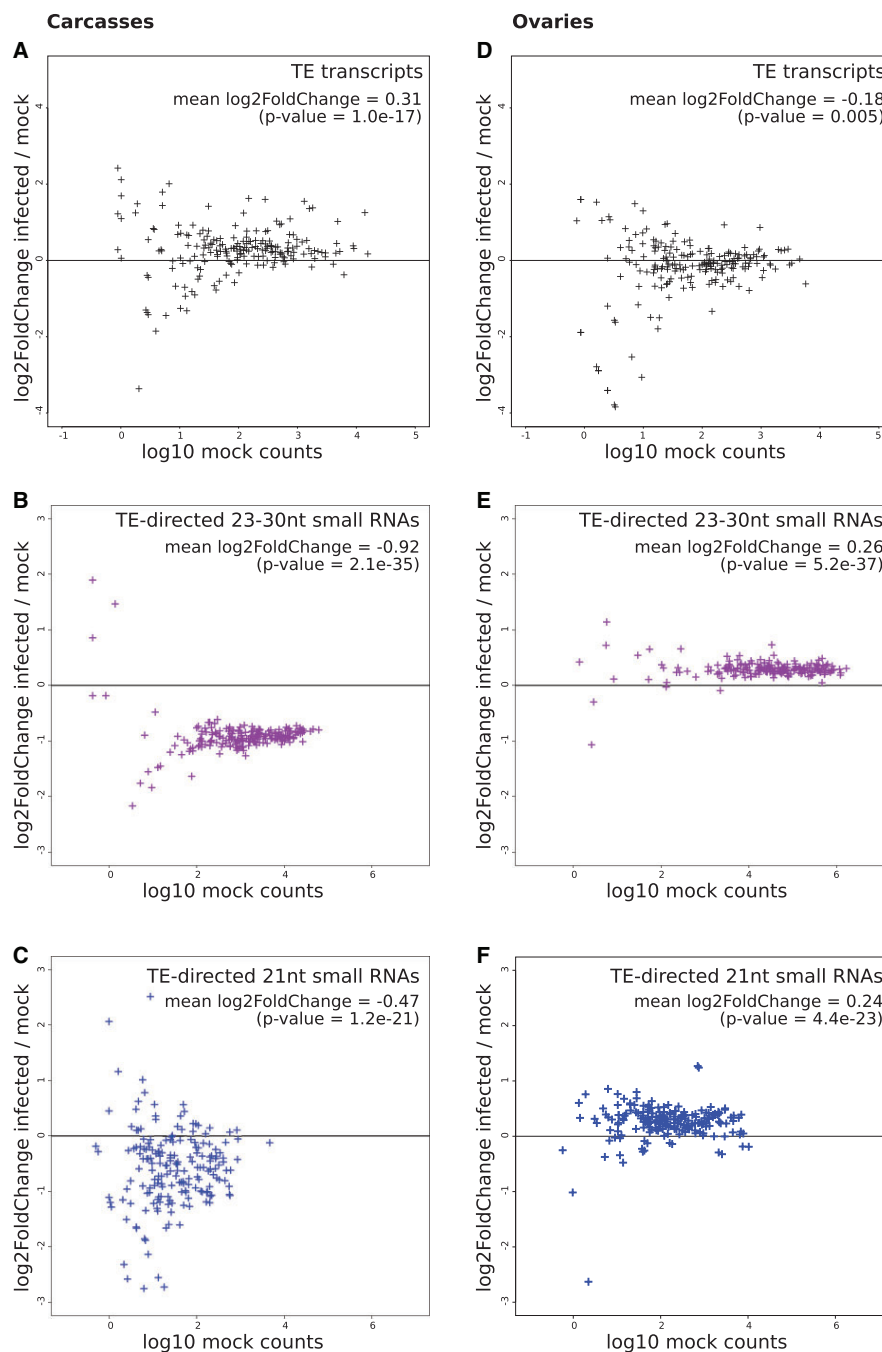
tissues. DAV read numbers were almost two orders of magnitude larger than DMelSV read numbers. This indicates that Makindu flies are chronically infected with NoraV, but not with DAV. Small RNA-seq of DMelSV viral stock (i.e., the solution used to experimentally infect *D. simulans* flies) did not reveal DAV sequences. In addition, we could not detect DAV RNAs using RT-PCR in Makindu flies nor in the DMelSV viral stock (data not shown). It has also to be noticed that NoraV and DAV were hardly detectable from RNA-seq data. This tends to suggest that the flies used to prepare DMelSV samples were not chronically infected with DAV. DAV detection such as the one observed in our Makindu samples seems to be widespread in fly samples (Palmer et al. 2018), and we also noticed such occurrence in our previous experiments using SINV (Roy et al. 2020). Overall, even if we cannot unambiguously trace back the origin of these DAV small RNAs, the above elements let us assume that they do not interfere significantly with DMelSV infection.

#### TE Modulation in Somatic Tissues and Ovaries upon DMelSV Infection

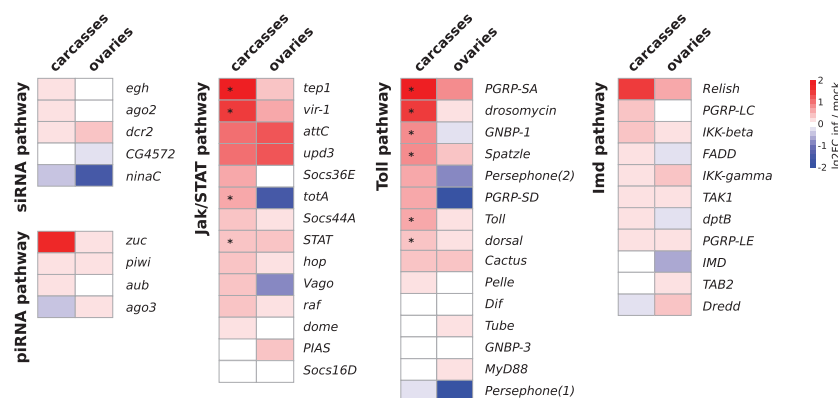
We extracted RNAs and small RNAs at 8 dpi to perform RNA-seq and small RNA-seq. Small RNAs displayed the expected

size distribution, that is, 21–30 nt in length (supplementary fig. S3, Supplementary Material online), as well as the 1U enrichment expected for piRNAs and siRNAs (Brennecke et al. 2007; Wang et al. 2014) (supplementary fig. S4, Supplementary Material online). Detailed sequence composition of these small RNA repertoires are provided as supplementary table S5, Supplementary Material online.

In somatic tissues, we could detect a clear increase in TE transcript amounts upon infection (24% increase, mean log<sub>2</sub>FC = 0.31, Wilcoxon paired test *P* value = 1.0e-17, fig. 2A). TE-derived small RNAs were also affected: TE-derived 23–30 nt RNAs decreased (47% decrease, mean log<sub>2</sub>FC = -0.92, Wilcoxon paired test *P* value = 2.1e-35, fig. 2B) as well as TE-derived 21 nt RNAs (28% decrease, mean log<sub>2</sub>FC = -0.47, Wilcoxon paired test *P* value = 1.2e-21, fig. 2C). All but three TE families had decreased TE-derived 23–30 nt small RNA levels. The three exceptions are *Tc3*, *Copia-1-Dmel*, and *ISBU2* families, which appear to display very low levels of piRNAs, as well as siRNAs and transcripts; therefore, this discrepancy should not be considered as relevant. TE families displaying an increase in TE transcript amount upon infection were not significantly enriched in TE families displaying decreased TE-derived 21 nt small RNAs (Fisher exact test *P* value = 0.10).



