



HAL
open science

Génome et facteurs de virulence d'un polydnavirus d'hyménoptère parasitoïde

Bertille Provost

► **To cite this version:**

Bertille Provost. Génome et facteurs de virulence d'un polydnavirus d'hyménoptère parasitoïde. Biochimie [q-bio.BM]. Université François Rabelais - Tours, 2004. Français. NNT: . tel-00103667

HAL Id: tel-00103667

<https://theses.hal.science/tel-00103667>

Submitted on 5 Oct 2006

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.



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS
TOURS
École Doctorale : **Santé, Sciences et Technologies**
Année universitaire : **2004/2005**



**THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS**

Discipline : **Sciences de la Vie**

**GÉNOME ET FACTEURS DE VIRULENCE
D'UN POLYDNAVIRUS D'HYMÉNOPTÈRE PARASITOÏDE**

présentée et soutenue publiquement

par

Bertille PROVOST

le 21 décembre 2004

sous la direction de **Jean-Michel DREZEN**

co-encadrée par Elisabeth HUGUET

JURY

Pierre COUBLE	Directeur de recherche	CNRS Villeurbanne
Jean-Michel DREZEN	Chargé de recherche	CNRS Tours
Philippe FOURNIER	Directeur de recherche	INRA Montpellier
Elisabeth HUGUET	Maître de conférences	Université de Tours
Marylène POIRIÉ	Professeur	Université de Nice
Anne-Nathalie VOLKOFF	Chargée de recherche	INRA Saint-Cristol-Lès-Alès

A vous,
à ma famille, mes parents, mon frère.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Jérôme Casas de m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte de Tours afin d'y réaliser ma thèse. Mes remerciements s'adresseront ensuite à Georges Periquet qui m'a accueillie dans son équipe Génome et Stratégies Parasitaires et a été mon directeur de thèse au début de celle-ci. Merci pour sa richesse scientifique et ses encouragements précieux.

Ensuite un grand merci à Jean-Michel Drezen pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse, m'avoir fait découvrir le monde fascinant des polydnavirus, pour avoir assuré l'encadrement de ce travail au cours de ces années, pour sa culture scientifique et ses conseils, pour avoir pris le temps de discuter, de faire des choix de manipes. Merci à Elisabeth Huguet qui a co-encadré cette thèse, merci pour son investissement, ses conseils précieux, sa patience et sa gentillesse. Merci aussi à Catherine Dupuy pour sa bonne humeur, ses conseils de manipes, et pour avoir relu ma prose. A Eric Espagne pour ses collaborations et son aide technique, à François, Marie-Cécile, Delphine et Jérôme pour leur bonne humeur et leurs conseils techniques et scientifiques.

Merci aux membres de mon jury de thèse, à Philippe Fournier de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de ma thèse, pour avoir attentivement lu un manuscrit sur un sujet différent du sien, pour sa disponibilité. Merci à Pierre Couble pour avoir accepté d'être rapporteur de mon travail, pour avoir fait partie de mon jury de thèse et avoir apporté un nouvel éclairage au sujet. Merci à Nathalie Volkoff pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci à Marylène Poirié d'être revenue passer quelques jours en Touraine pour participer à ce jury, merci pour ses conseils scientifiques et humains et son sourire permanent.

Merci aux membres des équipes collaboratrices, en particulier à Francesco Pennacchio, Carla Malva, Julie Oslewski et Kostas Iatrou pour les collaborations fructueuses réalisées avec leurs équipes.

A Joël Dérisson et à Cyndi Ménoret, sans qui les petites bêtes n'auraient rien eu dans leurs « assiettes » ! Et un grand merci aux petites bêtes, sniff...

Merci à Fatima et Naiara qui m'ont subi en tant que maître de stage, pour leur participation aux interminables séances de dissections et aux manipes. A Sarah, pour sa joie de vivre, son entrain et ses initiatives.

Merci à Guy et Jean-Philippe pour leurs précieux coups de main techniques et informatiques. A Sonia et Christine pour leur disponibilité. Et à tous les membres de l'IRBI pour leur convivialité et l'atmosphère agréable qui règne dans l'institut.

Une pensée particulière pour Sophie Launey qui m'a donné l'occasion de réaliser mon stage de maîtrise à l'INRA de Jouy et par ce biais, fait découvrir la biologie moléculaire et le monde « fabuleux » de la recherche.

Au cours de cette thèse, j'ai aussi fait mes armes en matière d'enseignement. Merci à Liliane Charles qui m'a permis de renouer avec la biologie cellulaire. Merci à Audrey Oudin pour m'avoir guidée dans mes premières envolées pédagogiques. A Fred Desroches pour sa collaboration et sa bonne humeur. Merci à Dominique Pierre, Olivier Dangles et Georges Periquet pour leur accueil dans une nouvelle équipe pédagogique. Et bien sûr, j'en sais gré à tous les étudiants qui ont fait les frais de mon apprentissage, et m'ont, en retour, beaucoup appris.

Un grand merci aux IRBIens et assimilés, collègues mais surtout amis, à vous tous qui avez été là pour partager les bons moments, les délires et les petites joies, mais encore, et surtout, pour m'accompagner pendant les petits coups de blues et les gros coups durs.

A Corinne pour ces moments de longues discussions (Bises à tes 2 soeurs ;-)) et à Karine, Pipa et Nathalie pour les repas d'anglais, à Nathalie pour ton écoute et ton soutien. A Annie, merci d'avoir été là, tout simplement. A Gwen, merci pour ta bonne humeur et nos bosses de rire (marmotte, magnum, clown... mdr). A Arnold « Petit lutin ... contrepéteur » eehhhh mollo l'asticot !!! A Thomas et Elyse (et Jasmine lol) pour les pauses musicales, les petits repas mitonnés et les séances piscine. A Nicolas pour son enthousiasme, ses discussions interminables et débats passionnés jusqu'au bout de la nuit. A Sylvain et Aurore pour les traques à l'orchidée perdue et les tisanes tardives. A Magda, ma compagne de dernière ligne droite !! de rédaction et de soutenance (entre autres...) et à Alex ! A Simon, pour les Ti-punchs, surtout au basilic ! A Laurianne pour sa complicité, Freddie-Jeanne pour sa bonne humeur, à Vincent, Hong, Olivier et Taiana, Fabrice. Merci à la commune de Rochecorbon de nous avoir prêté ses bords de Loire pour nos pique-niques ; au TirNanOg (mais non, c'est pas un resto chinois !) et surtout aux Frères Berthom (une bises à Jibe, Carole, Fred, Mickaël et Najat ; soit dit en passant, le demi-cerise/chantilly, je vous le déconseille fortement !! ;-D).

Un clin d'oeil à l'usurpateur d'identité qui n'a pas idée de l'éclair de génie qui lui a traversé l'esprit !!

A Zach, Marion et Noé ! votre amitié m'est précieuse. Aux Momo, Berig, Flo, ... Guy, Sophie, ... Joël, Pierrot, Marie et Patrick, que de bons moments. A Lydia et ... Christophe, pour tous ces dîners et ces moments au Château... A Gaella, Clairbanne et Lotus pour ces bols d'air et galopades effreignées dans la campagne et les forêts périgourdines. Et ... à toi, Macaire pour m'avoir accompagnée toutes ces années... ..

Et enfin, une profonde gratitude envers ma famille, pour votre présence, votre soutien, votre joie de vivre ; en particulier pour mes arrières-grands-parents, mes grands-parents et surtout mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait pu avoir lieu. A mon p'tit frère, « Dis, dis ! avec des spits, des crochets de bouchet, un gri-gri, un reverso, des friends et des camalots, un ou deux mousquetons, quelques dégaines, de la pof et un peu de bidouille, tu m'emmèneras jusqu'à la Lune ? », vivement les prochaines excursions escarpées.

- Carpe Diem -

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
SOMMAIRE.....	7
GLOSSAIRE.....	11
ABRÉVIATIONS.....	15
CONTEXTE GLOBAL DE LA THÈSE.....	19

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE..... 21

L'IMMUNITÉ INNÉE DES INSECTES..... 23

I - LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE DES INSECTES 25

IA - Mécanismes de reconnaissance du non-soi 27

IA1 – Les PAMP 27

IA1a – Les propriétés indispensables des PAMP..... 27

IA1b – La nature des PAMP..... 28

IA2 - Les récepteurs préformés (PRRs)..... 28

IA2a - Les PRR humoraux..... 29

IA2aa - Les hémolines..... 30

IA2ab - Les protéines de reconnaissance des protéoglycane (PGRP)..... 31

IA2ac - Les protéines de reconnaissance des b-1,3-glucane (bGRP) et des bactéries Gram-négatif (GNBP)..... 32

IA2ad - Les immulectines (IML)..... 33

IA2b – Les PRR cellulaires..... 34

IA3– Les voies Toll, Imd et JAK-STAT..... 35

IB - La réponse immunitaire innée humorale des insectes..... 38

IB1 – Coagulation..... 38

IB2 - Synthèse des peptides antimicrobiens 38

IB3 – L'activation de la cascade proPhénolOxydase (proPO)..... 40

IB3a – La synthèse de dérivés toxiques oxygénés et nitrés 42

IB3b – La mélanisation..... 42

IC – La réponse immunitaire innée cellulaire des insectes 44

IC1 – Les hémocytes d'insectes 44

IC1a - Les différentes classes d'hémocytes et leurs fonctions..... 44

IC1b – L'hématopoïèse..... 46

IC1c – Les fonctions des hémocytes dans la réponse immunitaire cellulaire 47

IC2 – Les différents mécanismes de la réponse immunitaire cellulaire..... 48

IC2a – La phagocytose..... 48

IC2b – L'encapsulation et la nodulation 49

IC2ba - Reconnaissance et liaison des granulocytes à un corps étranger..... 49

IC2bb - Adhésion des plasmatocytes..... 49

IC2bc - Recrutement des granulocytes et achèvement de la capsule 51

EFFETS DU PARASITISME ET FACTEURS DE VIRULENCE DES PARASITOÏDES CONTENANT DES POLYDNAVIRUS..... 53

II – LES DIFFÉRENTES STRATÉGIES DES PARASITOÏDES A POLYDNAVIRUS POUR MODIFIER LA PHYSIOLOGIE DE LEURS HÔTES 55

IIA - Altérations de la physiologie et les effets observés sur l'hôte 56

IIA1 – Modification de la croissance et interruption du développement de l'hôte 56

IIA2 – Immunosuppression de l'hôte..... 60

IIA2a - Réponse cellulaire 60

IIA2b - Réponse humorale..... 62

IIB – Les outils utilisés par le parasitoïde afin de mener à bien le parasitisme .	63
IIB1 – Les larves de parasitoïdes.....	63
IIB2 – Les tératocytes.....	64
IIB3 – Le fluide du calice : effets du venin, des protéines ovariennes et du polydnavirus	66
IIC – Bilan de la connaissance des gènes polydnaviraux	68
IIC1 - Différentes familles de gènes viraux identifiées avant le début de mon travail de thèse	68
IIC2 - Familles de gènes polydnaviraux et gènes isolés	69
IIC2a - Famille des gènes à motif riche en cystéines	69
IIC2b - Famille des gènes Rep	70
IIC2c - Famille des gènes innexine	71
IIC2d - Famille des gènes ankyrine	72
IIC2e - Gènes de la famille de lectines de type C	73
IIC2f - Gènes de la famille des Protéines Tyrosines Phosphatases (PTP)	74
IIC2g - Autres familles de gènes ou gènes isolés.....	75

PRÉSENTATION DU MODÈLE D'ÉTUDE..... 81

LE MODÈLE BIOLOGIQUE ÉTUDIÉ..... 85

ARTICLE 1..... 91

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 103

SÉQUENÇAGE DU GÉNOME DU BRACOVIRUS DE *COTESIA CONGREGATA*..... 105

Contexte de l'article 2 109

Quelques précisions d'ordre technique..... 110

Séquençage..... 110

Vérification de l'assemblage..... 111

 Localisation des cercles par séparation de l'ADN de CcBV par FIGE puis Southern blot..... 111

Matériel et méthodes..... 111

Résultats..... 112

 Cartographie des cercles par électrophorèse de digestions enzymatiques de l'ADN de CcBV puis Southern blot..... 114

Matériels et méthodes..... 114

Résultats..... 115

ARTICLE 2..... 119

 Supporting online material..... 123

Principaux résultats de l'article 2, discussion et perspectives 125

 . Caractéristiques et organisation du génome du bracovirus symbiote de *Cotesia congregata*..... 125

 Familles multigéniques..... 125

Protéines tyrosines phosphatases..... 125

Ankyrines..... 126

Protéines riches en cystéines..... 126

Cystatines..... 127

 Autres familles de gènes..... 127

 . Hypothèses évolutives..... 127

 . Intérêts agronomiques et médicaux 128

<u>CARACTÉRISATION DE 3 FAMILLES MULTIGÉNIQUES</u>	129
<u>FAMILLE DES PROTÉINES TYROSINES PHOSPHATASES</u>	129
Contexte de l'article 3	135
ARTICLE 3.....	137
Principaux résultats de l'article 3.....	151
. Identification de la famille multigénique des protéines tyrosines phosphatases (PTP) au sein de 2 génomes bracoviraux (BV) et organisation génique.	151
. Comparaisons et relations entre les PTP de bracovirus, d'invertébrés et de vertébrés.	151
. Localisation des BV PTP au sein des génomes bracoviraux.	152
. Expression des gènes de PTP dans les tissus de l'hôte parasité.....	152
. Expression de 2 CcBV PTP dans des cellules d'insectes par le système baculovirus et détermination de l'activité d'une CcBV PTP.....	153
Expériences complémentaires.....	154
<u>FAMILLE DES CYSTATINES</u>	155
Contexte de l'article 4	159
ARTICLE 4.....	161
Principaux résultats de l'article 4.....	185
. Isolement des gènes CcBV cyst exprimés dans l'hôte <i>Manduca sexta</i> parasité.....	185
. Localisation des 3 gènes CcBV cyst dans le génome viral.....	185
. Organisation nucléotidique et peptidique des gènes CcBV cyst.....	185
. Les autres familles de cystatines.....	186
. Profil d'expression des CcBV cyst dans l'hôte parasité	186
. Expression et purification de CcBV cyst1 recombinant.....	187
. Activité inhibitrice de CcBV cyst1	187
<u>FAMILLE DES ANKYRINES</u>	189
Analyses préliminaires de la famille de gènes ankyrine du bracovirus de CcBV	191
CARACTÉRISATION DE LA FAMILLE DES GÈNES ANKYRINE DU BRACOVIRUS DE <i>COTESIA CONGREGATA</i>	192
RÉSUMÉ	192
INTRODUCTION	192
MATÉRIEL ET MÉTHODES	194
Modèle biologique étudié	194
Procédures de dissection.....	194
<i>Dissection des ovaires de Cotesia congregata</i>	194
<i>Dissection des tissus de Manduca sexta</i>	194
Préparation du matériel génétique.....	195
<i>Extraction de l'ADN viral</i>	195
<i>Extraction d'ARN totaux de tissus de Manduca sexta</i>	195
Analyse des séquences.....	195
Elaboration des amorces spécifiques des gènes d'intérêt.....	196

<i>Amorces pour l'étude de l'expression des gènes d'intérêt</i>	196
<i>Amorces pour la cartographie</i>	197
Localisation des gènes sur l'ensemble du génome viral par migration par FIGE puis Southern blot	197
Etude de l'expression des gènes d'intérêt par transcription inverse et PCR multiplex	197
RÉSULTATS	198
Caractérisation des gènes CcBVank identifiés.....	198
<i>Analyse des séquences</i>	198
<i>Comparaison dans les banques de données</i>	200
Localisation des gènes CcBV ank 5 et 6 sur l'ensemble du génome par la technique de FIGE suivie d'un Southern blot.....	201
<i>Visualisation des cercles d'ADN viral</i>	201
<i>Hybridation des sondes spécifiques des gènes CcBVank5 et CcBVank6 sur l'ensemble du génome viral</i>	201
Etude de l'expression des gènes ankyrine-like dans la chenille parasitée.....	202
<i>Validation des couples d'amorces utilisées sur de l'ADN de CcBV</i>	202
<i>Etude de l'expression des gènes ankyrine-like dans différents tissus de chenilles parasitées</i>	203
DISCUSSION	205
Techniques de cartographie	205
Etude de l'expression des gènes CcBVank	205
Rôle potentiel des protéines CcBVAnk au cours du parasitisme	206