**FIG. 2.**—TE modulation upon DMelSV infection, expressed as  $\log_2$  of the ratio (counts in infected condition/counts in mock condition) for each annotated TE family. Each dot is a TE family. (A) TE transcript modulation upon infection in carcasses. (B) TE-derived 23–30nt small RNA modulation upon infection in carcasses. (C) TE-derived 21 nt small RNA modulation upon infection in carcasses. (D) TE transcript modulation upon infection in ovaries. (E) TE-derived 23–30nt small RNA modulation upon infection in ovaries. (F) TE-derived 21 nt small RNA modulation upon infection in ovaries. Small RNA amounts were normalized relative to miRNAs. *P* values were obtained using Wilcoxon paired tests.



**Fig. 3.**—Host immune response against DMelSV infection. Log<sub>2</sub>-fold changes of transcript amounts upon infection as estimated using DESeq2. Significant adjusted *P* values at the 0.05 threshold are indicated by stars.

In ovaries, TE transcript amount changes upon infection are the weakest (12% decrease, mean log<sub>2</sub>FoldChange [log<sub>2</sub>FC] = −0.18, Wilcoxon paired test *P* value = 0.005, fig. 2*D*), whereas TE-derived 23–30 nt RNAs clearly increased (19% increase, mean log<sub>2</sub>FC = 0.26, Wilcoxon paired test *P* value = 5.2e-37, fig. 2*E*) as well as TE-derived 21 nt RNAs (18% increase, mean log<sub>2</sub>FC = 0.24, Wilcoxon paired test *P* value = 4.4e-23, fig. 2*F*). Surprisingly, TE-derived small RNA modulations were in opposite directions in ovaries compared with somatic tissues.

#### Host Immune Response against DMelSV Infection

We further analyzed host response upon DMelSV infection focusing on a subset of genes that are characteristic of known immune pathways in *Drosophila*, that is, the RNAi, Toll, Imd, and Jak/STAT pathways (supplementary table S6, Supplementary Material online). In somatic tissues, we could detect significant increases in expression for genes of the Toll and Jak/STAT pathways (fig. 3). Statistically significant responses were observed in carcasses for *PGRP-SA* (log<sub>2</sub>FC = 1.91), *drosomycin* (log<sub>2</sub>FC = 1.50), *GNBP-1* (log<sub>2</sub>FC = 0.86), *Spatzle* (log<sub>2</sub>FC = 0.76), *Toll* (log<sub>2</sub>FC = 0.57), and *dorsal* (log<sub>2</sub>FC = 0.39) (Toll pathway), and *tep1* (log<sub>2</sub>FC = 1.91), *vir-1* (log<sub>2</sub>FC = 1.46), *totA* (log<sub>2</sub>FC = 0.55), and *STAT* (log<sub>2</sub>FC = 0.49) (Jak/STAT pathway). However, the corresponding log<sub>2</sub>-fold changes are all lower than 2, indicating moderate overexpression. On the contrary, the Imd pathway and genes involved in RNAi did not display significant transcription increase upon infection. In ovaries, none of the genes from the RNAi (piRNA and siRNA), Toll, Imd, nor Jak/STAT pathways displayed significant differential expression upon infection at the 0.05 threshold for adjusted *P* values.

#### Meta-analysis of Antiviral Host Responses and TE Modulation

In order to go deeper into the understanding of the mechanisms that are triggered upon viral infection and impact TEs,

we performed a meta-analysis of available RNA-seq data (table 1). Apart from our previously published data (Roy et al. 2020), available data sets were not prepared from isolated ovarian samples. Therefore, the following analysis will only deal with whole flies or carcasses. We previously analyzed RNA-seq data produced from Sindbis virus (SINV) infection in the same Makindu *D. simulans* strain and in the *w<sup>1118</sup>* control *D. melanogaster* strain (Roy et al. 2020). These experiments revealed that TE transcript amounts decreased in somatic tissues upon SINV infection in both strains. We also added data that correspond to DCV infection in *D. melanogaster y<sup>1</sup>* strain (Merkling et al. 2015), which induces an increase in TE transcript amounts (Roy et al. 2020). In addition, we included data that correspond to Kallithea virus (KV) infection in *D. melanogaster* OregonR (Palmer, Medd, et al. 2018). We only kept data corresponding to females. In this last data set, our TE analysis procedure revealed an average decrease of TE transcript amounts (14% decrease, mean log<sub>2</sub>FC = −0.21, Wilcoxon paired test *P* value = 9.3e-9, supplementary fig. S7, Supplementary Material online).

We are aware that experimental conditions vary across these studies. Therefore, rather than focusing on absolute transcript levels in each condition, we only considered log<sub>2</sub>-fold changes, which reflect changes induced by infection, regardless of baseline levels. We compiled these data and analyzed genes involved in immune pathways performing a principal component analysis (PCA) of log<sub>2</sub>-fold changes between infected and mock conditions for each experimental system (fig. 4 and supplementary fig. 8, Supplementary Material online). The first axis corresponded to 35.2% of the total variance and clearly separated {Makindu SINV} and {*w<sup>1118</sup>* SINV} from one hand apart from {Makindu DMelSV} and {*y<sup>1</sup>* DCV} from the other hand. Therefore, this first axis segregates RNA virus samples that displayed TE transcript decrease from one hand and TE transcript increase from the other hand. This suggests that the transcriptional

**Table 1**  
Characteristics of the Data Sets under Study

Data Set	Present Study	Roy et al. (2020)	Roy et al. (2020)	Merkling et al. (2015)	Palmer et al. (2018)
Mean TE log2FC	0.31	-0.25	-0.32	0.28	-0.21
Strain	Makindu	Makindu	<i>w</i> <sup>1118</sup>	<i>y</i> <sup>1</sup>	OregonR
Species	<i>D. simulans</i>	<i>D. simulans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>
Virus	DMelSV	SINV	SINV	DCV	KV
Viral genome	ssRNA(-)	ssRNA(+)	ssRNA(+)	ssRNA(+)	dsDNA
Natural host	<i>D. melanogaster</i>	Mosquito	Mosquito	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. melanogaster</i>
Infection route	Intrathoracic injections	Intrathoracic injections	Intrathoracic injections	Intrathoracic injections	Abdominal injections
Dpi	8	6	6	1	3
Tissue	Carcasses	Carcasses	Carcasses	Whole flies	Whole flies
Sex	Females	Females	Females	Females	Females

response of immune genes upon an RNA virus infection may allow to predict the effect on TE transcript modulation. However, this does not hold true for KV, the only DNA virus of the analysis. The second axis of the PCA explained 25.3% of the total variance. The first two axes clearly separated genes involved in RNAi from the other pathways and were associated with {Makindu SINV} sample.