DISCUSSION GÉNÉRALE 209

ORIGINE ÉVOLUTIVE DES POLYDNAVIRUS 211

Intégration d'un génome simple 213

Complexification progressive..... 214

Capture indépendante de gènes..... 214

Duplication des gènes 216

Comment une telle complexification est-elle possible ? 217

FACTEURS DE VIRULENCE DE POLYDNAVIRUS 218

Altération du développement et de la croissance de l'hôte 219

Contrôle de l'immunité de l'hôte..... 220

PERSPECTIVES 221

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 225

ANNEXES 245

ANNEXE 1..... 247

ANNEXE 2..... 251

ANNEXE 3..... 256

ANNEXE 4..... 258

ABSTRACT..... 261

RÉSUMÉ 263

GLOSSAIRE

- 5' UTR : région de l'extrémité 5' (en amont du codon d'initiation) d'un transcrite mature (ARNm) qui n'est pas traduite en protéine.
- Acide lipotéichoïque : composant de la surface des bactéries à Gram positif.
- Amplicon : produit d'amplification de PCR
- Analogue : protéique ou organe partageant les mêmes fonctions qu'un autre, sans partager d'origine évolutive commune.
- Antigène : toute substance capable de déclencher une réponse immunitaire, que cette dernière soit à médiation humorale ou à médiation cellulaire.
- Apoptose : (= mort cellulaire programmée) processus actif d'autodestruction par fragmentation de certaines cellules aboutissant à leur phagocytose. Cette mort cellulaire, contrairement à la nécrose, n'est pas consécutive à une agression mais génétiquement programmée. Les cellules apoptotiques ont une morphologie particulière caractérisée par une rétraction de la cellule, une condensation de la chromatine, la formation de boursoffures cytoplasmiques et la fragmentation de la cellule en des corps apoptotiques entourés d'une membrane qui sont éliminés par phagocytose.
- Baculovirus : virus à ADN double brin infectant spécifiquement les arthropodes (insectes, acariens et crustacés). La nucléocapside des baculovirus est composée de la chaîne d'ADN circulaire enroulée en spirale et de la capsid. Les nucléocapsides peuvent être regroupées en faisceau délimité par une enveloppe lipoprotéique, formant une structure appelée virion. Plusieurs virions peuvent être rassemblés dans un corps d'inclusion (polyèdre ou granule) largement formé d'une protéine appelée polyédrine, et qui permet la survie du virus dans l'environnement.
- Bromure d'éthidium : (2,7-diamino-10-ethyl-9-phenylphenanthridinium bromide) colorant qui s'intercale entre les paires de bases des acides nucléiques simple ou double brin. Ce colorant, fluorescent sous lumière ultra violette, est couramment utilisé pour visualiser les fragments d'ADN ou d'ARN séparés par électrophorèse.
- CDS : séquence d'ADN codante, ou traduite en protéine, qui commence par un codon start et se termine par un codon stop et est précédée par des sites de liaison de facteurs de transcription.
- Contig : il est matériellement impossible de séquencer une molécule d'ADN très longue en une seule opération. Cette molécule sera dupliquée plusieurs fois, puis fragmentée de façon aléatoire. Les fragments seront séquencés. Un contig correspond à l'assemblage des séquences redondantes d'une série de ces fragments se chevauchant, de façon à obtenir la séquence unique, non-redondante, de la molécule d'ADN.
- Corps allates : organes glandulaires, situés dans la tête des insectes, qui sécrètent l'hormone juvénile.
- Corps cardiaques : organes neurohémaux des insectes reliés au cerveau et aux corps allates. Ils rejettent dans l'hémolymphe les neurohormones élaborées par les cellules du cerveau.
- Cytokine : terme générique désignant toute protéine, autre qu'un anticorps, sécrétée par une cellule au contact d'un antigène et jouant le rôle de médiateur cellulaire dans la génération de la réponse immunitaire.
- E value : cette valeur représente le nombre d'alignements de séquences différents, ayant des résultats équivalents, que l'on peut obtenir par hasard, lorsqu'on soumet une séquence dans les banques de données de séquences. Cette valeur est calculée en fonction du nombre d'identités, de différences, et de gap obtenus lors de la comparaison entre 2 séquences nucléiques. Plus la valeur de E est faible, plus le résultat de la comparaison des séquences est significatif donc plus les séquences comparées sont proches.
- Ecdysone : hormone stéroïde contrôlant la mue des insectes. L'ecdysone proprement dite, ou α -ecdysone, est sécrétée par les glandes prothoraciques. Pour être active, cette hormone doit être transformée en ecdystérone appelée β -ecdysone.
- Eliciteur : molécule inductrice des mécanismes de reconnaissance (par exemple les PAMP).
- Encapsulation : mécanisme de la réponse immunitaire des insectes permettant l'isolement d'un corps étranger par enveloppement de cet intrus dans plusieurs couches successives de cellules immunitaires,

- impliquant 2 types hématocytaires chez les lépidoptères : les plasmatocytes et les granulocytes (les lamellocytes chez la drosophile).
- Epitope : séquence d'acides aminés qui, dans une chaîne protéique, présente une composition ou une conformation, lui conférant des propriétés immunogènes. Région d'une molécule antigénique reconnue spécifiquement par un anticorps.
 - Glande prothoracique : glande endocrine des insectes localisée au niveau du prothorax, siège de la synthèse d'ecdysone sous l'action de l'hormone prothoracotrope (PTTH) élaborée par les cellules neurosécrétrices cérébrales de la *pars intercerebralis*.
 - Hématopoïèse : ensemble des processus conduisant à la différenciation des éléments du sang ou de l'hémolymphe à partir de cellules souches multipotentes (cellules sanguines, hématies, hématocytes).
 - Hémocoèle (ou hémocèle) : cavité viscérale ou « système circulatoire » des insectes contenant l'hémolymphe.
 - Hématocytes : cellules immunitaires circulantes des insectes présentes dans l'hémolymphe. On classe sous cette appellation plusieurs types de cellules qui se distinguent par leur morphologie, leur répartition, leur nombre, leur durée de vie et leur potentialité. Ces types les plus communs d'hématocytes rencontrés chez les lépidoptères sont les suivants : les prohématocytes, les plasmatocytes, les granulocytes, les sphérolocytes et les oenocytoides.
 - Hémolymphe (ou haémolymphe) : sang des insectes circulant passivement à l'intérieur de la cavité corporelle (ou hémocoèle) et non dans un système circulatoire, transporteur d'oxygène notamment.
 - Hémostase : ensemble des mécanismes participant à l'arrêt d'une hémorragie, impliquant la coagulation.
 - Homologie : propriété partagée par des gènes ou protéines qui possèdent un ancêtre commun. L'homologie entre 2 séquences protéiques est admise si leur pourcentage d'identité est supérieur à 30%.
 - Hormone juvénile (ou JH) : hormone synthétisée dans les corps allates des insectes. Chez la chenille parasitée, le maintien d'un niveau élevé d'hormone juvénile empêche la mue, l'apparition des caractères adultes.
 - Hormone prothoracotrope (ou PTTH) : neurohormone synthétisée par la *pars intercerebralis* des insectes, contrôlant la synthèse d'ecdysone par les glandes prothoraciques.
 - Hôte : organisme susceptible d'héberger un parasite.
 - Hyménoptère : ordre d'insectes regroupant les guêpes, les abeilles, les frelons, les bourdons et les fourmis.
 - Identité : ressemblance parfaite entre deux séquences. Le pourcentage d'identité entre deux séquences est caractérisé par le nombre d'acides aminés ou des nucléotides invariants. Des protéines sont considérées comme homologues si elles partagent au moins 30% d'identité.
 - Idiobionte : parasitoïde ne permettant pas le développement de son hôte après l'événement de parasitisme ou la ponte.
 - Imago : insecte ayant acquis ses caractères adultes après la dernière mue.
 - Immunoglobuline (Ig) : membre d'une des 5 classes de protéines cellulaires produites dans le sérum ou le sang, qui reconnaissent les composés étrangers et se comportent comme des anticorps au cours de la réponse immunitaire.
 - Intégrine : protéine transmembranaire, de la famille des Immunoglobulines, formée de 2 sous-unités α et β , impliquée dans la reconnaissance spécifique de macromolécules des matrices extracellulaires.
 - I κ B : inhibiteur du facteur de transcription Nf- κ B intervenant dans la stimulation de l'expression de gènes de l'immunité au cours de la réponse de phase aiguë chez les mammifères. Les membres de la famille I κ B se caractérisent par un domaine formé de répétition de plusieurs motifs ankyrine nécessaires à l'interaction avec le complexe NF- κ B (cf NF- κ B).
 - Koinobionte : parasitoïde permettant la poursuite du développement de son hôte jusqu'à la fin du parasitisme.
 - Lamellocyte : type hématocyttaire de la drosophile qui possède un noyau à plusieurs lobes impliqué dans l'encapsulation.
 - Lépidoptère : ordre d'insectes regroupant les papillons, les mites.
 - Mélanisation : mécanisme d'oxydation conduisant à un noircissement de l'hémolymphe ou de l'épithélium cuticulaire.

- Membrane séreuse : membrane extra-embryonnaire de l'oeuf des insectes, constituée par une fine couche de cellules entourant l'embryon.
- NF-κB : facteur de transcription inductible, contrôlant la transcription des gènes induits au cours de la réponse inflammatoire chez les mammifères, dont le site de fixation est un motif κB. NF-κB est constitué d'un hétérodimère de 2 protéines de la famille Rel (relA et p50). Les protéines Rel sont caractérisées par un domaine Rel situé dans la partie N-terminale, qui est responsable des propriétés de liaison à l'ADN, de dimérisation et de la localisation nucléaire de la protéine. -En absence de signal par agression microbienne, les complexes NF-κB sont séquestrés dans le cytoplasme par une protéine de la famille IκB. En réponse à un signal, IκB est phosphorylé puis dégradé par le protéasome. La dégradation d'IκB permet la translocation rapide de NF-κB dans le noyau, assurant ainsi l'induction des gènes cibles de la réponse inflammatoire.
- Opsonine : de façon générale, toute substance qui se lie à des antigènes particuliers d'un microorganisme et qui induit la phagocytose (opsonisation).
- Opsonisation : processus par lequel une cellule ou un microorganisme est traité à l'opsonine afin de le signaler aux cellules immunitaires pour la phagocytose.
- Organe hématopoïétique : organe siège de l'hématopoïèse, la prolifération et/ou différenciation des cellules sanguines ou des hémocytes.
- Orthologues : 2 gènes homologues sont qualifiés d'orthologues s'ils ont divergé à la suite d'un événement de spéciation. Ils sont donc rencontrés au sein de 2 taxons différents, mais ne partagent pas obligatoirement des fonctions équivalentes. Avec les paralogues, ils constituent la super famille des homologues.
- PAMP : motifs moléculaires conservés par les microorganismes pathogènes permettant aux récepteurs préformés des organismes infectés de les reconnaître. Les structures conservées reconnues sont, le plus généralement, les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PGN) respectivement présents à la surface des bactéries Gram négatif et Gram positif, les lipoprotéines et les les zymosans (levures).
- Paralogues : 2 gènes homologues sont qualifiés de paralogues s'ils ont divergé à la suite d'un événement de duplication. Ils sont donc rencontrés au sein d'une même espèce. Avec les orthologues, ils constituent la super famille des homologues.
- Parasitoïde : organisme endo- ou ectoparasite vivant aux dépens d'un organisme hôte pendant au moins une période de son cycle de vie (stades larvaires). Le parasitoïde se nourrit de son hôte et entraîne toujours la mort de son hôte. Les stades adultes des parasitoïdes sont libres.
- Pars intercerebralis : région comprise entre les 2 lobes du cerveau antérieur des insectes, qui contient les cellules neurosécrétrices productrices de l'hormone prothoracotrope (PTTH).
- Peptide signal : séquence codante d'un domaine N-terminal de protéine sécrétée. Ce domaine est impliqué dans l'adressage, le guidage du peptide vers la membrane plasmique. Il est clivé lors de la sécrétion dans le milieu extracellulaire.
- Phagocytose : processus par lequel les hémocytes englobent puis digèrent des microorganismes, cellules ou débris cellulaires dans un but d'alimentation ou de défense contre une infection.
- Plasmatocytes : classe d'hémocytes d'insectes, essentiellement impliquée dans les réactions d'encapsulation.
- Protéine de choc thermique : (= Heat-shocked protein = Hsp) : protéines induites par choc thermique
- Protéine chaperonne : protéine (par exemple : Hsp) liée à un récepteur (par exemple : aux hormones stéroïdes) formant un complexe dont le rôle est de maintenir ce récepteur dans une conformation adéquate lui permettant de répondre rapidement à un signal hormonal. La liaison de l'hormone au récepteur entraîne la dissociation de ce complexe et permet l'activation du récepteur et sa liaison à l'ADN.
- PRR (ou PRP) : récepteurs préformés de reconnaissance des PAMP, les motifs moléculaires conservés exprimés par de nombreux agents infectieux.
- Pseudogène : gène non fonctionnel, d'une famille multigénique issu par mutations de gènes fonctionnels dont la séquence est parfois très proche.
- Sclérotisation : processus comprenant le durcissement et le noircissement de la cuticule (comprenant l'épicuticule et l'exocuticule) par une substance appelée la sclérotine.

- Similarité : le taux de similarité entre deux séquences est caractérisé par le nombre d'acides aminés invariants ou biochimiquement équivalents sur le nombre total d'acides aminés de 2 séquences protéiques alignées. Ce taux est généralement exprimé en pourcentage.
- Tératocyte : cellules d'origine embryonnaire, dérivées de la membrane séreuse extra-embryonnaire des embryons de certaines espèces de parasitoïdes des braconidés. Au cours du développement du parasitoïde, ces cellules se séparent, deviennent libres, et poursuivent leur croissance à l'intérieur de l'hôte.
- Traduction : deuxième étape de l'expression des gènes pendant laquelle les ribosomes vont traduire une molécule d'ARN, venant d'être formée par transcription, en une protéine formée d'une succession d'acides aminés (ou chaîne polypeptidique) correspondant à l'information de l'ADN initial.
- Transcription : première étape de l'expression des gènes pendant laquelle une enzyme appelée polymérase transcrit l'ADN en ARN.

ABRÉVIATIONS

aa : acide aminé
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIA : alcool isoamylique
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BET : bromure d'éthidium
CDS : coding DNA sequence (= séquence d'ADN codante)
C-term : partie carboxy-terminale d'une protéine
DIF : dorsal-like immunity factor
DNase : enzyme dégradant l'ADN
dNTP : désoxynucléotide triphosphate (dATP+ dCTP + dGTP + dTTP)
DO : densité optique
E value : expectation value
egf : epidermal growth factor (= facteur de croissance épidermique)
FIGE : field inversion gel electrophoresis (= gel d'électrophorèse en champs inversés)
GFP : green fluorescent protein
GNBP : gram-negative bacteria-binding protein (= protéines de reconnaissance des bactéries gram négatif)
H₂O UP : eau ultra pure
Hsp : heat-shocked protein (= protéine de choc thermique)
Ig : immunoglobuline
imd : gène *immune deficiency* de la drosophile
IML : immulectine
kb : kilopaire de bases (1000 pb)
LBP : LPS binding protein
LPS : lipopolysaccharide (bactéries à gram positif)
M : molaire (= mole par litre)
MM : masse molaire
N : normal
NaAc : acétate de sodium
NaCl : chlorure de sodium
N-CAM : un membre de la superfamille des Ig
NO : nitric oxide (= oxyde nitrique)
N-term : partie amino-terminale d'une protéine
oligo dT : oligonucléotide désoxythymidine
ORF : open reading frame (= cadre ouvert de lecture)
PAMP : pathogen associated molecular pattern (= motif associé à un pathogène)

PCR : polymerisation chain reaction (= réaction de polymérisation en chaîne)
pb : paire de bases
PGN : peptidoglycan (bactéries à gram positif)
PGRP : proteoglycan recognition protein (= protéines de reconnaissance des protéoglycanes)
PM : poids moléculaire
PO : phénol-oxydase
ProPO : pro phénoloxydase
PRP : pattern recognition protein
PRR : pattern recognition receptors (= récepteurs de reconnaissance préformés)
PSP : plasmacyte spreading peptide
p/v : rapport poids/volume
PTP : protéine tyrosine phosphatase
PTTH : hormone prothoracotrope
qsp : quantité suffisante pour
RGD : séquences de reconnaissance caractéristiques de protéines des matrices extracellulaires
RNase : enzyme dégradant les ARN
RNI : reactive nitrogen intermediates (= dérivés toxiques nitrés)
ROI : reactive oxygen intermediates (= dérivés toxiques oxygénés)
rpm : rotation par minute
RT-PCR : transcription inverse suivie d'une PCR
SDS : sodium dodécylsulfate
SSC : sels de citrate de sodium
spz : gène *spatzle* de la drosophile
TLR : Toll-like receptor (= Récepteur Toll-Like)
TSP : teratocyte secreted peptide (= protéine ou peptide sécrété(e) par les tératocytes)
u : unité
UTR : untranslated region (= séquence non-traduite)
UV : ultra violet
vol : volume
 α TEP1 : protéine contenant un groupement thioester
 β GRP : béta-1,3-glucan recognition protein (= protéines de reconnaissance des β -1,3-glucan des champignons)

Unités

(les unités sont symbolisées selon les conventions en vigueur dans le Système International des Unités)

μ g : microgramme
mL : millilitre
h : heure
pM : picoMolaire

Polydnavirus :