## Discussion

### DMelSV Replicates in *D. simulans*, Triggers an RNAi Response, and Activates the Toll and Jak/STAT Pathways

Although DMelSV is frequently found in *D. melanogaster* samples, it had never been observed in *D. simulans* natural populations (Webster et al. 2015). However, our results show that this virus is able to replicate in *D. simulans* and to induce the same symptoms following CO<sub>2</sub> anesthesia. This is consistent with the findings of Longdon et al. (2011), who previously measured the ability of sigma viruses to replicate in various dipteran hosts following injection, and found that DMelSV could also replicate in *D. simulans* despite this species not being its natural host. We were able to detect DMelSV RNAs in ovaries of flies infected by thoracic injections. In addition, we found DMelSV-derived 21-nt small RNAs, equally produced in both orientations, indicative of an induced, efficient RNAi response. However, our RNA-seq data revealed that other immune pathways were also triggered. Several genes of the Toll and Jak/STAT pathways displayed increased transcript amounts upon infection, suggesting that these pathways play a role in the host immune response. Using microarrays, a previous study could not detect any evidence for activation of the Toll pathway upon DMelSV infection (Carpenter et al. 2009), whereas another study using RT-qPCR reported nonstatistically significant increases in the expression of *Toll*, *Relish*, and *vir-1* (Tsai et al. 2008). The greater sensitivity of the RNA-seq approach may explain why we were able to detect weak increases in transcript amounts for these genes in the present study. In addition, these differences may also result from differences due to the species: the above

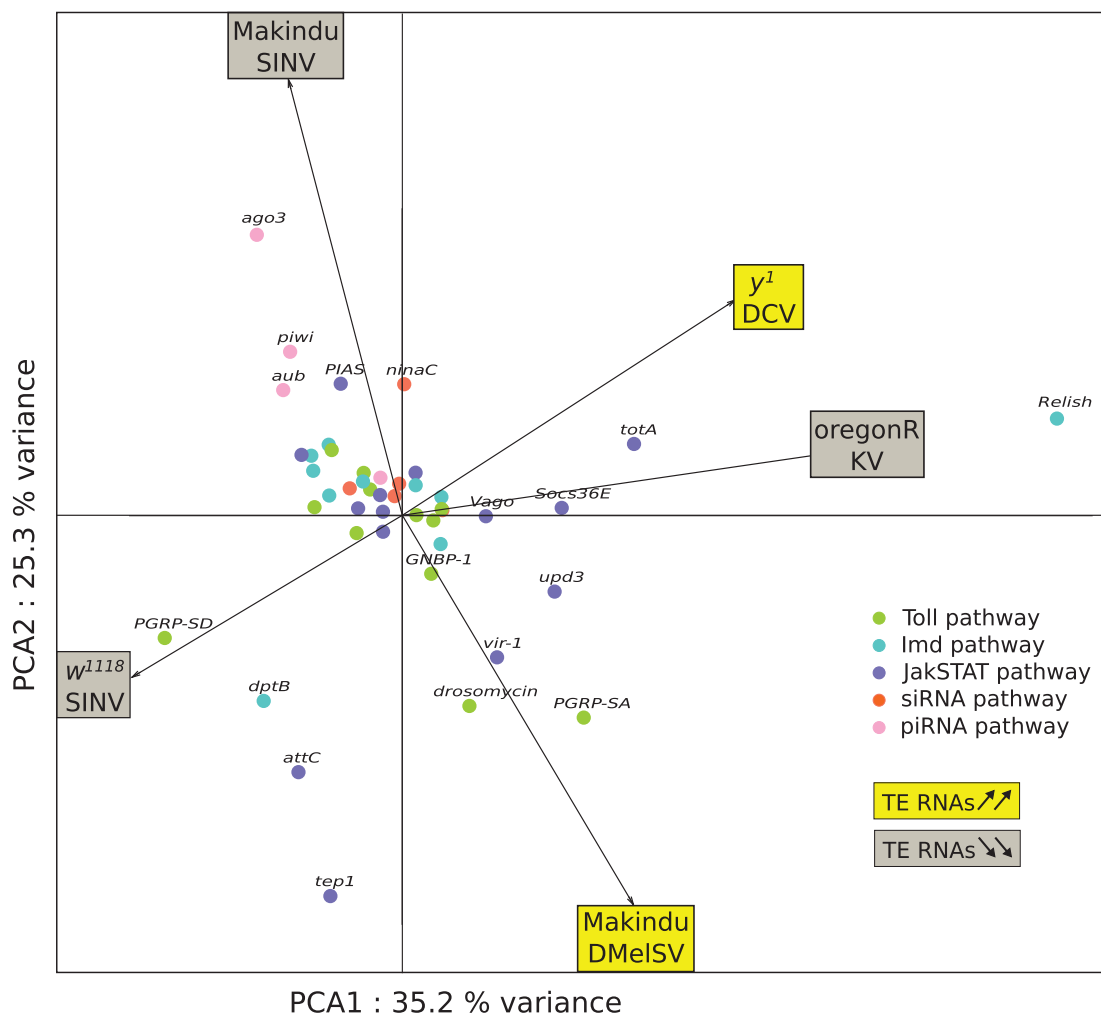
studies were performed in *D. melanogaster* whereas ours used *D. simulans*.

As described in our previous study, we observed that Makindu flies were chronically infected with NoraV. This chronic infection was proposed not to impact the outcome of experimental acute infections (Roy et al. 2020). In addition, we found a strong signal for DAV small RNAs, whereas DAV RNAs were never observed. Using small RNA-seq and RT-PCR, we did not detect DAV small RNAs and RNAs from the DMelSV viral stock. The absence of detectable DAV RNA in the infected flies may be related to the time course of DAV replication, its context with the siRNA pathway, or specifically in the Makindu strain. Although we cannot completely rule out the possibility of a double infection with DMelSV and DAV, the relatively frequent occurrence of DAV small RNAs in *Drosophila* samples (Palmer, Medd, et al. 2018; Roy et al. 2020) allows us to assume that the potential impacts on the outcome of DMelSV infection are not significant.

### TE Transcript Amounts Are Protected against Modulation in Ovaries

Using SINV in Makindu and *w*<sup>1118</sup> strains, we previously found that viral infections did not induce modulations in ovarian TE transcript amounts (Roy et al. 2020). However, we could observe that SINV did not enter ovaries, which could explain the absence of effect on ovarian TE transcripts. Here we chose to use DMelSV, which is known to be vertically transmitted through eggs (L'Héritier 1958), and the RNA of which was detected in ovarian samples in the present study. Nevertheless, we cannot exclude that viral replication is less intense in ovaries compared with somatic tissues. Surprisingly, in Makindu ovaries, DMelSV infection led to virtually no changes in TE transcript amounts, whereas TE-derived small RNA amounts increased. This result suggests that there is a strong pressure to maintain ovarian TE transcript homeostasis. Such a pattern is probably the consequence of strong selective pressures on the maintenance of germline cells' genomic integrity. Nevertheless, we have to note that our previous





**Fig. 4.**—PCA of immune gene transcriptional changes upon viral infections. PCA was performed on log<sub>2</sub>FC values. The first and second axes explain 35.2% and 25.3% of the total variance, respectively. Samples are labeled according to the fly strain and the virus used. Samples displaying an increase in TE transcript amounts upon infection are tagged in yellow; otherwise, they are tagged in gray.

experiments using SINV in Makindu revealed that ovarian TE transcript homeostasis was associated with an increase in TE-derived siRNAs but a strong decrease in TE-derived piRNAs. On the contrary, no modulations of ovarian TE-derived small RNA repertoires were observed upon SINV infection in *D. melanogaster* *w*<sup>1118</sup>. These observations suggest that the dedicated pathways to TE homeostasis rely on TE-derived small RNA repertoire adjustments, and vary across host species, but the exact mechanisms remain to be established.

siRNA pathway genes can be thought of as being engaged in a Red Queen arms race due to the antagonistic evolutionary interactions between viruses and the host genomes (Obbard

et al. 2006; Kolaczowski et al. 2011). Similarly, piRNA pathway genes can be thought of as being engaged in a Red Queen relationship due to the antagonistic evolutionary interactions between TEs and the host genomes (Parhad et al. 2017; Palmer, Hadfield, et al. 2018) and the potential deleterious off-targets of genomic auto-immunity (Blumenstiel et al. 2016; Wang et al. 2020). Considering that these selective pressures lead to rapid, and a priori lineage independent, evolution of all partners, it is not unexpected to observe contrasted patterns between *D. melanogaster* and *D. simulans*. It is all the more expected in the ovaries, considering that it is the supposed place of the strongest interaction between the



roles of both siRNA and piRNA pathways. This may add an additional layer of complex interactions acting on these different small RNA pathways. This reinforces the need for including inter and intraspecific variability in the study of such complex and rapid evolutionary processes.

In any case, the strong homeostasis of TE transcript amounts in ovaries suggests an optimal transposition rate in the oocyte (Dufourt et al. 2014), which we may imagine ensures an optimal mutational environment for the oocyte genome. This transcript homeostasis may rely on strong modulations of ovarian TE-derived small RNA amounts, which would lead to modulations of the TE-derived small RNA repertoires that are transmitted to the zygote. In the case of SINV, we observed a decrease in TE-derived small RNA amounts, which may lead to an increased mutation rate due to a release of TE activity. On the contrary, in the present study using DMelSV, we observed an increase in TE-derived small RNA amounts, which may ensure a greater genomic stability as a consequence of a stronger control of TEs in the zygote. For instance, we may envision that such a modulation reduces the instability resulting from hybrid crosses (Chambeyron et al. 2008; Akkouche et al. 2013). In any case, these contrasted patterns suggest that the study of a larger set of viruses and *Drosophila* strains will be needed to understand these aspects into more details (Palmer, Varghese, et al. 2018).

#### The Somatic Fate of TEs upon Viral Infections Depends on the Triggered Immune Pathways

The present study of DMelSV infection in *D. simulans* Makindu revealed that somatic TE transcript amounts were modulated upon infection, in agreement with our previous results using SINV (Roy et al. 2020). However, contrary to these previous observations, here we found an increase in somatic TE transcript amounts, which was associated with a decrease in TE-derived small RNAs. This suggests that somatic transposition rates may increase upon DMelSV infection. This is particularly interesting because somatic transposition was proposed to be involved in various physiological processes such as in brain functions and aging, especially in mammals (Faulkner and Garcia-Perez 2017) but also in *Drosophila* (Chang et al. 2019).

Although we cannot exclude that the abundant production of viral siRNAs limits the production of TE-derived siRNAs due to titration mechanisms and induces a global decrease in relative TE-derived siRNA amounts, the present results confirm that viral infections impact somatic TE transcript amounts in *Drosophila*, and suggest that the outcome of the infection on TEs likely depends on the considered virus and most probably on the main immune pathway that is triggered. In order to go deeper into the underlying mechanisms, we performed a meta-analysis of RNA-seq data produced upon infection using different viruses in different strains of *D. melanogaster* and *D. simulans*. We focused on a subset of genes known to be

implicated in the various immune pathways characterized in flies.

It is true that many experimental conditions vary across samples (table 1). For instance, due to experimental constraints, samples were not produced at the same time (SINV: 6 dpi; DMelSV: 8 dpi; DCV: 1 dpi; KV: 3 dpi). In addition, the tissues are not exactly the same: In the DCV study, whole flies are considered, whereas we separated ovaries from the rest of the body (carcasses). Moreover, the viruses are different in their being natural pathogens of *D. simulans* or even of flies. They also differ regarding the organization of their genomes: single-stranded RNA genome of negative polarity for DMelSV, single-stranded RNA genome of positive polarity for SINV and DCV, and DNA genome for KV. However, despite all these differences, the meta-analysis allows to suggest future directions of research.

Our PCA analysis on immune genes log2FC displays a clear structuration of RNA virus samples according to the direction of the modulation of TE transcript amounts. The sample corresponding to KV, the only DNA virus from the analysis, does not follow this trend. This suggests that, although KV infection seems to trigger an RNAi response (Palmer et al. 2018), other mechanisms should be considered regarding the impacts on TE modulation. In the case of RNA viruses, what is particularly interesting is that the RNAi pathway appears to determine this dichotomy. This suggests that when RNAi is the first line of defense against the virus—this is particularly true for nonnatural pathogens, such as SINV in *Drosophila*—this immune response leads to an increase in TE-derived small RNAs and therefore a decrease in TE transcript amounts, in agreement with the model we previously proposed (Roy et al. 2020). On the contrary, when other immune pathways are on the front line, such as the Toll and Jak/STAT pathways here in the case of DMelSV, or when the virus encodes an RNAi suppressor (such as DCV), the host immune response leads to a global decrease in TE-derived small RNAs, and consequently an increase in TE transcript amounts. Very interestingly, DMelSV infections trigger the Toll pathway and induce TE transcript increase, whereas KV encodes a Toll pathway suppressor and leads to TE transcript decrease (Palmer et al. 2019). More work is needed to explore these avenues.

#### Conclusion

Based on the present study, we propose that ovarian TE transcript amounts are protected against modulation upon viral infection, even in the case of viruses that display a clear tropism to ovaries, such as DMelSV. The maintenance of ovarian TE transcript homeostasis is associated with significant modulations of TE-derived small RNAs. Determining the precise mechanisms will require further investigation.

In addition, using DMelSV this study also allows to confirm that somatic TE transcript amounts are modulated upon viral infection. If this was to lead to increased transposition rates,

this would reinforce the involvement of viral infections in somatic genetic diversification. In addition, the analysis we perform here suggests that the direction of somatic TE transcript modulation depends on the immune pathways that are triggered (Palmer et al. 2018). This calls for the need of enlarging the panel of viruses under study in order to investigate the corresponding mechanisms.