IV : ichnovirus

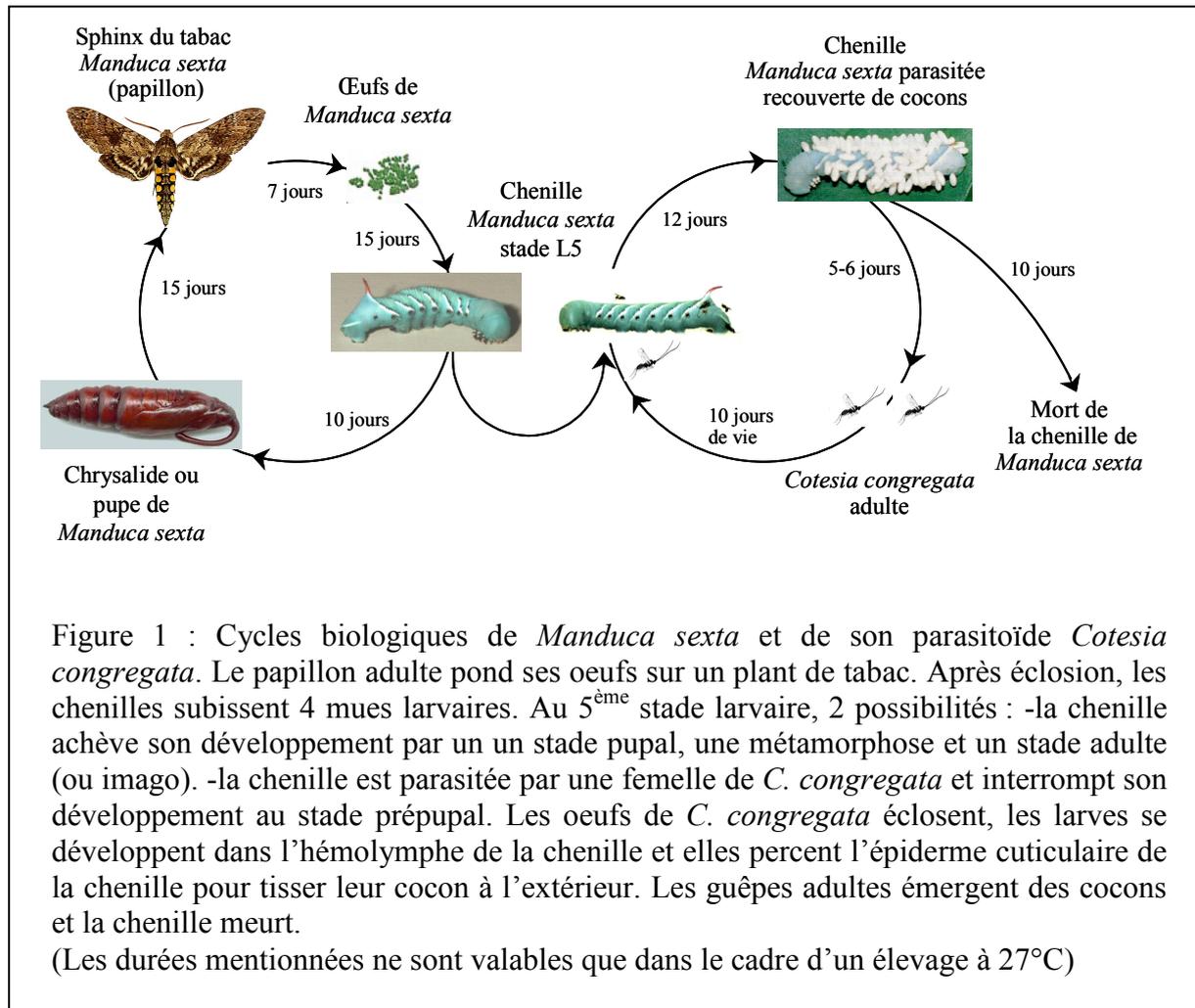
BV : bracovirus

Les polydnavirus des hyménoptères parasitoïdes seront désignés comme suit : les initiales du nom latin de l'hyménoptère (initiale du nom genre en majuscule et initiale du nom d'espèce en minuscule) suivies de BV (bracovirus) si l'hyménoptère est un braconidae ou de IV pour un ichneumonidae (ichnovirus). (Nomenclature de l'International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)

Par exemple : le polydnavirus de l'hyménoptère braconidae *Cotesia congregata* = CcBV

CONTEXTE GLOBAL DE LA THÈSE

Le modèle étudié au cours de ce travail est un modèle hôte/parasitoïde impliquant trois partenaires : l'hyménoptère parasitoïde koïnobionte *Cotesia congregata*, son hôte, la chenille du lépidoptère *Manduca sexta* et un bracovirus nécessaire à la réussite du parasitisme (Fig. 1). La guêpe *C. congregata* pond ses oeufs à l'intérieur de la chenille hôte.



Les oeufs du parasitoïde sont tolérés par le système immunitaire de l'hôte grâce à l'intervention du troisième partenaire. Effectivement, parallèlement aux oeufs, des particules virales sont injectées dans l'hôte lors de la ponte. Ces particules virales contiennent des nucléocapsides enfermant elles-mêmes des cercles d'ADN viral double brin. Les particules pénètrent dans les cellules de l'hôte et les gènes codés par cet ADN sont exprimés dans les cellules de la chenille parasitée, les protéines ainsi produites entraînent en particulier une altération de l'immunité de l'hôte et une interruption du développement de la chenille au stade

pré-pupal. Ces modifications de la physiologie de la chenille permettent aux larves de parasitoïdes d'effectuer l'intégralité de leur développement dans la chenille en se nourrissant du milieu intérieur de l'hôte tout en le maintenant vivant. A la fin du développement larvaire des parasitoïdes, les larves percent l'épiderme de la chenille hôte, et tissent un cocon à l'extérieur de la chenille dans lequel les larves effectueront leur métamorphose en imago. La chenille hôte meurt plusieurs jours après l'émergence des parasitoïdes adultes.

L'introduction bibliographique de cette thèse est composée en premier lieu d'une synthèse des connaissances actuelles sur l'immunité des insectes nécessaire car l'immunité de l'hôte est la cible principale des polydnavirus. Cette synthèse est suivie d'une présentation des effets provoqués chez l'hôte par le parasitisme, puis des facteurs de virulence introduits dans l'hôte par les parasitoïdes porteurs de polydnavirus et de leur fonction individuelle au cours du parasitisme lorsque celle-ci est entrevue.

La deuxième et la troisième partie consistent en une présentation des publications réalisées au cours de la thèse. La deuxième partie présente le modèle étudié (article 1), et la troisième partie les résultats expérimentaux : le séquençage et l'analyse du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV) (article 2), la caractérisation des familles multigéniques des protéines tyrosines phosphatases (PTP) (article 3), des cystatines (article 4) et des gènes ankyrine de CcBV (article en préparation).

Enfin, une troisième partie est consacrée à une discussion, comportant le bilan du travail réalisé et les perspectives envisagées.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

L'IMMUNITÉ INNÉE DES INSECTES

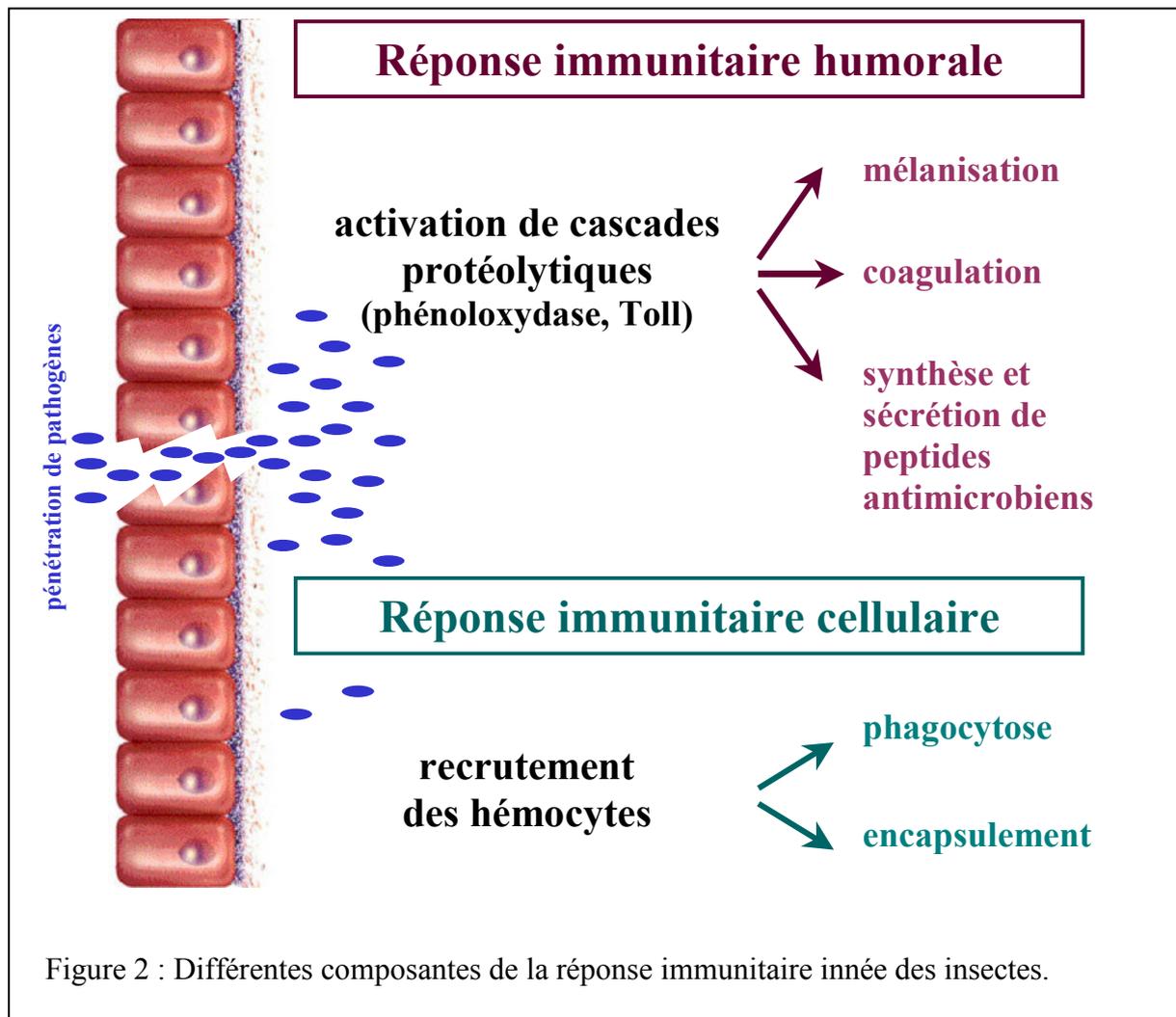
I - LA REPONSE IMMUNITAIRE INNEE DES INSECTES

Les premières barrières auxquelles un microorganisme ou un corps étranger est confronté lors de sa pénétration dans un organisme hôte, sont d'ordre physique ; il s'agit tout d'abord pour l'intrus de franchir l'épiderme externe de l'organisme ou l'épithélium digestif selon son mode de pénétration. Ensuite, le sang ou l'hémolymphe répond à l'intrusion par la coagulation ainsi que par la production de composés cytotoxiques au niveau de la zone de « blessure » correspondant au site de pénétration. Une fois ces barrières physiques franchies par l'intrus, l'hôte dispose de son système immunitaire pour éliminer la source d'agression. L'envahisseur doit alors lutter contre de nouveaux composés cytotoxiques et contre une batterie de cellules immunitaires (hémocytes). L'organisme-hôte peut prévenir et contrôler une attaque infectieuse en isolant et en éliminant le pathogène, par un certain nombre de réponses immunitaires qui reconnaissent l'élément étranger comme un élément du non soi.

Les vertébrés se défendent, contre les infections par des agents pathogènes, selon 2 modes différents : la réponse immunitaire acquise et la réponse immunitaire innée (Hoffmann 2003, Erol-Erickson 2000, Lemaitre 1999).

La réponse immunitaire innée implique des facteurs qui reconnaissent et éliminent les corps étrangers, tandis que la réponse immunitaire acquise permet aux cellules somatiques de synthétiser des récepteurs capables de reconnaître des antigènes spécifiques. Ce système de réponse immunitaire permet à l'ensemble des organismes vertébrés de développer une mémoire immunitaire. La réponse immunitaire innée semble être un mécanisme de défense ancestral partagé par la majorité des organismes métazoaires. Malgré le succès de ce mécanisme du point de vue évolutif, il n'a été que peu étudié par rapport à la réponse immunitaire spécifique adaptative des mammifères.

Les insectes représentent la majorité des espèces animales existantes, et ont colonisé tous les types d'habitats possibles. Ils sont soumis aux agressions de multiples microorganismes. Ainsi, les insectes ont dû développer des moyens efficaces pour reconnaître et lutter contre des microorganismes potentiellement nuisibles. Les arthropodes sont dépourvus de réponse immunitaire acquise, ils ont développé une réponse immunitaire innée, classiquement divisée en réponses humorale et cellulaire. Les mécanismes immunitaires des insectes ont surtout été étudiés chez les diptères et les lépidoptères.



La réponse immunitaire humorale correspond à l'activation des cascades de réaction, notamment la cascade prophénoloxylase (proPO) qui conduit à la mélanisation de l'hémolymphe et à la production de radicaux cytotoxiques tels que les dérivés oxygénés ou nitrés (Lavigne et Strand 2002), la synthèse des peptides antimicrobiens et la coagulation. La réponse immunitaire cellulaire contrôle les réponses faisant intervenir les hémocytes, telles que la phagocytose, l'encapsulation ou la nodulation (Fig 2).

Les organes et types cellulaires-clés de la réponse immunitaire des insectes sont l'hémolymphe composée d'hémocytes, élaborés dans les organes hématopoïétiques, ainsi que le corps gras, organe fonctionnellement analogue au foie des mammifères d'un point de vue immunologique, puisqu'il est le siège de la synthèse des peptides antimicrobiens.

Dans les paragraphes suivants, je m'attacherai, dans la mesure du possible, à présenter des exemples concernant plus particulièrement les lépidoptères, puisque le modèle étudié implique un hôte lépidoptère, parfois les exemples fournis concernent la drosophile à défaut d'études réalisées sur des modèles lépidoptères.

IA - Mécanismes de reconnaissance du non-soi

L'extrême rapidité de la réponse immunitaire innée des insectes est due à leur capacité à identifier une agression ainsi qu'à reconnaître la nature de cette agression. Cette efficacité est due à la présence, dans la cavité circulatoire, encore appelé hémocoèle, de récepteurs préformés libres ou bien fixés sur les cellules immunitaires. L'existence de ces récepteurs préformés appelés PRR pour Pattern Recognition Receptors a été postulée par Janeway (Janeway 1989). Ces PRR sont aussi stratégiquement présents à la surface d'autres types cellulaires tels que les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales qui sont parmi les premières cellules susceptibles de croiser les agents étrangers lors de l'infection.

On fait une distinction entre les PRR humoraux et les PRR cellulaires en fonction de leur état libre dans l'hémolymphe ou bien liés à des cellules particulières.

Ces récepteurs sont parfaitement capables de discriminer les cellules du soi des cellules du non soi, grâce à la reconnaissance de motifs moléculaires structuraux conservés présents sur les microorganismes infectieux, nommés motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMP). Les PRR, après liaison à l'organisme pathogène (ou PAMP), vont signaler la présence d'un élément pathogène qui sera identifié comme tel par le système immunitaire, et la réponse immunitaire appropriée sera déclenchée.

IA1 – Les PAMP

IA1a – Les propriétés indispensables des PAMP

Les PAMP doivent respecter 3 propriétés (Medzhitov & Janeway 1997, Hoffman *et al* 1999, Imler & Reichhart 2001) pour être reconnues par le système immunitaire inné des insectes :

-être présents uniquement sur les cellules des microorganismes infectieux, mais évidemment absents des cellules de l'hôte infecté afin de ne pas conduire à une reconnaissance du « soi » comme un élément étranger contre lequel l'hôte doit lutter,

-être partagés par de nombreuses espèces de microorganismes pathogènes, afin de compenser le nombre limité de récepteurs préformés existant par rapport à la multiplicité des microorganismes infectieux (par conséquent, ces cibles seront plutôt des motifs généraux que des structures spécifiques),

-être des molécules très conservées et surtout essentielles à la survie des microorganismes pathogènes, afin d'éviter le plus possible l'émergence de mutants dépourvus de ces motifs. Des mutations de ces molécules, indispensables au métabolisme d'un organisme, sont généralement létales pour le microorganisme ou entraînent une perte de sa pathogénicité. Si de tels mutants apparaissaient, cela entraînerait une variabilité des microorganismes qui échapperaient alors à la reconnaissance par les récepteurs préformés.

IA1b – La nature des PAMP

Les structures conservées (ou PAMP) reconnues le plus généralement sont les liposaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PGN), respectivement présents à la surface des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les molécules de mannose très conservées à la surface des parois cellulaires des levures sont également reconnues (Medzhitov & Janeway 2002). L'ADN génomique bactérien peut aussi être identifié par des PRR puisqu'il porte des motifs nucléotidiques caractéristiques, les îlots CpG non méthylés, ce qui permet aux PRR de les distinguer des ADN eucaryotes dépourvus de ces motifs (Krieg 2000).

IA2 - Les récepteurs préformés (PRRs)

Les récepteurs de reconnaissance préformés (PRR), reconnaissant les agents pathogènes, peuvent être de 2 types (Tab. 1) (Janeway & Medzhitov 2002) :

- les PRR humoraux ou solubles qui regroupent les récepteurs sécrétés,
- les PRR cellulaires qui correspondent aux récepteurs endocytiques des cellules immunitaires, récepteurs de surface et récepteurs intracellulaires.