## Materials and Methods

### Fly Strains and Husbandry

We used the Makindu *D. simulans* wild-type strain. Flies were reared on a standard corn medium at 25 °C. To eliminate the *Wolbachia* endosymbiotic bacteria, which is known to interfere with viral replication (Teixeira et al. 2008; Bhattacharya et al. 2017), flies were reared during two generations on standard agarose medium containing 0.25 mg/ml tetracycline hydrochloride (Sigma-Aldrich). The absence of *Wolbachia* was confirmed using *Wolbachia* 16S primers (5'-TTG TAG CCT GCT ATG GTA TAA CT-3' and 5'-GAA TAG GTA TGA TTT TCA TGT-3'), and *Wolbachia* *wsp* primers (5'-TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC-3' and 5'-AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA-3'), as described previously (Riegler et al. 2005).

### Virus Production and Titration

DMelSV stock was harvested from *D. melanogaster* chronically infected by Hap23 sigma virus (provided by Francis Jiggins, Cambridge University) (Carpenter et al. 2007). Briefly, DMelSV was extracted by grinding 100 infected fruit flies in PBS supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The supernatant was centrifuged 2 min at 10,000 × g and filtered at 0.45 μm. CO<sub>2</sub> test was used to titrate DMelSV stock (Longdon et al. 2012), using 10-fold serial dilutions of stocks and intrathoracic injections (Nanoject II apparatus; Drummond Scientific) of naive *D. melanogaster* flies. At 14 dpi, infected flies were exposed to 100% CO<sub>2</sub> and flies were subsequently deposited on ice for 15 min. At room temperature, surviving flies were counted 24 h after the CO<sub>2</sub> test and stock viral titer was valued using the Reed and Muench's method and expressed as log<sub>10</sub> 50% *Drosophila* infective doses (DID50) (Longdon et al. 2012).

### Fly Infections and Validation of the Viral Infection

Flies were individually intrathoracically injected (Nanoject II apparatus; Drummond Scientific) with 207 nl containing 81 DMelSV infectious particles per fly (DID50) in PBS, 10% FCS. In parallel, control flies were mock infected with PBS, 10% FCS under the same conditions. Fly mortality at 1 dpi was attributed to damage due to the injection procedure, and these flies were excluded from further analyses. Flies were maintained at 25 °C and transferred to fresh medium every 2–3 days. Viral infection of individual flies ( $n = 10$  per

experiment) was validated using CO<sub>2</sub> test. DMelSV injection experiments were performed independently, in duplicates.

### RNA Extraction and RT-PCR

Total RNA from eight pairs of ovaries (biological duplicates) were extracted at 8, 10, 12, and 14 dpi using Trizol (Thermo Fisher Scientific) and RNeasy Mini Kit (Qiagen). Purified RNAs were treated using Turbo DNase (Ambion DNafree kit). Reverse transcription was performed on 500 ng of total RNAs using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen). Endpoint PCR was performed using the GoTaq G2 DNA Polymerase kit (Promega). The parameters for PCR cycling were as follows: one cycle of 94 °C for 2 min; 35 cycles of 94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, followed by a terminal extension of 72 °C for 5 min. The primers used for DMelSV PCR amplify a fragment of 156 bp (DMelSV: 5'-ATG TAA CTC GGG TGT GAC AG-3' and 5'-CCT TCG TTC ATC CTC CTG AG-3'). The positive control corresponds to the DMelSV stock. rp49 was used as RNA positive control (rp49: 5'-CGG ATC GAT ATG CTA AGC TGT-3' and 5'-GCG CTT GTT CGA TCC GTA-3') (Akkouche et al. 2012).

### RNA-Seq

Female flies were carefully, manually dissected: pairs of ovaries were separated from the rest of the bodies, which will further be called "carcasses." Ovaries had to remain intact for the samples to be kept. RNA extraction was performed at 8 dpi, which corresponds to the exponential phase of viral replication. Total RNA of 30 pairs of ovaries or 30 carcasses (biological duplicates) were extracted using Trizol (Thermo Fisher Scientific) coupled with the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Purified RNAs (10 μg) were treated using TurboDNase (Ambion DNafree kit). RNA quality was validated using a Bioanalyzer (Agilent). Libraries were prepared after polyadenylated RNA selection. Purified RNAs were used for library preparation using the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2. Enriched libraries were paired-end sequenced on a HiSeq 4000 apparatus (Illumina). Sequencing adaptors were removed using UrQt (Modolo and Lerat 2015) and trim Galore ([https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)). Trimmed reads were aligned on reference genes retrieved from FlyBase ([ftp://ftp.flybase.net/releases/FB2019\\_01/dsim\\_r2.02/fasta/dsim-all-gene-r2.02.fasta.gz](ftp://ftp.flybase.net/releases/FB2019_01/dsim_r2.02/fasta/dsim-all-gene-r2.02.fasta.gz)) using TopHat2 (Kim et al. 2013). Gene count tables were generated using eXpress (Roberts et al. 2011). TE count tables were generated using the TEcount module of TETools (Lerat et al. 2017), and the list of sequences used in Roy et al. (2020) and available at <ftp://pbil.univ-lyon1.fr/pub/datasets/Roy2019/>. Gene and TE count tables were concatenated to make the complete count table, which was further analyzed using the DESeq2 R package (version 1.18) (Love et al. 2014).

Tables compiling raw and normalized read counts for TE families are provided as [supplementary material](#),

Supplementary Material online, as well as DESeq2 results corresponding to TE families and immune genes.

### Small RNA-Seq

Female flies were carefully, manually dissected: pairs of ovaries were separated from the rest of the bodies, which will further be called “carcasses.” Ovaries had to remain intact for the samples to be kept. Small RNA extraction was performed at 8 dpi, which corresponds to the exponential phase of viral replication. Small RNAs were isolated from 50 pairs of ovaries or 50 carcasses using a HiTrap Q HP anion exchange chromatography column (GE Healthcare Life Sciences), as described previously (Grentzinger et al. 2014). Pairs of ovaries or carcasses were crushed on HQ 0.1 solution (Hepes 20 mM, KOH 20 mM, EDTA 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, glycerol autoclaved 10%, Ack 0.1 M, Pefabloc SC 0.1 mg/ml DTT 1 mM) and the supernatant was added on the HiTrap column, followed by a high Ack concentration solution (HQ 4 M). Small RNAs were purified using phenol/chloroform isoamyl alcohol extraction (Sigma-Aldrich). The same experimental procedure was performed on two replicates of 150 µl of DMelSV viral stock, which corresponded approximately to 30 Hap23 infected flies each. Size selection of small RNAs (18–50 bp) was performed on gel at the GenomEast platform. Purified small RNAs were used for library preparation (SQ00/SIL-04-SR) and sequenced on a HiSeq 4000 apparatus (Illumina). We first removed adapter sequences using cutadapt (Martin 2011) -a TGGAAATCTCGGGTGCCAAGGAAGTCCAGTCACTTA -m 1. At this step, we drew the size distribution of read length, which almost exclusively ranged between 21 and 30 nt, that is, the expected size for siRNAs, piRNAs, and miRNAs; this made us confident that we did not extract RNA degradation products (supplementary fig. S3, Supplementary Material online). Using PRINSEQ lite version 0.20.4 (Schmieder and Edwards 2011), we filtered reads of size 23 to 30 nt and considered these as piRNAs, and reads of size 21 nt and considered these as siRNAs. Per base sequence contents were then computed using FastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)) and their analysis revealed the expected 1U enrichment (supplementary fig. S4, Supplementary Material online). Using a modified version of the TEcount module of TETools (Lerat et al. 2017; Fablet et al. 2019), we mapped the reads against a list of TE sequences (available at [ftp://pbil.univ-lyon1.fr/pub/datasets/Roy2019/](http://pbil.univ-lyon1.fr/pub/datasets/Roy2019/)) and virus sequences (sequences from Obbard laboratory, available at [http://obbard.bio.ed.ac.uk/data/Updated\\_Drosophila\\_Viruses.fas.gz](http://obbard.bio.ed.ac.uk/data/Updated_Drosophila_Viruses.fas.gz)), either in the sense or antisense directions. We then computed the sums of sense and antisense counts. We deepened the description of sequences corresponding to these small RNA repertoires and counted the number of reads mapping against a multifasta corresponding to the concatenated following files from FlyBase: dsim-all-gene-r2.02 (after masking using Repeat Masker),

dmel-all-miscRNA-r6.16.fasta, dmel-all-tRNA-r6.16.fasta, and dsim-all-miRNA-r2.02.fasta. Alignments were performed using bowtie -best (Langmead 2010).

Size distribution profiles of virus-mapping reads were performed using the following reference sequences for DMelSV, DAV, and NoraV: Genbank GQ375258, NC\_012958.1, and NC\_007919.3 accession numbers, respectively. Alignments were performed using bowtie -best (Langmead 2010). The mapping of DMelSV-derived small RNAs was performed using the SAMtools suite (Li et al. 2009) and the bamCoverage tool from deepTools2 (Ramírez et al. 2016).

Read count numbers were normalized according to the numbers of 19–39 nt reads aligning on miRNA sequences (miRNA sequences retrieved from FlyBase: dsim-all-miRNA-r2.02.fasta.gz). Tables compiling raw and normalized read counts for TE families are provided as supplementary material, Supplementary Material online.

### Statistical Analyses

We tested whether the modulations of TE counts upon infection were different from zero using Wilcoxon paired tests comparing TE normalized counts in the infected versus mock conditions, for the considered 237 TE families. The null hypothesis corresponds to an equal number of dots above and below the 0 horizontal line. Differential expression of genes was tested using the DESeq2 R package (Love et al. 2014), and significance was assessed based on adjusted *P* values lower than 0.05.

### Meta-analysis of RNA-Seq Data

We retrieved previously published RNA-seq data accessible under numbers PRJNA540249 (Roy et al. 2020), GSE56013 (Merkling et al. 2015), and PRJEB21366 (Palmer, Medd, et al. 2018). Roy et al.’s and Merkle et al.’s data were processed as described previously (Roy et al. 2020). Regarding Palmer et al.’s data, we first removed adapters using Trimmomatic (Bolger et al. 2014). To build the gene count table, we aligned reads against *D. melanogaster* reference genes ([ftp://ftp.flybase.net/releases/FB2020\\_04/dmel\\_r6.35/fasta/dmel-all-gene-r6.35.fasta.gz](ftp://ftp.flybase.net/releases/FB2020_04/dmel_r6.35/fasta/dmel-all-gene-r6.35.fasta.gz)) using HISAT2 (Kim et al. 2019), SAMtools (Li et al. 2009), and eXpress (Roberts et al. 2011). The TE count table was obtained following the same procedure as above. Gene and TE count tables were then concatenated to perform all subsequent analyses.

For each data set independently, we computed normalized counts using DESeq2 (Love et al. 2014), and manually calculated log<sub>2</sub> fold changes between mean normalized counts in infected condition and mean normalized counts in mock condition, for genes involved in immune pathways (see supplementary table S6, Supplementary Material online for details). All log<sub>2</sub>FC values were then gathered in the same table, which was used to perform a PCA (ade4 R package, Dray and Dufour 2007).

## Supplementary Material

Supplementary data are available at *Genome Biology and Evolution* online.

## Acknowledgments

This work is dedicated to the memory of Christophe Terzian, who initiated this project but left us too early. We acknowledge the contribution of Structure Fédérative de Recherche Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) facility: Arthro-tools platform. This work was performed using the computing facilities of the CC LBBE/PRABI, and the Qubit Invitrogen of Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon (managed by Benjamin Gillet, who we thank for his availability). Sequencing was performed by the GenomEast platform, a member of the "France Génomique" Consortium (ANR-10-INBS-0009). We thank Francis Jiggins, who provided us with the *D. melanogaster* strain naturally, persistently infected with the Hap23 DMelSV virus. We thank Cristina Vieira, Frédérick Arnaud, Rita Rebollo, Séverine Chambeyron, Matthieu Boulesteix, Hélène Henri, and William Palmer for helpful discussions. We thank Justine Picarle, Vincent Mérel, Angélique Champavère, Elisa Dell'Aglio, and Nelly Burlet for technical help. We also thank Clément Gilbert, Maria del Pilar García Guerrero, Émilie Brassat, Fabrice Vavre, Thierry Dupressoir, François Leulier, and Philippe Marianneau for helpful discussions. This work was supported by the ANR LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048 of the Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir [ANR-11-IDEX-0007] operated by the French National Research Agency, grant ERMIT) and ANR TEMIT grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Data Availability

The RNA-seq and small RNA-seq data underlying this article are available in NCBI SRA database and can be accessed with PRJNA643792.