Tableau 1 : récapitulatif des récepteurs préformés des insectes, impliqués dans la reconnaissance des microorganismes pathogènes

	Motifs reconnus	Organismes reconnus	Localisation
Récepteurs préformés humoraux			
Hémolines	LPS (lipopolysaccharides)	bactéries Gram négatif	
	Acide lipotéichoïque	bactéries Gram positif	
PGRP (protéine de reconnaissance des peptidoglycanes)	Peptidoglycanes	bactéries Gram positif	
β GRP (protéine de reconnaissance des β -1,3-glucanes)	β -1,3-glucane	champignons	
	Acide lipotéichoïque	levures	
GGBP (protéine de reconnaissance des bactéries Gram-négatif)		bactéries Gram négatif	
IML (Immulectines, lectines de type C)	groupement carbohydate		
	LPS (lipopolysaccharides)	bactéries Gram négatif	
Récepteurs préformés cellulaires			
PGRP transmembranaires			cellules du corps gras
			cellules du tube digestif
			hémocytes
Hémolines transmembranaires			hémocytes

Note : le récepteur Toll n'est pas considéré comme un PRR car il existe un ligand intermédiaire Spatzle, qui n'est pas un microorganisme pathogène.

IA2a - Les PRR humoraux

Après leur liaison à des PAMP de l'agent infectieux, les PRR humoraux liés à la molécule reconnue sont identifiés à leur tour par des récepteurs de surface présents sur les

hémocytes. Les réponses immunitaires de type cellulaire comme l'opsonisation, la phagocytose ou l'encapsulation vont alors être déclenchées (Bulet *et al* 1999, Schmidt *et al* 2001).

Chez *Manduca sexta*, plusieurs PRR, décrits dans les paragraphes suivants, ont été identifiés : l'hémoline, les PGRP (PeptidoGlycan Recognition Proteins), les β GRP et les immunoelectines (IML) (Kanost *et al* 2004, Yu *et al* 2002). Ces protéines se lient spécifiquement à des motifs microbiens, et les complexes ainsi formés vont conduire à l'activation de la réponse immunitaire notamment le système d'activation proPO (proPhénolOxydase).

IA2a α - Les hémolines

L'hémoline est une protéine plasmatique appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig) (Su *et al* 1998). Elle n'a été identifiée que chez quelques espèces de Lépidoptères (*Hyalophora cecropia* (Rasmuson & Boman 1979), *Manduca sexta* (Ladendorff & Kanost 1990), *Hyphantria cunea* (Shin *et al* 1998), *Lymantria dispar* (Lee *et al* 2002)) mais aucun orthologue n'a été trouvé chez la drosophile ou l'anophèle.

L'expression de l'hémoline est fortement induite par une agression bactérienne chez les chenilles des lépidoptères *Hyalophora cecropia* (Rasmuson & Boman 1979), *Hyphantria cunea* (Shin *et al* 1998) et *Manduca sexta* (Ladendorff & Kanost 1990 et 1991, Wang *et al* 1995). L'expression de l'hémoline est aussi régulée au cours du développement. Elle est synthétisée précocément dans l'embryon (Bettencourt *et al* 2000), et est présente durant le développement, dans l'hémolymph et le tube digestif de *M. sexta*, au stade pré-pupal et pupal en l'absence de compétition bactérienne ; ce, peut-être afin de protéger la puppe d'une éventuelle infection et d'éliminer certains tissus lors de la métamorphose (Yu & Kanost 1999, Lanz-Mendoza & Faye 1999) et d'éliminer certains tissus lors de la métamorphose.

L'hémoline de *M. sexta* se lie aux hémocytes ainsi qu'aux composants de la surface bactérienne tels que les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram-négatif et l'acide téichoïque, composant majeur de la surface des bactéries Gram-positif (Ladendorff & Kanost 1991, Zhao & Kanost 1996, Lanz-Mendoza *et al* 1996, Daffre & Faye 1997, Yu & Kanost 2002). Cette capacité de l'hémoline à se lier aux hémocytes suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la régulation de la réponse immunitaire hémocytaire (Lanz-Mendoza *et al* 1996, Daffre & Faye 1997, Lanz-Mendoza & Faye 1999). La capacité de l'hémoline à interagir avec les bactéries et la surface des hémocytes suggère que son mode de

fonctionnement pourrait être identique à celui d'une opsonine, molécule qui facilite et augmente l'efficacité de la phagocytose de ces bactéries (Kanost & Zhao 1996). L'hémoline pourrait piéger les bactéries dans des nodules d'hémocytes, par agrégation des microorganismes, permettant ainsi de débarrasser l'hémolymphe de bactéries en circulation.

Ces résultats montrant les propriétés de liaison de l'hémoline aux glycolipides présents sur les bactéries à Gram-négatif et Gram-positif suggèrent qu'elle se comporte comme un PRR à large « spécificité » dans le cadre de la défense contre les infections bactériennes.

IA2a β - Les protéines de reconnaissance des protéoglycanes (PGRP)

Certaines protéines de reconnaissance sont capables de se fixer spécifiquement à des composants caractéristiques de certaines bactéries ; en effet, les peptidoglycanes, ou protéoglycanes, sont présents sur presque tous les organismes procaryotes et particulièrement abondants sur les parois cellulaires des bactéries à Gram-positif (Dziarski 2004) et il existe des protéines se liant spécifiquement à ces motifs appelées protéines de reconnaissance des protéoglycanes (ou PGRP).

Les cDNA de 2 PGRP (β PGRP1 et β PGRP2) ont été isolés de *M. sexta* et codent pour des protéines matures de 19,43 kDa, partageant 57 % d'identité (Kanost *et al* 2004). La β PGRP1 est similaire à celle de *Bombyx mori* (54 % d'identité) et de *Trichoplusia ni* (61 % d'identité) (Yu *et al* 2002). L'expression des protéines codées par ces gènes, induite suite à une infection bactérienne, va conduire à l'activation de l'expression de gènes antimicrobiens (Dunn *et al* 1985, Iketani & Morishima 1993, Morishima *et al* 1995) et à l'activation de la cascade de protéases qui conduit à l'activation de la cascade phénoloxydase (Yoshida *et al* 1986, Jiang *et al* 2003).

Les ARNm des PGRP de *M. sexta* (M40) sont exprimés constitutivement à un faible niveau dans le corps gras des chenilles non parasitées. Ils permettent une détection immédiate des microorganismes pathogènes. Leur taux est régulé positivement 2 h après injection de bactéries (Zhu *et al* 2003), ce qui est corrélé à l'augmentation de la concentration en PGRP détectée dans le plasma, et sert à amplifier la réponse immunitaire initiée précocement grâce aux protéines constitutives.

La conservation de cette protéine dans plusieurs familles d'insectes, ainsi que chez de nombreux vertébrés tels que la souris et l'homme (60, 39 et 37% d'identité et 79, 57 et 62% de similarité avec les PGRP respectivement de *T. ni*, *Rattus norvegicus* et *Homo sapiens*)

suggère que cette molécule ancestrale a peu évolué et est devenue une molécule spécialisée dans la détection des bactéries dans le système immunitaire inné.

IA2a χ - Les protéines de reconnaissance des β -1,3-glucane (β GRP) et des bactéries Gram-négatif (GNBP)

Les infections fongiques peuvent être identifiées par des protéines qui reconnaissent des composants majeurs caractéristiques des parois cellulaires des champignons, les β -1,3-glucanes. En effet, des protéines de liaison à ces β -1,3-glucanes, les β GRP, ont été mises en évidence chez plusieurs espèces d'arthropodes (insectes et crustacés). Chez certains insectes, des protéines similaires (42, 39 et 38% d'identité respectivement avec les GNBP de *Bombyx mori*, *Hyphantria cunea* et *Anopheles gambiae*), appelées Gram-negative bacteria-binding protein (GNBP), reconnaissent les bactéries à Gram-négatif. Il a été montré que ces protéines stimulent la cascade d'activation de la proPO. Chez *M. sexta*, 2 β GRP ont été purifiées (β GRP-1 et β GRP-2) et leurs cDNA clonés. Ils présentent 57% de similarité de séquence en acides aminés (Jiang 2004). Comme les β GRP identifiées chez les autres arthropodes, les β GRP de *M. sexta* contiennent un domaine carboxy-terminal "glucanase-like" dépourvu d'activité enzymatique, ce qui est dû à des substitutions d'acides aminés clés au niveau du site catalytique. Les β GRP seraient donc des protéines dérivées de glucanase qui auraient perdu leur activité enzymatique et conservé uniquement leur capacité de reconnaissance.

Les 2 protéines sont présentes dans l'hémolymphe, alors que β GRP-2 est aussi détectée dans la cuticule (Jiang 2004). L'ARNm de β GRP-1 est présent constitutivement à faible niveau dans le corps gras et son taux n'augmente pas après injection de microorganismes. Par contre, l'ARN de β GRP-2 n'est pas détecté dans le corps gras des chenilles non-injectées, alors que son taux augmenté après injection de bactéries ou de levures (Jiang 2004).

Les β GRP de *M. sexta* se lient aux béta-1,3-glucanes et à l'acide lipotéichoïque, elles peuvent conduire à l'agrégation des bactéries Gram-négatif et Gram-positif et des levures. De plus, la liaison des β GRP aux béta-1,3-glucanes stimule l'activation de la cascade phénoloxydase dans le plasma (Jiang 2004).

IA2a δ - Les immulectines (IML)

Cette famille de protéines reconnaît les groupements sucres portés par les microorganismes pathogènes. La liaison des immulectines aux pathogènes va participer au déclenchement de la phagocytose ou de l'activation de la cascade prophénoloxydase.

Les protéines de la superfamille des lectines de type C sont des PRR de l'immunité innée, elles sont capables de se lier à un groupement carbohydate (Weis *et al* 1998, Vasta *et al* 1999). Quatre lectines de type C, nommées IML (pour immulectines), ont été purifiées à partir de chenilles de *M. sexta* soumises à une infection bactérienne (Yu *et al* 2002, Yu *et al* 1999, Yu & Kanost 2000). Chacune de ces IML est composée de 2 domaines de reconnaissance aux carbohydrates, comme les lectines se liant aux LPS connues chez les lépidoptères, *Bombyx mori* (Koizumi *et al* 1999) et *Hyphantria cunea* (Shin *et al* 2000). Les IML de *M. sexta* diffèrent par leur spécificité de liaison au ligand et par leur inductibilité suite à une infection bactérienne (Yu *et al* 2002). En effet, les 4 IML identifiées chez *M. sexta* peuvent se lier aux LPS bactériens, et IML-1 et IML-2 stimulent l'activation de la proPO dans le plasma lorsqu'elles sont liées aux LPS (Yu *et al* 1999, Yu & Kanost 2000). Un déficit des IML-2 endogènes, induit par injection d'anticorps antiIML-2, inhibe l'élimination des bactéries *Serratia marcescens* à Gram-négatif (Yu & Kanost 2003), ce qui nous indique que les IML-2 participent activement à la protection des insectes contre les bactéries à Gram-négatif. D'autre part, le fait que IML-2 interagisse avec des homologues de sérine-protéinases dans le plasma, qui sont des protéines participant à l'activation de la proPO, suggère que les immulectines participent à la localisation de la réponse phénoloxydase à la surface de la bactérie invasive (Yu & Kanost 2003).

Les 4 gènes IML de *M. sexta* ont des profils d'expression différents. IML-1 n'est pas présent dans le plasma des chenilles non infectées, alors que son taux d'ARNm augmente fortement après injection bactérienne et la concentration protéique dans le plasma atteint 1 μ g/mL. A l'inverse, IML-2 est présent constitutivement à un faible niveau et augmente de façon très importante suite à une attaque bactérienne de type Gram-négatif jusqu'à atteindre la concentration la plus forte des IML. En ce qui concerne IML-3 et IML-4, elles sont toutes les 2 exprimées constitutivement et leur concentration ne change pas significativement à la suite d'une infection bactérienne. Nous verrons plus loin que les lectines de type C sont présentes dans le génome du bracovirus de *Cotesia congregata* (cf partie IIC2e).

IA2b – Les PRR cellulaires

Peu de données sont disponibles concernant les PRR cellulaires des hémocytes impliqués dans la reconnaissance des microorganismes.

Douze gènes codant pour des protéines possédant des homologies de séquences avec des protéines de reconnaissance des peptidoglycanes (PGRP), ont été identifiés dans le génome de la drosophile (Werner *et al* 2000). Plusieurs de ces gènes possèdent des domaines transmembranaires ce qui suggère qu'ils constituent des récepteurs de surface cellulaire et des ARNm de chacun de ces gènes ont été détectés dans des organes impliqués dans l'immunité comme le corps gras, le tube digestif et les hémocytes. Une étude plus récente a mis en évidence que la protéine codée par l'un de ces gènes, *PGRP-LC*, est l'activateur de la voie Imd (cf partie IA3) responsable de la synthèse de peptides antimicrobiens (Werner *et al* 2003). Il existe plusieurs isoformes de cette protéine et cette étude a aussi montré que chacun de ces isoformes se lie préférentiellement aux peptidoglycanes des bactéries Gram positif (PGRP-LCx) ou aux lipopolysaccharides des bactéries de Gram-négatif (PGPR-LC a et x) et suscite une réponse immunitaire différente.

De même, une étude a montré que l'hémoline, qui est généralement classée parmi les PRR humoraux, pourrait être aussi classée dans la catégorie des PRR cellulaires, bien qu'elle soit dépourvue de région transmembranaire prédite. En effet, l'analyse d'extraits de membranes d'hémocytes du lépidoptère *Hyalophora cecropia*, a révélé la présence d'une molécule ressemblant aux hémolines solubles, de masse moléculaire différente (52 kDa) et possédant des propriétés d'adhésion cellulaire différentes. L'hémoline forme des complexes de haut poids moléculaire avec des hémocytes, indissociables même en présence de SDS (Bettencourt *et al* 1997). Ces hémolines sont supposées intervenir dans la modulation des capacités d'adhésion des hémocytes.

Dans le génome de la drosophile, 2 gènes impliqués dans le déclenchement de la réponse immunitaire ont été identifiés : le gène *Toll* et le gène *immune deficiency (imd)* (Imler & Hoffmann 2000). Des gènes apparentés à *Toll* ont aussi été identifiés chez d'autres insectes comme les moustiques et la mouche Tsetse (Luo & Zheng 2000). Les voies de signalisation activées par les gènes *Toll* et *imd*, déclenchent l'expression de plusieurs peptides antimicrobiens. Par contre, on ne peut pas considérer *Toll* comme un récepteur préformé de

type cellulaire dans la mesure où son seul ligand extracellulaire connu est une forme clivée de la protéine cytoplasmique spatzle (spz) (Levashina *et al* 1999).

IA3– Les voies Toll, Imd et JAK-STAT

Toll est un récepteur transmembranaire, connu initialement pour son rôle dans la formation de l'axe dorso-ventral de l'embryon de drosophile. Ce récepteur est composé de 2 domaines : un domaine extracellulaire riche en répétitions leucines, et un domaine intracellulaire ressemblant à un récepteur de l'interleukine-1 ou TIR (pour Toll/Interleukine-1 Receptor Domain).

Ce récepteur est impliqué dans la voie Toll, cascade protéolytique régulant la transcription des gènes codant pour des peptides antimicrobiens. Une deuxième voie, la voie Imd (pour immune-deficiency) participe aussi à la régulation de la synthèse de ces peptides.

La différence entre ces 2 voies réside dans les microorganismes activateurs : la voie Toll est activée en réponse à une infection par des bactéries Gram positif ou des champignons, alors que la voie Imd est activée par des bactéries Gram négatif. Ces 2 voies, Toll et Imd, sont conservées chez les vertébrés, homologues respectivement des voies IL1-R/NF- κ B et TNF-R1 des mammifères (Medzhitov *et al* 1997, Lemaitre 2004).

Dans les 2 cas, ces voies de signalisation vont aboutir à la libération de facteurs de transcription maintenus dans le cytoplasme des cellules du corps gras, qui vont activer la synthèse de peptides antimicrobiens suite à leur translocation dans le noyau des cellules (Fig 3). Il est intéressant de noter que la découverte de l'implication de la voie Toll dans l'immunité de la drosophile et surtout la complexité et la performance de cette réponse immunitaire innée ont conduit les scientifiques à se pencher de plus près sur l'immunité innée des vertébrés jusqu'alors peu étudiée (Medzhitov *et al* 1997).