## Literature Cited

Akkouche A, et al. 2012. tirant, a newly discovered active endogenous retrovirus in *Drosophila simulans*. *J Virol.* 86(7):3675–3681.  
 Akkouche A, et al. 2013. Maternally deposited germline piRNAs silence the tirant retrotransposon in somatic cells. *EMBO Rep.* 14(5):458–464.  
 Bhattacharya T, Newton ILG, Hardy RW. 2017. Wolbachia elevates host methyltransferase expression to block an RNA virus early during infection. *PLoS Pathog.* 13(6):e1006427.  
 Biémont C. 2010. A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186(4):1085–1093.  
 Blumensiel JP, Erwin AA, Hemmer LW. 2016. What drives positive selection in the *Drosophila* piRNA machinery? The genomic autoimmunity hypothesis. *Yale J Biol Med.* 89(4):499–512.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):2114–2120.  
 Brennecke J, et al. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128(6):1089–1103.  
 Carpenter J, et al. 2009. The transcriptional response of *Drosophila melanogaster* to infection with the sigma virus (Rhabdoviridae). *PLoS One.* 4(8):e6838.  
 Carpenter JA, Obbard DJ, Maside X, Jiggins FM. 2007. The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol Ecol.* 16(18):3947–3954.  
 Chambeyron S, et al. 2008. piRNA-mediated nuclear accumulation of retrotransposon transcripts in the *Drosophila* female germline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(39):14964–14969.  
 Chang Y-H, Keegan RM, Prazak L, Dubnau J. 2019. Cellular labeling of endogenous retrovirus replication (CLEVR) reveals de novo insertions of the gypsy retrotransposable element in cell culture and in both neurons and glial cells of aging fruit flies. *PLoS Biol.* 17(5):e3000278.  
 Czech B, Hannon GJ. 2016. One loop to rule them all: the Ping-Pong cycle and piRNA-guided silencing. *Trends Biochem Sci.* 41(4):324–337.  
 Dray S, Dufour A-B. 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J Stat Softw.* 22:1–20.  
 Dufourt J, et al. 2014. Spatio-temporal requirements for transposable element piRNA-mediated silencing during *Drosophila* oogenesis. *Nucleic Acids Res.* 42(4):2512–2524.  
 Fablet M, et al. 2019. Dynamic interactions between the genome and an endogenous retrovirus: tirant in *Drosophila simulans* wild-type strains. *G3.* 9(3):855–865.  
 Faulkner GJ, Garcia-Perez JL. 2017. L1 mosaicism in mammals: extent, effects, and evolution. *Trends Genet.* 33(11):802–816.  
 Fleuriot A. 1988. Maintenance of a hereditary virus. In: Hecht, MK, Wallace, B, editors. *Evolutionary biology.* Vol. 23. Boston: Evolutionary Biology Springer US. p. 1–30. doi: 10.1007/978-1-4613-1043-3\_1.  
 Galiana-Arnoux D, Dostert C, Schneemann A, Hoffmann JA, Imler J-L. 2006. Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *Drosophila*. *Nat Immunol.* 7(6):590–597.  
 Grentzinger T, et al. 2014. A user-friendly chromatographic method to purify small regulatory RNAs. *Methods* 67(1):91–101.  
 Jousset FX, Plus N. 1975. Study of the vertical transmission and horizontal transmission of '*Drosophila melanogaster*' and '*Drosophila immigrans*' picornavirus (author's transl). *Ann Microbiol.* 126:231–249.  
 Kim D, et al. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14(4):R36.  
 Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol.* 37(8):907–915.  
 Kolaczowski B, Hupalo DN, Kern AD. 2011. Recurrent adaptation in RNA interference genes across the *Drosophila* phylogeny. *Mol Biol Evol.* 28(2):1033–1042.  
 Langmead B. 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics.* Chapter 11:Unit 11.7.  
 Lee YCG, Karpen GH. 2017. Pervasive epigenetic effects of *Drosophila* euchromatic transposable elements impact their evolution. *eLife* 6:e25762.  
 Lerat E, Fablet M, Modolo L, Lopez-Maestre H, Vieira C. 2017. TEtools facilitates big data expression analysis of transposable elements and reveals an antagonism between their activity and that of piRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 45(4):e17.  
 L'Heritier P. 1948. Sensitivity to CO<sub>2</sub> in *Drosophila*—a review. *Heredity* 2(Pt 3):325–348.



- L'Héritier PH. 1958. The hereditary virus of *Drosophila*. In: Smith, KM, Lauffer, MA, editors. *Advances in virus research*. Vol. 5. New York: Academic Press. p. 195–245. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60674-0.
- Li H, et al. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16):2078–2079.
- Longdon B, Hadfield JD, Webster CL, Obbard DJ, Jiggins FM. 2011. Host phylogeny determines viral persistence and replication in novel hosts. *PLoS Pathog.* 7(9):e1002260.
- Longdon B, Wilfert L, Jiggins FM. 2012. The sigma viruses of *Drosophila*. Norkolk, UK: Caister Academic Press. p. 16.
- Louis C, et al. 1988. *Drosophila S* virus, a hereditary reolike virus, probable agent of the morphological S character in *Drosophila simulans*. *J Virol.* 62(4):1266–1270.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15(12):550.
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *Embnet J.* 17(1):10–12.
- Merkling SH, et al. 2015. The epigenetic regulator G9a mediates tolerance to RNA virus infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 11(4):e1004692.
- Modolo L, Lerat E. 2015. UrQ: an efficient software for the unsupervised quality trimming of NGS data. *BMC Bioinformatics.* 16:137.
- Mondotte JA, Saleh M-C. 2018. Antiviral immune response and the route of infection in *Drosophila melanogaster*. *Adv Virus Res.* 100:247–278.
- Mussabekova A, Daeffler L, Imler J-L. 2017. Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci.* 74(11):2039–2054.
- Obbard DJ, Jiggins FM, Halligan DL, Little TJ. 2006. Natural selection drives extremely rapid evolution in antiviral RNAi genes. *Curr Biol.* 16(6):580–585.
- Palmer WH, et al. 2019. Induction and suppression of NF- $\kappa$ B signalling by a DNA virus of *Drosophila*. *J Virol.* 93(3):e01443–18.
- Palmer WH, Hadfield JD, Obbard DJ. 2018. RNA-interference pathways display high rates of adaptive protein evolution in multiple invertebrates. *Genetics* 208(4):1585–1599.
- Palmer WH, Medd NC, Beard PM, Obbard DJ. 2018. Isolation of a natural DNA virus of *Drosophila melanogaster*, and characterisation of host resistance and immune responses. *PLoS Pathog.* 14(6):e1007050.
- Palmer WH, Varghese FS, van Rij RP. 2018. Natural variation in resistance to virus infection in dipteran insects. *Viruses* 10(3):118.
- Parhad SS, Tu S, Weng Z, Theurkauf WE. 2017. Adaptive evolution leads to cross-species incompatibility in the piRNA transposon silencing machinery. *Dev Cell.* 43:60–70.e5.
- Petit M, et al. 2016. piRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113(29):E4218–4227.
- Quadrana L, et al. 2019. Transposition favors the generation of large effect mutations that may facilitate rapid adaptation. *Nat Commun.* 10(1):3421.
- Ramírez F, et al. 2016. deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W160–W165.
- Rebollo R, Romanish MT, Mager DL. 2012. Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annu Rev Genet.* 46:21–42.
- Riegler M, Sidhu M, Miller WJ, O'Neill SL. 2005. Evidence for a global *Wolbachia* replacement in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 15(15):1428–1433.
- Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, Pachter L. 2011. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol.* 12(3):R22.
- Roy M, et al. 2020. Viral infection impacts transposable element transcript amounts in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(22):12249–12257.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6):863–864.
- Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(4):246–258.
- Slotkin RK, Martienssen R. 2007. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 8(4):272–285.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M. 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6(12):e2.
- Tsai CW, McGraw EA, Ammar E-D, Dietzgen RG, Hogenhout SA. 2008. *Drosophila melanogaster* mounts a unique immune response to the Rhabdovirus sigma virus. *Appl Environ Microbiol.* 74(10):3251–3256.
- van Rij RP, et al. 2006. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 20(21):2985–2995.
- Wang L, Barbash DA, Kelleher ES. 2020. Adaptive evolution among cytoplasmic piRNA proteins leads to decreased genomic auto-immunity. *PLoS Genet.* 16(6):e1008861.
- Wang W, et al. 2014. The initial uridine of primary piRNAs does not create the tenth adenine that is the hallmark of secondary piRNAs. *Mol Cell.* 56(5):708–716.
- Webster CL, et al. 2015. The discovery, distribution, and evolution of viruses associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 13(7):e1002210.
- Wells JN, Feschotte C. 2020. A field guide to eukaryotic transposable elements. *Annu Rev Genet.* 54:539–561.