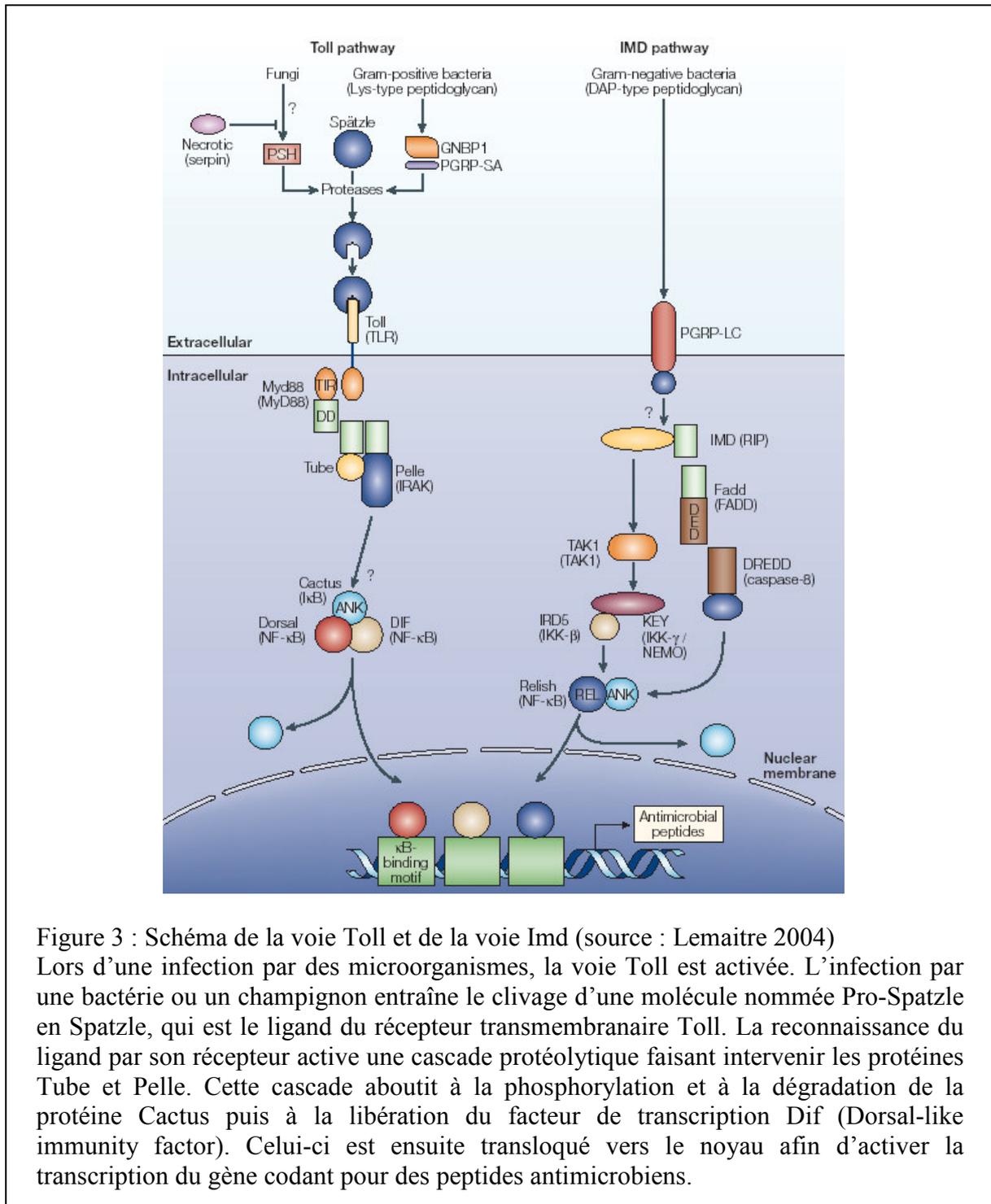


Figure 3 : Schéma de la voie Toll et de la voie Imd (source : Lemaitre 2004)

Lors d'une infection par des microorganismes, la voie Toll est activée. L'infection par une bactérie ou un champignon entraîne le clivage d'une molécule nommée Pro-Spatzle en Spätzle, qui est le ligand du récepteur transmembranaire Toll. La reconnaissance du ligand par son récepteur active une cascade protéolytique faisant intervenir les protéines Tube et Pelle. Cette cascade aboutit à la phosphorylation et à la dégradation de la protéine Cactus puis à la libération du facteur de transcription Dif (Dorsal-like immunity factor). Celui-ci est ensuite transloqué vers le noyau afin d'activer la transcription du gène codant pour des peptides antimicrobiens.

La voie Toll est activée après fixation d'une bactérie pathogène sur une protéine PGRP-SA (pour *Short isoform A*) présente dans l'hémolymph. PGRP-SA active alors une cascade de protéases à sérines (les protéases impliquées dans la voie Toll de l'immunité sont actuellement inconnues, par contre, les 4 protéases à sérines impliquées dans la voie Toll du développement ont été identifiées : gastrulation defective, easter, snake et nudel) qui conduit à

la dissociation du complexe protéique ProSpatzle (Weber *et al* 2003). Une cytokine clivée, du nom de Spatzle, est ainsi libérée. Le ligand Spatzle se fixe sur son récepteur, Toll, ce qui induit une cascade de signalisation cytoplasmique impliquant les protéines dMyD88, Tube Pelle, une kinase (homologue de IRAK chez les mammifères). Cette voie aboutit à la dégradation de la protéine Cactus et à la dissociation du complexe Cactus/Dif (correspondant au complexe I κ B/NF- κ B des mammifères), libérant ainsi le facteur de transcription Dif (dorsal étant le nom de la protéine homologue de Dif dans la voie Toll du développement). Le facteur Dif est transloqué dans le noyau où il va activer la transcription des gènes codant pour les peptides antimicrobiens (Anderson 2000, Michel *et al* 2001) tels que la drosomycine, un antifongique (Lemaitre *et al* 1996). Ces peptides antimicrobiens confèrent à l'organisme une résistance à l'infection par des champignons microorganismes de différents types (cf partie IC1).

La voie de signalisation Imd, quant à elle, est activée suite à l'infection de bactéries Gram négatif puis à leur fixation sur un récepteur transmembranaire PGRP-LC (pour *Long isoform C*). Une protéine Relish, ressemblant à NF- κ B, est présente dans le cytoplasme ; elle est composée d'un domaine Rel en C-terminal et d'un domaine à répétition ankyrine en N-terminal. La cascade Imd va conduire à l'activation protéolytique de Relish, par l'intermédiaire d'une caspase Dredd et d'une kinase, IKK (pour I κ B kinase). La protéine mature obtenue Relish, possède une extrémité N-terminale de type Rel, et correspond à un facteur de transcription qui, une fois transloqué dans le noyau, régule l'expression des gènes codant pour des peptides antibactériens (Gottar *et al* 2002) tels que la diptéricine.

Ces 2 voies, Toll et Imd vont tout particulièrement nous intéresser puisqu'elles sont contrôlées négativement par des protéines contenant des motifs à répétition ankyrine (cactus). Or nous avons identifié 6 gènes dans le génome du bracovirus de *Cotesia congregata* présentant des similarités avec le gène cactus de la drosophile. Ceci suggère que ces gènes viraux riches en répétitions ankyrine pourraient bloquer les réactions immunitaires de l'hôte en inhibant constitutivement les voies Toll et /ou Imd.

Une autre voie semble être impliquée dans la réponse immunitaire de la drosophile : la voie JAK-STAT (Agaisse *et al* 2003). Cette voie est déclenchée par les hémocytes de drosophile quelques minutes après infection par des bactéries Gram négatif portant des LPS à leur surface. Cette cascade de signalisation est indispensable dans le corps gras pour

l'induction de la synthèse de plusieurs gènes impliqués dans une réponse à une infection, notamment le gène *TotA*, codant pour des protéines contenant un thiolester qui pourrait être une opsonine (Agaisse *et al* 2003).

IB - La réponse immunitaire innée humorale des insectes

La réponse immunitaire humorale comprend des processus aussi variés que la coagulation, la synthèse des peptides antimicrobiens et l'activation de la cascade prophénoloxydase, pouvant elle-même conduire à la synthèse de composés cytotoxiques et à la mélanisation.

IB1 – Coagulation

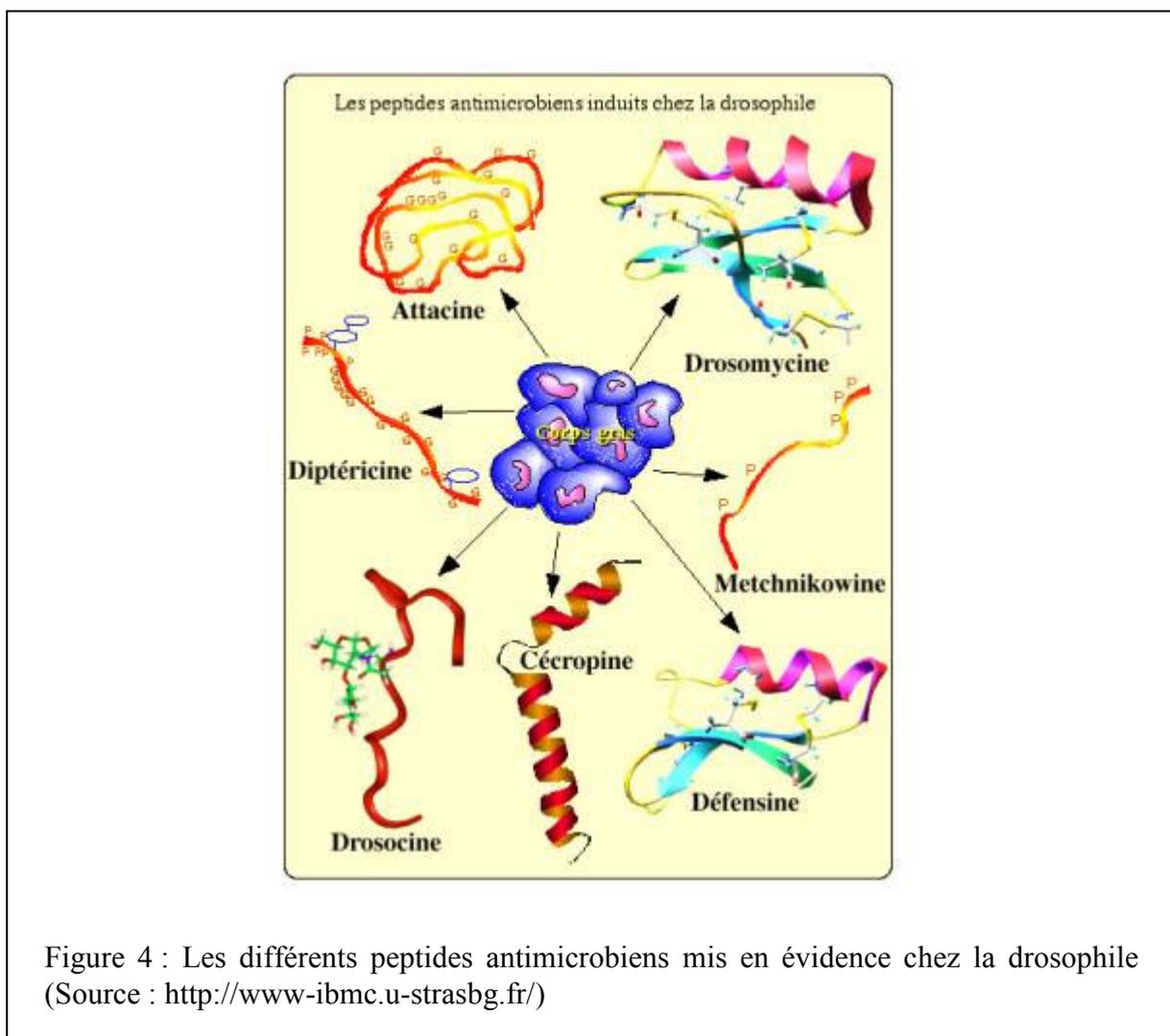
La coagulation de l'hémolymphe des insectes est aussi appelée hémostasie. Cette réaction peut être considérée comme appartenant aux réponses immunitaires permettant de refermer une brèche de l'épiderme qui aurait été causée par une blessure. Cette réaction permet d'éviter une perte trop importante de liquide corporel, ainsi que de limiter la propagation des microorganismes dans l'organisme blessé. L'ensemble des mécanismes mis en oeuvre afin de limiter la perte d'hémolymphe est appelé système hémostatique. L'ouverture créée par la blessure va être refermée par l'intermédiaire de cascades enzymatiques qui vont aboutir à la formation d'un caillot par liaisons croisées entre protéines conduisant à leur agglutination. Les arthropodes, étant pourvus d'un système circulatoire ouvert, utilisent la formation de caillot de façon beaucoup plus intensive que les vertébrés, sans risque de thrombose. Les liaisons croisées entre protéines peuvent être dues à 2 mécanismes : le premier est le système de coagulation, qui va finalement conduire aux dépôts de protéines spécialisées coagulables comme une protéine de la famille des vitellogénines (Hall *et al* 1999), et le deuxième, la cascade d'activation de la prophénoloxydase (proPO) qui conduit à l'activation de la phénoloxydase (PO).

IB2 - Synthèse des peptides antimicrobiens

Toute introduction d'un microorganisme pathogène dans le milieu intérieur d'un insecte déclenche une réponse antimicrobienne systémique correspondant à la synthèse d'une batterie de peptides antimicrobiens (Hoffmann & Reichhart 1997). La production de ces peptides est rapide, elle a généralement lieu quelques heures après la pénétration du

microorganisme pathogène. La synthèse de ces molécules se déroule dans le corps gras des insectes.

Sept peptides antimicrobiens (Fig. 4) ont été caractérisés chez la *Drosophile*, parmi eux, 5 possèdent des activités dirigées contre les bactéries (la diptéricine (Wicker *et al* 1990), la cécropine (Kylsten *et al* 1990), l'attacine (Asling *et al* 1995), la drosocine (Bulet *et al* 1993) et la défensine (Dimarcq *et al* 1994). La drosomycine (Fehlbaum *et al* 1994) est un antifongique et la metchnikowine (Levashina *et al* 1995) possède, elle, les 2 activités antibactérienne et antifongique.



Le suivi de l'expression d'un de ces peptides antimicrobiens a été réalisé chez la *Drosophile*. En effet, un transgène formé de la fusion entre le promoteur du gène de la drosomycine et le transgène rapporteur GFP (Green Fluorescent Protein) a permis de

visualiser les zones où la transcription du gène de la drosomycine est activée après l'injection de différentes bactéries (Ferrandon *et al* 1998). La GFP est une protéine fluorescente et permet donc de visualiser l'expression de la drosomycine. Celle-ci débute moins d'une heure après l'injection et atteint son maximum 6 à 12 h pour diminuer ensuite progressivement.

Ces protéines portent une séquence de peptide signal leur permettant d'être ensuite sécrétées dans l'hémolymphe. Les molécules synthétisées vont s'accumuler dans l'hémolymphe et atteindre des concentrations allant jusqu'à 100 mM pour la drosomycine. Les peptides antimicrobiens possèdent une partie chargée positivement (cations) qui leur permet de se fixer au niveau des groupements polaires hydrophiles des phospholipides des membranes des microorganismes pathogènes et une partie hydrophobe qui permet leur insertion dans la membrane des microorganismes. Cette fixation déstabilise la structure de la membrane, lyse la paroi formant des pores. La paroi ainsi rendue perméable laisse entrer de l'eau aboutissant à la mort de l'agent pathogène. Une étude montre que les peptides antimicrobiens sont aussi exprimés dans des épithéliums en relation avec le milieu extérieur de l'hôte, tels que les tractus digestif, respiratoire et reproducteur (Ferrandon *et al* 1998).

IB3 – L'activation de la cascade proPhénolOxydase (proPO)

La phénoloxydase est impliquée dans l'immunité des insectes, par la production de composés cytotoxiques oxygénés (ROI) et nitrés (RNI) mais également la sclérotisation c'est-à-dire le durcissement de la cuticule des insectes.

La cascade protéolytique du système d'activation de la prophénoloxydase est activée par de nombreux éliciteurs microbiens, des molécules inductrices des mécanismes de reconnaissance telles que les PAMP (cf partie IA1b) qui sont reconnus par des PRR (Marmaras 1996).

Des études ont montré que la cascade peut aussi être activée par des éliciteurs non microbiens tel que des agents dénaturants ou des protéines dénaturées ; ceci tend à montrer que la phénoloxydase a un rôle dans les fonctions de nettoyage qui peuvent être activées indépendamment de la présence d'éliciteurs microbiens. Les différents éliciteurs non microbiens peuvent être des phospholipides rejetés par des cellules endommagées (Sugumuran & Kanost 1993) ou bien des lipophorines dénaturées (Leonard *et al* 1985).

La proPO, forme inactive, est présente dans l'hémolymphe des invertébrés. Elle a été caractérisée chez plusieurs Lépidoptères (*Bombyx mori*, *Manduca sexta*, *Galleria mellonella*) comme une protéine monomérique d'une masse de 70 à 80 kDa (Kopacek 1995). La cascade

phénoloxydase est activée par un processus à plusieurs étapes (Fig. 5), impliquant une série de protéines, notamment des protéinases à sérines (Sugumaran 2002), ayant, elles-mêmes, préalablement été activées par des constituants des parois cellulaires microbiennes. Après son activation, la phénoloxydase a une masse comprise entre 60 et 70 kDa.

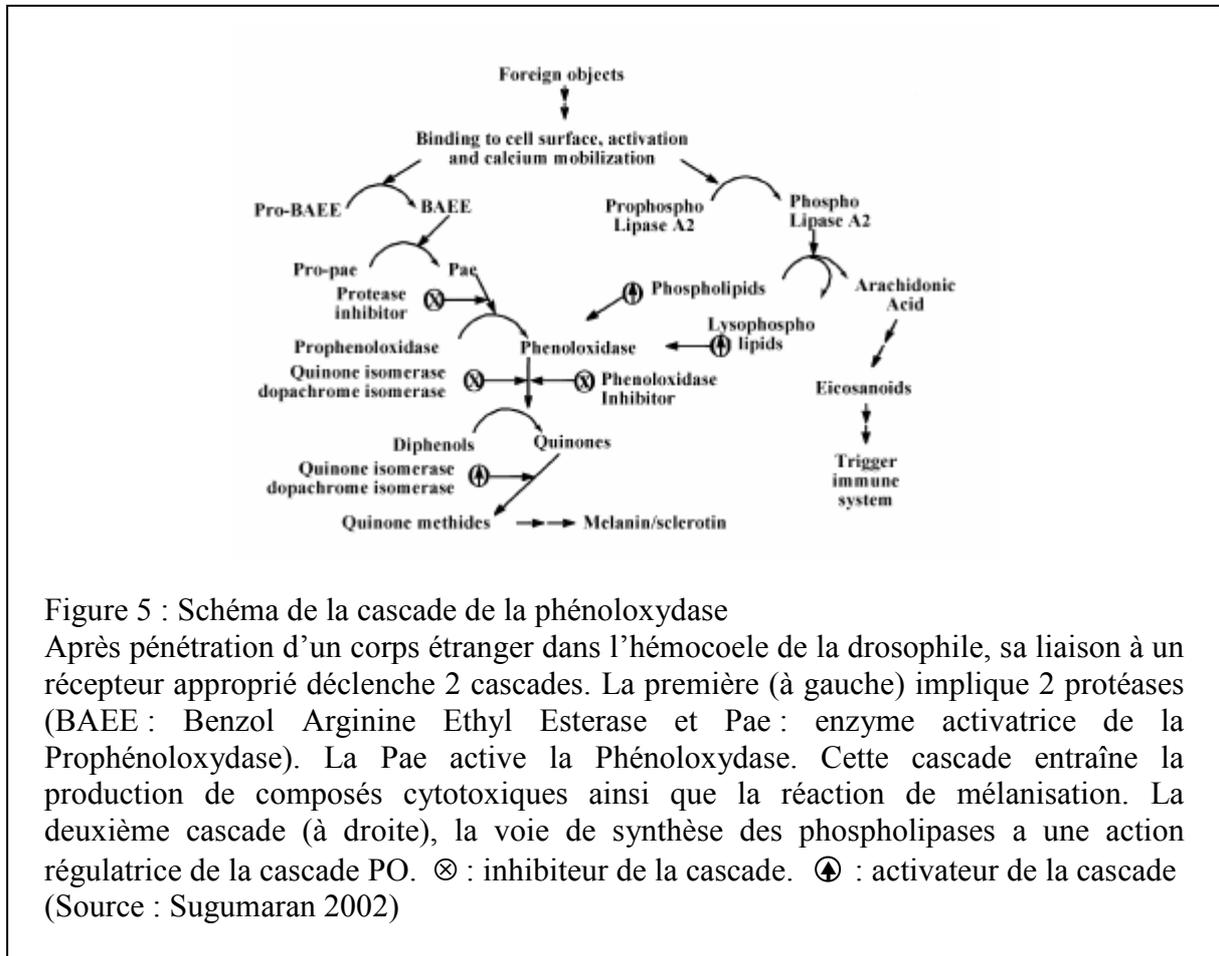


Figure 5 : Schéma de la cascade de la phénoloxydase

Après pénétration d'un corps étranger dans l'hémocoel de la drosophile, sa liaison à un récepteur approprié déclenche 2 cascades. La première (à gauche) implique 2 protéases (BAEE : Benzol Arginine Ethyl Esterase et Pae : enzyme activateuse de la Prophénoloxydase). La Pae active la Phénoloxydase. Cette cascade entraîne la production de composés cytotoxiques ainsi que la réaction de mélanisation. La deuxième cascade (à droite), la voie de synthèse des phospholipases a une action régulatrice de la cascade PO. ⊗ : inhibiteur de la cascade. ⊕ : activateur de la cascade (Source : Sugumaran 2002)

Certaines protéines telles que l'enzyme de conversion de la dopachrome et la quinone isomérase sont des protéines à activité régulatrice de la cascade d'activation de la proPO (Sugumaran 2002). Des variations dans la concentration relative des métabolites-clés de la cascade influencent l'activité de la phénoloxydase, augmentant parfois la sclérisation au détriment de la production d'intermédiaires quinoïdes antibactériens pour la biosynthèse de la mélanine (Nappi & Ottaviani 2000).

La cascade d'activation de la proPO a été décrite comme une partie indépendante de la réponse immunitaire humorale, mais il est très probable que la PO soit impliquée aussi dans d'autres voies du système immunitaire, comme le système de coagulation. La PO par sa

liaison au caillot, augmente l'activité antibactérienne des autres mécanismes immunitaires localisés à cet endroit et participe à la guérison de la blessure (Lai-Fook 1966).

IB3a – La synthèse de dérivés toxiques oxygénés et nitrés

Parmi l'arsenal de moyens dont disposent les insectes pour combattre l'attaque de microorganismes pathogènes, les molécules cytotoxiques sont certainement parmi les plus importantes puisqu'elles sont responsables de la mort des pathogènes. Les insectes utilisent notamment des molécules appelées ROI et RNI (Reactive Oxygen ou Nitrogen Intermediate) ou dérivés toxiques oxygénés ou nitrés. A ma connaissance, à ce jour, aucune étude n'a été menée sur ces composés chez les lépidoptères, par contre la drosophile constitue un modèle plus étudié.

Le déclenchement de la réaction immunitaire dans une larve de drosophile est accompagné d'une élévation du taux de O_2^- et de H_2O_2 (Nappi *et al* 1996). La synthèse de ROI et RNI est déclenchée en réponse à l'activation de PLA_2 (Fig X), une phospholipase (Nappi *et al* 2004), et consécutivement à l'activation de différents processus immunitaires tels que la réaction de mélanisation ou de phagocytose (Nappi *et al* 2000). Les mono- et les diphénols peuvent être oxydés par la phénoloxydase, et les composés intermédiaires formés sont toxiques pour les microorganismes comme la phénoloxydase elle-même (Nappi & Ottaviani 2000). L'oxyde nitrique (NO) ainsi formé va interagir avec O_2^- et H_2O_2 afin de former du peroxynitrite ($ONOO^-$) ou encore le radical hydroxyl (OH) très réactif (Nappi & Vass 1998). Les composés toxiques oxygénés ou nitrés dérivent respectivement de l'intervention des enzymes NADPH oxydase et NO synthase. Les molécules cytotoxiques ainsi formées sont connues pour endommager les membranes plasmiques des cellules, les protéines et les acides nucléiques des agents pathogènes.

IB3b – La mélanisation

La réaction de mélanisation est le processus mis en oeuvre le plus communément suite à l'entrée d'un parasite dans un arthropode. Chez les insectes, cette réponse est enclenchée consécutivement à l'activation de la cascade proPO. La réaction de mélanisation se traduit par un phénomène de noircissement du corps étranger dans l'hémolymphe ou l'épiderme de l'hôte (Fig. 6).

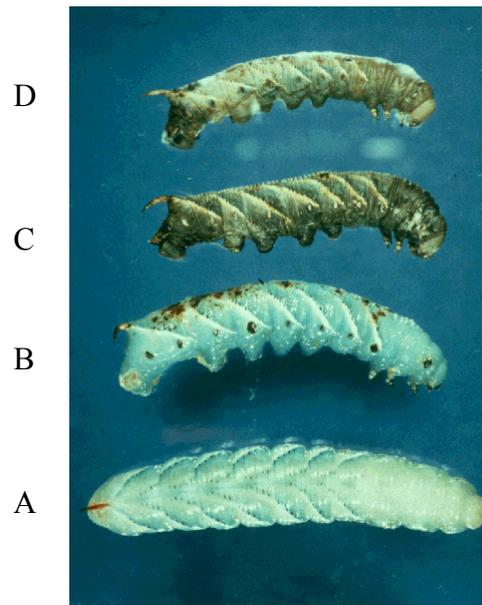


Figure 6 : Chenilles de *Manduca sexta*, Sphinx du tabac, au 5ème stade larvaire.

La chenille A est saine

Les chenilles B, C et D ont subi une infection fongique et les symptômes s'aggravent progressivement avec le temps. Le pigment noir présent sur les chenilles B, C et D est un pigment défensif : la mélanine, produit par l'insecte agressé.

La chenille D est morte, ses défenses immunitaires ont été contournées et à en juger par la présence d'un halo blanc au niveau de la partie dorsale des segments thoraciques de la chenille, le champignon commence à se développer.

Ce noircissement est entraîné par un dépôt de mélanine provenant de l'action de la phénoloxydase (monophenyl L-dopa-oxygen oxidoreductase), une oxydoréductase. Cette enzyme catalyse l'oxydation de phénols en quinones, qui vont ensuite polymériser en mélanine (Fig. 5).

IC – La réponse immunitaire innée cellulaire des insectes

La réponse immunitaire cellulaire correspond aux réponses faisant intervenir les hémocytes. Ces hémocytes peuvent intervenir directement en tant qu'acteurs ou comme intermédiaires entre l'agression par le microorganisme et la réponse à cette attaque. Ces réponses peuvent être la phagocytose, la nodulation ou l'encapsulation.

IC1 – Les hémocytes d'insectes

Les hémocytes d'insectes reconnaissent de nombreuses cibles étrangères ainsi que des altérations du « soi », telles que des cellules en apoptose. Des récepteurs humoraux et cellulaires, fixés sur les hémocytes, sont impliqués dans ces événements de reconnaissance. Une fois une cible reconnue comme étrangère, la réponse cellulaire est mise en place et régulée par des facteurs de signalisation et des molécules effectrices contrôlant l'adhésion cellulaire et la cytotoxicité. Comme chez les mammifères, plusieurs éléments semblent indiquer que les réponses de défense de type cellulaire et de type humoral sont fortement coordonnées l'une à l'autre (Lavine & Strand 2002).

La distinction entre réponse immunitaire cellulaire et réponse immunitaire humorale est purement formelle car certains facteurs humoraux affectent la fonction hémocytaire, de même que les hémocytes produisent de nombreuses molécules humorales. Les réponses immunitaires humorale et cellulaire se chevauchent aussi au niveau de processus tels que la reconnaissance des intrus étrangers. Les hémocytes reconnaissent le caractère étranger de l'envahisseur soit par interaction directe entre les récepteurs de surface des hémocytes et des molécules portées par l'organisme invasif, ou bien indirectement par reconnaissance des récepteurs humoraux qui se lient puis opsonisent la surface de l'envahisseur.

IC1a - Les différentes classes d'hémocytes et leurs fonctions

Les insectes disposent de différents types de cellules hémocytaires qui possèdent des caractéristiques morphologiques, histochimiques et fonctionnelles différentes.

Chez la *Drosophile*, les hémocytes décrits sont nommés différemment : durant l'embryogénèse, les hémocytes sont nommés macrophages ou plasmatoctes ; dans la larve, le type hémocytaire le plus abondant correspond toujours aux plasmatoctes, mais on

rencontre aussi 2 autres types hématocytaires appelés lamellocytes et cellules à cristaux. Les lamellocytes se différencient uniquement en réponse à un parasitoïde et sont responsables de la réaction d'encapsulation. Les cellules à cristaux sont des hématocytes non-adhésifs qui contiennent des précurseurs de la phénoloxydase et sont morphologiquement très ressemblantes aux oenocytoides des Lépidoptères.

Le plus fréquemment, chez les lépidoptères, on distingue 5 types d'hématocytes : les prohématocytes, les plasmatoctes, les granulocytes, les sphérulocytes et les oenocytoides (Lavine & Strand 2002). La réponse immunitaire cellulaire des lépidoptères implique l'activité des 2 principales classes d'hématocytes : les plasmatoctes et les granulocytes. Les hématocytes les plus décrits sont ceux de *Pseudoplusia includens* (Fig 7).

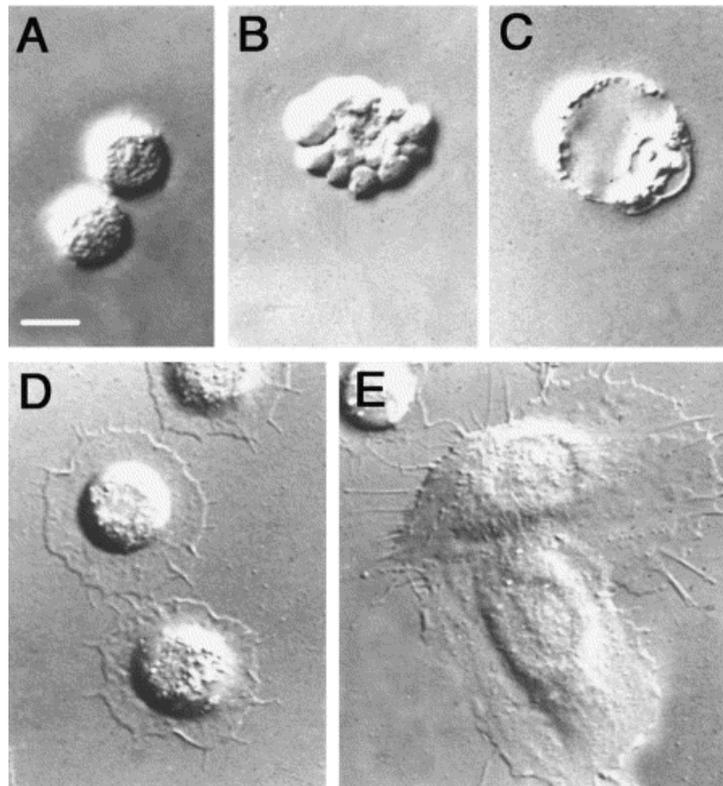


Figure 7 : Micrographie en Nomarski de cellules souches d'hématocytes (A : prohématocyte) et des 4 types d'hématocytes différenciés (B : sphérulocyte, C : oenocytoides, D : granulocyte, E : plasmatoctes) identifiés chez le lépidoptère *Pseudoplusia includens*.

(Source : Lavine & Strand 2002)

Les prohémyocytes sont les cellules souches qui se différencient en l'un des 4 types hémyocytaires mentionnés. Durant le stade larvaire des lépidoptères, les granulocytes et les plasmatocytes, qui représentent plus de 50 % des hémyocytes en circulation, sont les seuls capables d'adhérer à une surface étrangère. Les sphérulocytes sont impliqués dans le transport de composés cuticulaires. Quant aux oenocytoïdes, contenant des précurseurs de la phénoloxydase cytoplasmique, ils sont impliqués dans le phénomène de mélanisation.

Outre, les caractéristiques morphologiques, on dispose depuis peu, d'outils moléculaires performants, les anticorps monoclonaux, pour distinguer les différentes classes d'hémyocytes, les plasmatocytes, granulocytes, oenocytoïdes et sphérulocytes (Willott *et al* 1994, Wiegand *et al* 2000) (cf partie IC2b Fig 8). Ces outils sont disponibles chez *M. sexta* (Nardi 2004) et devrait permettre de mieux comprendre l'altération des mécanismes cellulaires au cours du parasitisme.

IC1b – L'hématopoïèse

Chez la drosophile, les hémyocytes se développent pendant les stades embryonnaire et larvaire (Meister 2000). Au cours du développement embryonnaire, une population cellulaire issue du mésoderme antérieur dorsal va coloniser l'ensemble de l'embryon afin de former des plasmatocytes et une deuxième population, les précurseurs des cellules à cristaux, reste, elle, localisée dans la région du tube digestif antérieur. A la fin du développement embryonnaire l'organe hématopoïétique, aussi appelé glandes de la lymphe, se différencie. Ces glandes contiennent toutes les cellules circulantes ainsi que les cellules souches indifférenciées. La production de lamellocytes a lieu au cours des stades larvaires et nymphal par la division des cellules souches dans les organes hématopoïétiques (Meister & Lagueux 2003, Gardiner & Strand 2000).

Chez les lépidoptères, les cellules immunitaires dérivent de 2 souches de prohémyocytes différentes. D'une part, les granulocytes dérivent du mésoderme antérieur au cours de l'embryogénèse (Nardi 2004) et d'autre part, les plasmatocytes se différencient dans les organes hématopoïétiques qui bordent les 4 disques imaginaux alaires (Nardi *et al* 2003) et se situent à la hauteur du méso- et métathorax (Gardiner & Strand 2000).

IC1c – Les fonctions des hémocytes dans la réponse immunitaire cellulaire

Les hémocytes sont impliqués dans la phagocytose, la nodulation et l'encapsulation ainsi que dans les processus de coagulation en réponse à une attaque extérieure.

La phagocytose correspond à la capture puis à l'ingestion, par une seule cellule, d'une entité pathogène. Les plasmatoctes sont capables de phagocyter aussi bien des cibles biotiques telles que des bactéries, des levures et des corps apoptotiques, que des cibles abiotiques comme des billes ou des particules d'encre. Par contre, le type hémocytaire dévolu à la phagocytose varie selon les taxons d'insectes (Anggraeni & Ratcliffe 1991, Tojoo *et al* 2000). Toutefois, chez les Lépidoptères, seuls les plasmatoctes et les granulocytes ont été décrits comme effectuant la phagocytose, et chez la *Drosophile*, seuls les plasmatoctes semblent être impliqués dans ce processus de phagocytose (Elrod-Erickson *et al* 2000).