Associate editor: Andrea Betancourt

## 2. Curriculum Vitae

DIPLOMES ET FORMATION	
Sept. 2020 – Sept. 2023 (en cours)	<b>Doctorat</b> – Génétique Évolutive Contrôle des éléments transposables et réponse aux infections virales chez <i>Drosophila</i> <i>Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE)</i> Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, VetAgro Sup, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR 5558, Villeurbanne, France
Sept. 2018 – Août 2019	<b>Diplôme Universitaire</b> - Épidémiologie des cancers Université de Bordeaux - ISPED
Sept. 2018 – Août 2019	<b>Master 2</b> - Biodiversité, écologie et évolution <i>Émergence des maladies infectieuses et parasitaires</i> Université de Montpellier
Sept. 2017 – Juill. 2018	<b>Master 1</b> - Biodiversité, écologie et évolution <i>Émergence des maladies infectieuses et parasitaires</i> Université de Montpellier
Sept. 2014 – Juin 2017	<b>Licence</b> - Sciences de la Vie <i>Biologie des Organismes et Évolutions</i> Université Aix-Marseille
EXPERIENCES ACADÉMIQUES ET PROFESSIONNELLES	
Janv. 2010 – Juin 2019  (6mois)	<b>Stage de Master 2.</b> Étude des variations temporelles du bactériome des rongeurs lors d'infections virales expérimentales : impact des souches virales utilisées et de l'origine géographique des rongeurs <i>Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), Montpellier (France).</i>
Avril 2018 – Juin. 2018  (3mois)	<b>Stage de Master 1.</b> Étude des corrélations entre les traits phénotypiques et génotypiques des papillomavirus humains (HPV) en relation avec les cancers. <i>Maladies Infectieuses et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC), Montpellier (France).</i>
Juin 2016  (1 semaine)	<b>Stagiaire volontaire.</b> Analyses biologiques en cancérologie : étude des cellules cancéreuses, analyses de pièces opératoires (biopsie, tumeurs, etc.), recherche en cancérologie en hématologie. Institut Paoli-Calmettes (IPC), Marseille (France).
ARTICLES DANS DES REVUES AVEC COMITÉ DE LECTURE	
<i>Articles publiés</i>	
Roy M, Viginier B, <b>Maveux C A</b> , Ratinié M, & Fablet M (2021). Infections by transovarially transmitted DMelSV in <i>Drosophila</i> have no impact on ovarian transposable element transcripts but increase their amounts in the soma. <i>Genome biology and evolution</i> , 13(9), evab207. doi:10.1093/gbe/evab207	
<i>Articles en préparation</i>	
<b>Maveux C A</b> , Larue A, Siqueira Oliveira D, Henri H, Rebollo R, Kremer N, Chambeyron S & Fablet M (in prep). Transposable elements are modulated by various types of viruses in <i>Drosophila melanogaster</i> and <i>Drosophila simulans</i>	
<b>Maveux C A</b> , Larue A, Garambois C, Henri H, Rebollo R, Kremer N, Chambeyron S & Fablet M (in prep). Transposable elements are modulated by various types of viruses in <i>Drosophila melanogaster</i> and <i>Drosophila simulans</i>	
CONFÉRENCES	
<i>Posters</i>	
<b>Maveux C. A.</b> , Marlène Roy, Anaïs Larue, Hélène Henri, Barbara Vignier, Rita Rebollo, Maxime Ratinié, Natacha Kremer, Marie Fablet (2022). <b>Control of transposable elements and response to viral infection.</b> The Mobile DNA Conference: Evolution, Diversity and Impact organized by Federation of American Societies for Experimental Biology, FASEB, Juin 2022, Malahide, Irlande.	
<b>Maveux C. A.</b> , Marlène Roy, Anaïs Larue, Hélène Henri, Barbara Vignier, Rita Rebollo, Maxime Ratinié, Natacha Kremer, Marie Fablet (2022). <b>Control of transposable elements and response to viral infection in <i>Drosophila</i>.</b> 10 <sup>th</sup> Congress of the International Society of Symbiosis ISS, 3 <sup>rd</sup> International Conference on holobionts, Juillet 2022, Lyon, France.	

Mayeux C. A., Anaïs Larue, Hélène Henri, Rita Rebollo, Natacha Kremer, Marie Fablet (2022). **Consequences of viral infections on transposable element regulation in *Drosophila***. 10<sup>th</sup> Congress of the International Society of Symbiosis ISS, 3<sup>rd</sup> International Conference on holobionts, Juillet 2023, Ferrara, Italie.

*Participation à des Congrès/Séminaires*

Mayeux C. A., Marlène Roy, Anaïs Larue, Hélène Henri, Barbara Vignier, Rita Rebollo, Maxime Ratiner, Natacha Kremer, Marie Fablet (2022). **Control of transposable elements and response to viral infection**. PhD Theses Workshop, Novembre 2021, Lyon, France.

Mayeux C. A., Marlène Roy, Anaïs Larue, Hélène Henri, Barbara Vignier, Rita Rebollo, Maxime Ratiner, Natacha Kremer, Marie Fablet (2022). **Control of transposable elements and response to viral infection**. 23<sup>rd</sup> National Congress on Transposable Elements, CNET, Juillet 2022, Lyon, France.

#### PROFIL SCIENTIFIQUE ET COMPÉTENCES

Excellente maîtrise de l'expérimentation sur insectes (mesures biologiques et comportementales, infection virale)  
 Excellente maîtrise de l'élevage de drosophile  
 Excellente maîtrise pratiques et analytiques en biologie moléculaire (extraction d'ADN et d'ARN, PCR, qPCR, RT-qPCR)  
 Bonnes connaissances pratiques et analytiques en culture cellulaire (cellule de drosophile)  
 Solides connaissances et maîtrise du langage de programmation R  
 Bonnes connaissances en statistiques descriptives et probabilistes  
 Bonnes connaissances pratique de l'environnement Unix  
 Langues : français (langue maternelle), bonne maîtrise de l'anglais

#### ENSEIGNEMENT ET ENCADREMENT

Sept. 2020 – Sept. 2023	<p>AIDE COMPLEMENTAIRE A L'ENSEIGNEMENT (ACE) (192 heures) - UCB – Lyon 1</p> <p>Licence 2 Sciences de la vie                      Génétique 2 (TD : 108h, TP : 31h)</p> <p>Licence 3 Sciences de la vie                      Biostatistiques (TP : 15h)</p> <p>Licence STS    Recherche documentaire (12h)</p> <p>Master 1 Biovi. Écologie évol.                      Génétique et génomiques évolutives (TP :18h)</p> <p>Master 1 Biologie.                                      Évolution Moléculaire, Bio-informatiques (TD : 4h, TP : 4h)</p>
Mai 2022 – Juin 2022	<p>ENCADREMENT (2 mois) - UCB – Lyon 1</p> <p>Stagiaire de Master 1 (Nathalie VERNEREY). Impact d'une dose létale du virus C de la Drosophile sur le succès reproducteur de <i>Drosophila melanogaster</i> (Master Biodiversité, Écologie, Évolution, UCB-Lyon1)</p>