La différence entre les mécanismes de nodulation et d'encapsulation réside dans la taille des cibles sur lesquelles se fixent les hémocytes. On parlera de nodulation lorsque la particule englobée sera de la taille d'une bactérie, et d'encapsulation pour des cibles plus grosses telles que des oeufs de parasitoïdes, des nématodes ou des billes.

Les nodules et les capsules semblent assez comparables au niveau structural (Ratcliffe & Gagen 1977), ce qui laisse supposer que quelque soit la taille de la cible à englober, les mêmes processus se déroulent.

Les processus d'encapsulation, comme le processus de nodulation, consistent en la formation d'une gangue de cellules enveloppant la cible. Des études montrent que *Pseudoplusia includens* reconnaît des cibles comme étant étrangères grâce à la présence de certains motifs conservés reconnus par des PRR (cf partie IA2) présents à la surface des granulocytes, alors que d'autres cibles sont reconnues par des PRR présents dans le plasma (Lavine & Strand 2001). Il semblerait aussi que les caractéristiques mêmes du corps étranger (composition biochimique, charge...) influencent la réponse d'encapsulation. Chez *Pseudoplusia includens*, il a été montré que certains corps sont plus souvent encapsulés que d'autres, tels que les billes pourvues de groupements fonctionnels sulfoniques, diéthylaminoéthyle, amine quaternaire, ou encore, des billes chargées positivement (Lavine & Strand 2001).

Chez certains lépidoptères, l'implication des granulocytes et des plasmatoctes dans la formation de la capsule est aléatoire (Wiegand *et al* 2000), tandis que chez d'autres, la

formation de la capsule est très organisée. Par exemple, chez *Pseudoplusia includens*, les granulocytes se fixent tout d'abord à la cible et sont suivis par les plasmatoctes qui forment un revêtement multicellulaire en couches successives autour de la cible finissant par l'adjonction d'une couche externe de granulocytes (cf partie IC2b Fig 8) (Lavine et Strand 2001, Lavine & Strand 2003), alors que chez la Drosophile, seuls les lamellocytes semblent impliqués dans ce processus (Schmidt *et al* 2001). Dans certaines espèces, un mécanisme de mélanisation des nodules et des capsules intervient, dans ce cas, les oenocytoides (ou cellules à cristaux chez la drosophile) jouent un rôle dans la mélanisation de la capsule.

IC2 – Les différents mécanismes de la réponse immunitaire cellulaire

IC2a – La phagocytose

Le mécanisme de phagocytose est un processus de la réponse immunitaire très conservé chez de nombreux protozoaires ainsi que chez tous les métazoaires.

Le processus de phagocytose débute lorsque la cible est liée au récepteur capable de la reconnaître en tant qu'élément étranger. Cette liaison active une cascade de signalisation qui régule la formation d'un phagosome et l'ingestion de la cible pathogène grâce à un mécanisme de polymérisation dépendant de l'actine. Le phagosome subit une maturation en phagolysosome lorsque des molécules effectrices sont introduites par un événement de fusion de vésicules. Alors, ces molécules effectrices dégradent la cible.

Le mécanisme de phagocytose n'a pas été très étudié chez les hémocytes d'insectes. Par contre, des études ont montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la phagocytose chez les mammifères, interagissent spécifiquement avec des protéines de lysat d'hémocytes de la mouche des fruits *C. capitata*. Ces résultats suggèrent que la voie de transduction de signal régulant la phagocytose est conservée entre les insectes et les mammifères (Foukas *et al* 1998, Metheniti *et al* 2001).

IC2b – L'encapsulation et la nodulation

IC2b α - Reconnaissance et liaison des granulocytes à un corps étranger

Une fois une cible pathogène reconnue, la formation d'une capsule ou d'un nodule a lieu. Ces formations nécessitent que les hémocytes circulants, qui sont des cellules non-adhésives, deviennent des cellules adhésives capables de se lier à la cible et les unes aux autres. Chez les lépidoptères, la liaison d'un granulocyte ou de PRR humoraux à la surface d'un corps étranger induit rapidement un changement dans les propriétés adhésives des plasmatoctes qui sont les principales cellules impliquées dans la formation de la capsule (Pech & Strand 1996, Pech & Strand 2000, Lavine & Strand 2002) (Fig 8).

IC2b β - Adhésion des plasmatoctes

L'activateur de plasmatoctes le plus important identifié correspond à une cytokine de 23 acides aminés appelée PSP pour Plasmatoctes Spreading Peptide (Clark *et al* 1997). Le PSP est synthétisé sous forme d'un peptide précurseur inactif de 142 résidus contenant la séquence PSP à l'extrémité C-terminale (Clark *et al* 1998). Le PSP mature est libéré après clivage du propeptide par une protéase inconnue.

Des expériences ont montré que le PSP purifié comme le PSP de synthèse entraînent, en quelques secondes, l'agrégation des plasmatoctes et leur adhésion à une surface étrangère à partir d'une concentration de 100 pM.

Des homologues de PSP de *Pseudoplusia includens* ont été identifiés chez 9 autres lépidoptères partageant 15 acides aminés identiques sur 23, et certains ont présenté une activité activatrice de plasmatoctes (Strand *et al* 2000). Mais comment ces molécules extracellulaires peuvent-elles induire un changement des caractéristiques adhésives des plasmatoctes ? Des études ont montré que la liaison des plasmatoctes avec le récepteur du peptide entraîne une exportation des molécules d'adhésion stockées dans le cytoplasme vers la surface des plasmatoctes (Strand & Clark 1999). Chez les vertébrés, 4 familles de récepteurs conduisant à l'adhésion cellulaire ont été identifiées : les cadhérines, des membres de la famille des Ig (N-CAM), les sélectines et les intégrines.

Les intégrines, protéines de la famille des immunoglobulines, sont formées de 2 sous-unités, une α et une β . Ces protéines transmembranaires hétérodimériques (α , β) se lient aux

protéines des matrices extracellulaires telles que la laminine, le collagène et la fibronectine contenant une séquence de reconnaissance caractéristique (peptide Arg-Gly-Asp ou RGD). La spécificité du ligand varie en fonction des chaînes α et β (Johansson 1999).

Le génome de la drosophile contient 5 sous-unités α , 2 sous-unités β et 3 intégrines complètes (Hynes & Zhao 2000). Chacune de ces intégrines est indispensable aux processus de développement, par contre, seule l'intégrine $\beta 3$ est impliquée dans le processus de phagocytose des microorganismes. Des études sur le diptère *Ceratitis capitata* montrent que la phagocytose d'*E. coli* par les hémocytes est dépendante d'un processus faisant intervenir une sous-unité β d'intégrine (Foukas *et al* 1998).

Le fait que plusieurs sous-unités intégrines aient été identifiées chez *Pseudoplusia includens* et que des séquences de reconnaissances caractéristiques (RGD) inhibent l'adhésion des plasmacytes, suggère que les intégrines sont impliquées dans le mécanisme d'adhésion des plasmacytes pendant l'encapsulation chez les lépidoptères (Pech *et al* 1995, Lavine & Strand 2003). De plus, pour conforter cette hypothèse, il a été montré que les intégrines sont impliquées dans les mécanismes d'adhésion des hémocytes de Crustacés et de Mollusques (Johansson 1999). D'autres expériences de « neutralisation » chez *M. sexta*, avec l'anticorps MS13 dirigé contre les plasmacytes, ont montré qu'une autre protéine de surface inconnue était aussi nécessaire à l'agrégation et à l'adhésion des plasmacytes sur un corps étranger (Wiegand *et al* 2000).

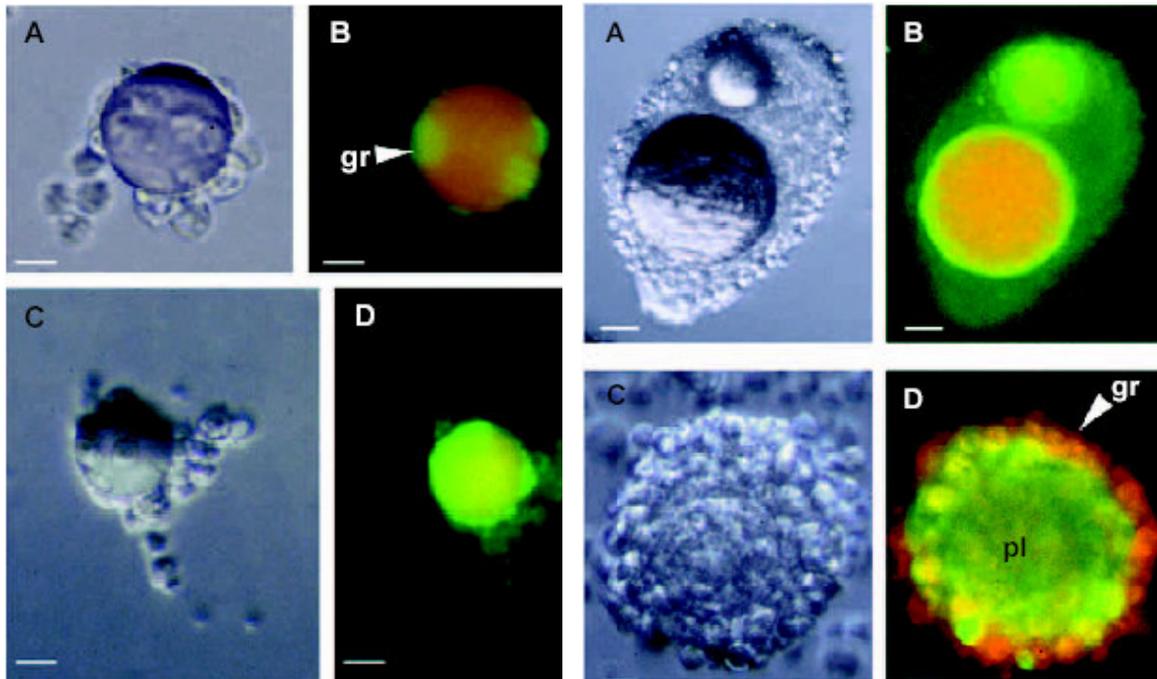


Figure 8 : Images en microscopie Hoffman et à fluorescence du processus d'encapsulation in vitro. Les photos A et B (gauche), C et D (droite), A et B (droite) et C et D (droite) sont respectivement prises 30 min, 2 h, 12 h et 24 h après l'injection de la bille. Les photos A et C sont des photos obtenues par la microscopie Hoffman, et les photos B et D sont des photos de microscopie à fluorescence avec double immunomarquage des hémocytes, qui sont colorés par des anticorps fluorescents, les granulocytes sont colorés en vert par un anticorps antigranulocyte qui fluoresce vert, et les plasmatoctes sont colorés en rouge par un anticorps antiplasmatoctes qui fluoresce en rouge. La couleur rouge orangé de la bille est due à un phénomène d'autofluorescence. (A) gauche : à 30 min, des hémocytes sont attachés à la surface d'une bille. Echelle : 20 µm. (B) gauche : seuls des granulocytes (gr) sont attachés à la bille. (C) gauche : une bille à 2 h. Echelle : 25 µm. (D) gauche : seuls les granulocytes sont attachés à la bille. (A) droite : à 12 h, 2 billes sont recouvertes d'une enveloppe formée de plusieurs couches d'hémocytes. Echelle : 60 µm. (B) droite : les mêmes billes dont la capsule est constituée presque exclusivement de plasmatoctes. Les granulocytes liés directement à la surface de la bille ne sont pas visualisables compte tenu de l'autofluorescence des billes. (C) droite : une bille à 20 h. Echelle : 25 µm. (D) droite : les plasmatoctes (pl) constituent le coeur de la capsule tandis que les granulocytes (gr) une couche monocellulaire autour de la capsule.
(Source : Pech & Strand 1996)

IC2b χ - Recrutement des granulocytes et achèvement de la capsule

Chez de nombreuses espèces, la fin de la réponse d'encapsulation n'a lieu que lorsque un équivalent de la lame basale est présent à la périphérie de la capsule (Pech &

Strand 1996, Liu *et al* 1998). Les granulocytes sont le principal type hémocytaire responsable de la sécrétion des composants formant la lame basale tapissant l'hémocoèle. Chez *P. includens*, une couche monocellulaire de granulocytes se fixe à la périphérie de la capsule à la fin d'une réaction d'encapsulation formant ainsi une couche mimant la lame basale intacte de cellule du « soi » à laquelle les plasmatoctes ne se lient plus (Pech & Strand 1996, Pech & Strand 2000). Actuellement, le signal émis par les plasmatoctes pour recruter les granulocytes est inconnu (Loret & Strand 1998), par contre, le rôle des granulocytes dans l'achèvement de la formation de la capsule est démontré. La couche externe de granulocytes est par ailleurs le siège d'un phénomène d'apoptose qui est déclenché par des facteurs libérés par les plasmatoctes (Pech & Strand 2000).

Une fois la capsule formée, l'agent encapsulé meurt presque systématiquement. Plusieurs facteurs tels que la production de composés toxiques comme des quinones et des hydroquinones par l'intermédiaire de la cascade prophénoloxydase (ProPO), de dérivés toxiques oxygénés (ROI) ou nitrés (RNI) et des peptides antimicrobiens (cf partie IB2 et 3) ont été identifiés comme des agents « tueurs » (Nappi *et al* 2000).

Les connaissances à propos de l'immunité des invertébrés se sont considérablement étendues au cours des dernières années. De nombreux acteurs protéiques et cellulaires intervenant dans les cascades de signalisation ont été identifiés ainsi que de nouvelles voies de transduction du signal aboutissant à la synthèse de gènes impliqués dans l'immunité. Les comparaisons de l'immunité innée des invertébrés avec les études consacrées à l'immunité innée des vertébrés permet des avancées importantes. La fabrication d'anticorps monoclonaux permet d'identifier avec précision les types hémocytaires participant aux processus de la réponse cellulaire. L'élargissement du champ des connaissances à propos de l'immunité des invertébrés fournira peut-être des clés afin de découvrir les mécanismes permettant le succès parasitaire des hyménoptères parasitoïdes contenant des polydnavirus. Le décodage des voies de signalisation apportera peut-être des données concernant des partenaires potentiels pour les produits des gènes polydnaviraux. Et réciproquement, les connaissances des processus par lesquels les polydnavirus parviennent à manipuler la physiologie de l'hôte fourniront aussi des indications pour une meilleure connaissance des mécanismes de l'immunité des invertébrés.

**EFFETS DU PARASITISME ET
FACTEURS DE VIRULENCE DES
PARASITOÏDES CONTENANT
DES POLYDNAVIRUS**

II – LES DIFFERENTES STRATEGIES DES PARASITOÏDES A POLYDNAVIRUS POUR MODIFIER LA PHYSIOLOGIE DE LEURS HOTES

Les relations partagées par les systèmes hôtes/parasitoïdes sont le résultat actuel de longs processus évolutifs. En effet, les mécanismes immunitaires représentent un rempart pour l'hôte contre le parasitoïde, lui permettant de reconnaître les oeufs de parasitoïde et d'échapper au parasitisme. Mais, si le parasitoïde évolue perpétuellement, des gènes vont aussi être sélectionnés dans l'hôte le rendant résistant au parasitoïde. Ceci va permettre la sélection de nouveaux gènes permettant de contourner cette adaptation, et ainsi de suite. Ce processus de coévolution est appelé la course aux armements ou la théorie de la reine rouge. Cette évolution permanente donne une impression d'équilibre stable impliquant de nombreux gènes et autres facteurs de virulence du parasitoïde.

La partie suivante fait état des différentes modifications de la physiologie de l'hôte ainsi que des multiples facteurs de virulences, propres à chacun des modèles hôte/parasitoïde, permettant ces altérations et la réussite du parasitisme. Le tableau suivant recense les couples hôte/parasitoïde qui seront mentionnés dans la suite de ce chapitre.

Tableau 2 : Couples hyménoptère parasitoïde/lépidoptère hôte mentionnés dans le texte

Parasitoïde	Hôte
Braconidae	
<i>Cotesia congregata</i>	<i>Manduca sexta</i>
<i>Chelonus inanitus</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>
<i>Glyptapanteles indiensis</i>	<i>Lymantria dispar</i>
<i>Microplitis croceipes</i>	<i>Heliothis virescens</i>
<i>Microplitis demolitor</i>	<i>Pseudoplusia includens</i>
<i>Cotesia kariyai</i>	<i>Pseudaletia separata</i>
<i>Cotesia ruficrus</i>	
<i>Cotesia rubecula</i>	<i>Pieris rapae</i>
<i>Chelonus near curvimaculatus</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
<i>Toxoneuron nigriceps</i> (= <i>Cardiochiles nigriceps</i>)	<i>Heliothis virescens</i>
Ichneumonidae	
<i>Campoletis sonorensis</i>	<i>Heliothis virescens</i>
<i>Hyposoter didymator</i>	<i>Spodoptera sp (littoralis ou frugiperda)</i>
<i>Hyposoter fugitivus</i>	
<i>Tranosema rostrale</i>	
<i>Glypta fumiferanae</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>

IIA - Altérations de la physiologie et les effets observés sur l'hôte

Le parasitisme d'une larve de lépidoptère par un hyménoptère parasitoïde à polydnavirus induit un certain nombre de modifications de la physiologie de l'hôte. Ces modifications peuvent porter sur le déroulement normal de la croissance et du développement de l'hôte et/ou sur les processus de l'immunité cellulaire ou humorale de l'hôte à différentes étapes.

IIA1 – Modification de la croissance et interruption du développement de l'hôte

Chez les insectes holométaboles, dont font partie les lépidoptères, le développement est constitué d'un stade embryonnaire, de 5 stades larvaires, d'un stade pupal et d'un stade imago ou adulte. Les 5 stades larvaires sont séparés par 4 mues larvaires, et au terme du 5^{ème} stade larvaire, la mue nymphale aboutit à la formation d'une pupe (ou chrysalide) à l'intérieur de laquelle la chenille de lépidoptère va se métamorphoser en adulte. Les mues et la métamorphose des insectes sont sous le contrôle endocrine de plusieurs hormones. Le système hormonal impliqué dans les différents types de mue met en jeu plusieurs organes : la *pars intercerebralis* du système nerveux, ainsi que les corps cardiaques (*corpora cardiaca*) et allates (*corpora allata*), organes neurohumoraux associés au cerveau et la glande prothoracique située dans le premier segment thoracique. Ces différents organes vont produire et stocker des hormones ou des facteurs activant ou inhibant d'autres synthèses hormonales (Fig 9).

Les différents types de mue sont dépendants de la production, par les cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis* du cerveau, de l'hormone prothoracotrope (PTTH). Cette hormone est transportée vers les corps cardiaques où elle est stockée. Une série de stimuli internes et externes va conduire à la sécrétion de la PTTH, qui va elle-même induire la production d' α -ecdysone par la glande prothoracique, par l'intermédiaire de la voie de transduction PTTH (Gilbert *et al* 2002). L'hormone juvénile (JH) est produite et sécrétée par les corps allates.

La mue pupale est sous la dépendance de la sécrétion d' α -ecdysone dans l'hémolymphe par la glande prothoracique. L' α -ecdysone est un précurseur de l'hormone de mue, la β -ecdysone (ou 20 hydroxyecdysone), formée dans le corps gras par hydroxylation en

C20 de l' α -ecdysone par une enzyme appelée la 20-mono-oxygénase. La β -ecdysone est à la base de l'ensemble des modifications préparant ou accompagnant les différents types de mue.

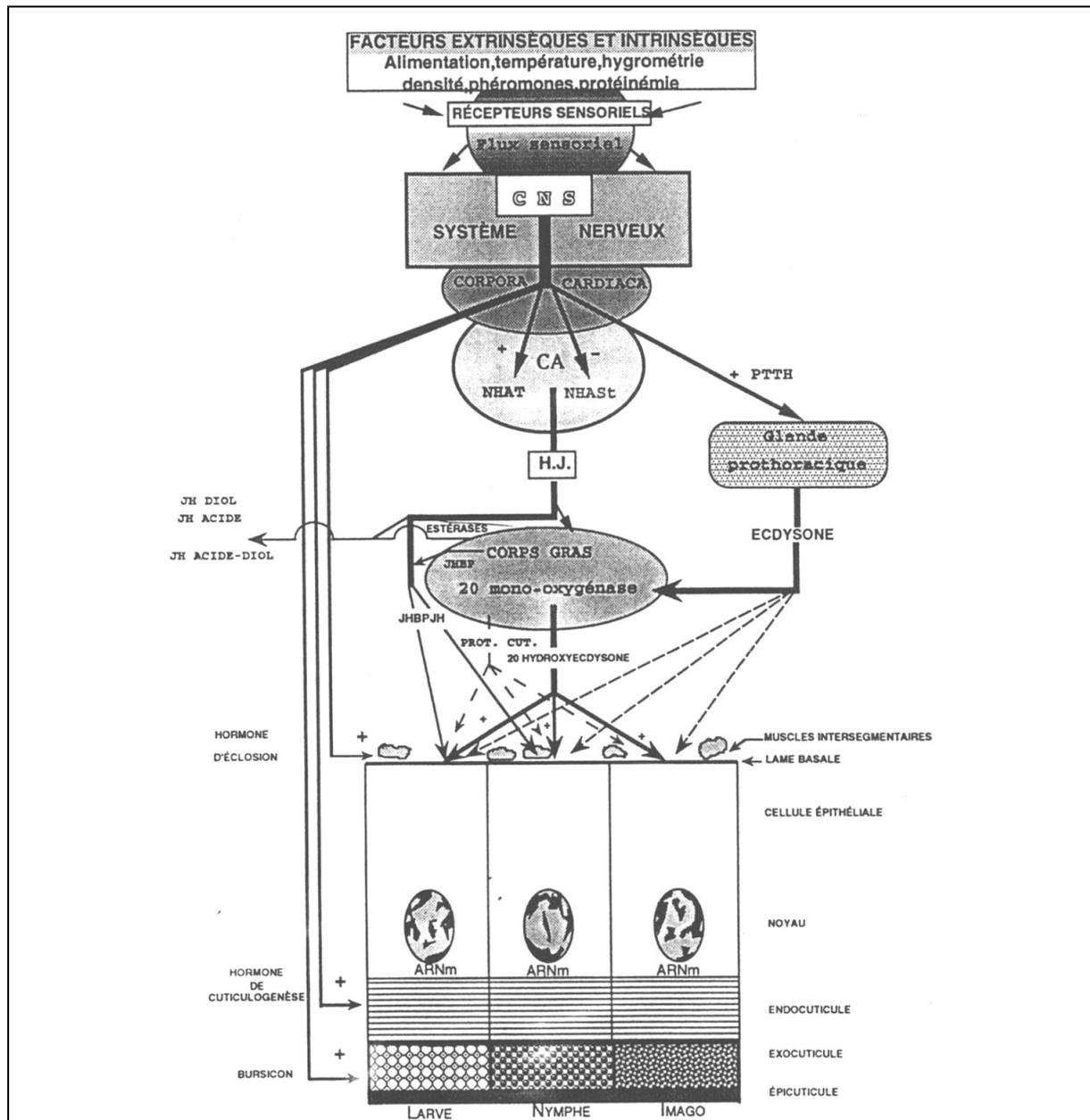
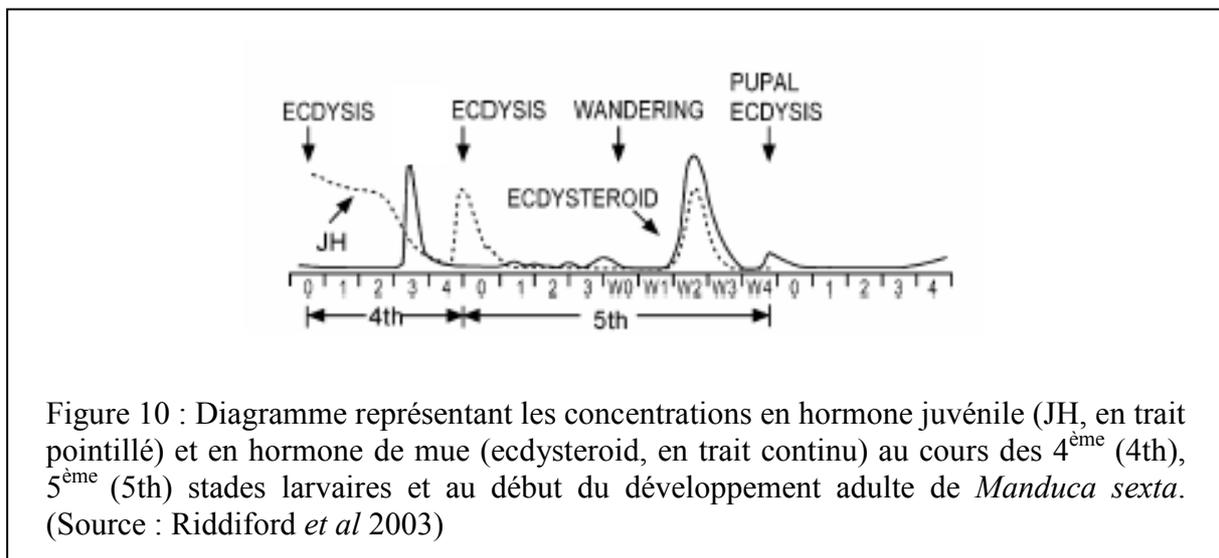


Figure 9 : Représentation schématique des divers facteurs impliqués dans le contrôle de la mue des insectes. CA : *corpora allata* ; CNS : cellules neurosécrétrices (*pars intercerebralis*) ; JHBP : protéines de liaison à l'hormone juvénile ; JHBP-JH : complexe hormone juvénile/JHBP ; NHAS_t : neurohormone allatostatique ; NHAT : neurohormone allatotrope ; PTH : hormone prothoracotrope ; Prot. Cut. : protéines cuticulaires.

(Source : Beaumont & Cassier 2000)

La présence d'hormone juvénile en concentration plus ou moins importante par rapport à la concentration en hormone de mue (β -ecdysone) va déterminer le type de mue larvaire, nymphal (ou prépupal) ou imaginal (Nation 2002). En fonction des espèces, on peut rencontrer 3 homologues d'hormone juvénile : JH I, JH II et JH III. Les chenilles de lépidoptères synthétisent très majoritairement l'homologue de type I, les taux de JH II et JH III sont négligeables, et les hyménoptères parasitoïdes synthétisent uniquement l'homologue de type JH III.

Chez *Manduca sexta*, au cours du cinquième stade larvaire, le taux d'hormone juvénile diminue (Fig.10). Ce très faible taux d'hormone juvénile corrélé à un faible taux d'hormone de mue déclenche la métamorphose (Riddiford *et al* 2003).



Au cours du parasitisme, les larves de lépidoptère parasitées par des hyménoptères parasitoïdes injectant des polydnavirus, présentent une croissance et un développement aberrants. Une variété de mécanismes vont aboutir au contrôle de la mue et suivant le type de parasitoïde, la métamorphose va être retardée, cas observé chez *Manduca sexta* et *Heliothis virescens* parasités par les parasitoïdes braconidae larvaires *Cotesia congregata* et *Toxoneuron nigriceps* (Beckage *et al* 2002) et, ou bien induite prématurément, cas observé chez les parasitoïdes ovo-larvaires tels que *Chelonus inanitus* qui pond ses oeufs à l'intérieur des oeufs de l'hôte *Spodoptera littoralis* (Lanzrein *et al* 1998, Pfister-Wilhelm & Lanzrein 1996).

Ces altérations peuvent être dues à des modifications du système endocriné de l'hôte à différents niveaux ou à la destruction des organes siège de la synthèse hormonale, comme la glande prothoracique.

Chez la larve de *Manduca sexta* parasitée par *Cotesia congregata*, l'arrêt du développement de la chenille parasitée est dû à des modifications de taux hormonaux. Le pic d'ecdystéroïde qui active la synthèse de la cuticule pupale est inhibé dans la chenille parasitée (Kelly *et al* 1998, Gelman *et al* 1998) et cette inhibition s'accompagne d'un taux d'hormone juvénile anormalement élevé (2,51 ng/mL d'hémolymphe de chenille parasitée au lieu de 0,6 ng/mL d'hémolymphe de chenille non parasitée). Des expériences de ligation des chenilles parasitées ont montré que les larves de parasitoïdes sont responsables du maintien du taux élevé d'hormone juvénile dans la chenille parasitée (Cole *et al* 2002) et que le développement larvaire des parasitoïdes et leur émergence de l'hôte sont fortement dépendants du taux d'hormone juvénile de l'hôte (Beckage *et al* 2002). De la même façon, les larves de parasitoïdes peuvent modifier les taux d'ecdysone dans l'hôte en fonction de leur propre développement (Gelman *et al* 1998). Ces études nous montrent que l'action des gènes polydnavirus peut être modulée par l'action des larves de parasitoïdes, qui libèrent, elles-aussi de l'hormone juvénile. Cependant, le polydnavirus seul joue aussi un rôle puisque l'injection de très faibles doses de bracovirus de *Cotesia congregata* purifié suffit à interrompre le développement de *Manduca sexta* au stade prépupal (Dushay & Beckage 1993).

Ces altérations du développement associées à un changement de la concentration hormonale dans l'hôte ont été montrées dans d'autres modèles. En effet, la métamorphose de la chenille du lépidoptère *H. virescens* parasitée par l'hyménoptère braconidé *Microplitis croceipes* est retardée (Webb & Dalhman 1986). Cette inhibition est due à une concentration anormalement élevée d'hormone juvénile dans l'hémolymphe de l'hôte parasité de 2 ng/mL alors qu'elle est comprise entre 0,08 et 0,5 ng/mL dans l'hémolymphe d'*H. virescens* non parasité (Balgopal *et al* 1996). Ce pic d'hormone juvénile entraîne une inhibition de la synthèse d'ecdystéroïde, l'hormone de mue. De plus, des études du parasitisme d'*H. virescens* par un autre parasitoïde, *Campoletis sonorensis*, ont montré une diminution du taux d'estérases d'hormone juvénile, conduisant au maintien du taux d'hormone juvénile dans l'hémolymphe de l'hôte (Shelby & Webb 1997).

Le développement de la chenille du lépidoptère *Heliothis virescens* parasitée par l'hyménoptère braconidae *Toxoneuron nigriceps* est interrompu au stade pré-pupal. On observe une diminution de la concentration d'ecdysone (l'hormone de mue) dans l'hémolymphe de l'hôte parasité. Cette diminution peut trouver sa cause dans la diminution du taux de phosphorylation des enzymes impliquées dans la voie de transduction du signal de PTTH (voie aboutissant à la synthèse de l'ecdystéroïde dans les glandes prothoraciques) (Pennacchio *et al* 1998b). En effet, la voie d'ecdystéroïdogénèse est interrompue par inactivation d'une protéine kinase AMPc-dépendante (Pennacchio *et al* 1998a). Le polydnavirus de *T. nigriceps* exprime un gène d'inhibiteur de protéine kinase au cours du parasitisme (Pennacchio *et al* 1998a). L'expression de gènes du polydnavirus de *T. nigriceps* entraîne quelques jours après, le blocage des capacités sécrétrices de l'hôte (Pennacchio *et al* 1998b) par dégénérescence des glandes prothoraciques (GP) de l'hôte dont les cellules sont fonctionnellement mortes (Pennacchio *et al* 1997).

Ces résultats suggèrent très fortement que le polydnavirus de *T. nigriceps* est responsable des altérations conduisant à l'interruption du développement de l'hôte parasité. été observé chez *M. sexta* parasitée.

Ces données nous intéressent particulièrement puisque une famille multigénique de protéines tyrosines phosphatases a été découverte dans les génomes des bracovirus de *Cotesia congregata* et de *Toxoneuron nigriceps*. Ces observations suggèrent que les PTP bracovirales pourraient jouer un rôle au cours de l'inhibition de la synthèse de l'ecdysone (cf partie Familles multigéniques, PTP) en étant responsables de la déphosphorylation des protéines de la voie PTTH.

IIA2 – Immunosuppression de l'hôte

Lors du parasitisme, les hyménoptères pourvus de polydnavirus sont capables de contourner les défenses immunitaires de leur hôte, un arsenal de techniques a été développé afin d'inhiber ces mécanismes.

IIA2a - Réponse cellulaire

Les réponses immunitaires antivirales des insectes face à une agression virale sont très peu connues. Une étude a montré que la réponse immunitaire cellulaire est activée chez

Manduca sexta lors d'une infection par du baculovirus d'*Autographa californica* (AcMNPV). Le baculovirus est alors incapable de se propager de façon systémique et les hémocytes sont rapidement recrutés et forment des capsules isolant les zones infectées. Lorsque la chenille de *M. sexta* est co-infectée par du baculovirus et du bracovirus de *Cotesia congregata* (Washburn *et al* 2000), elle est immunodéprimée et meurt rapidement. Cette étude a montré l'existence d'une réponse antivirale chez les insectes où la réaction d'encapsulation par les hémocytes participe à l'élimination des pathogènes viraux.

Plusieurs effets peuvent être induits sur les hémocytes par l'injection de polydnavirus. Chez la larve du lépidoptère *Pieris rapae* parasitée par l'hyménoptère braconidae *Cotesia rubecula*, le polydnavirus induit une altération des propriétés de surface des hémocytes, notamment par désorganisation du cytosquelette d'actine des hémocytes et une inhibition des propriétés d'adhésion. A la suite du parasitisme ou d'une injection de virus purifié, les filaments d'actine des hémocytes ne polymérisent plus normalement (Asgari *et al* 1996, 1997). Des expériences d'injection de protéine de CrV1 purifiée dans la larve du lépidoptère *Pieris rapae*, montrent que cette protéine est responsable de la désorganisation du cytosquelette d'actine des hémocytes de l'hôte (Asgari *et al* 1996). Ces changements structuraux s'accompagnent de phénomènes tels que la perte d'adhésion à une surface étrangère, d'étalement des plasmotocytes et l'incapacité de procéder à l'encapsulation d'un microorganisme étranger. Par conséquent, les cellules hémocytaires perdent leur capacité de former la capsule (Asgari & Schmidt 2001, 2002).

Les hémocytes portent des molécules de reconnaissance à leur surface, tels que des glycoprotéines se liant spécifiquement à des lectines. Lors du parasitisme, la modification du cytosquelette d'actine est corrélée à la disparition de ces marqueurs de la surface des hémocytes. Ces protéines de type lectine sont impliquées dans les mécanismes de communication intercellulaire, et dans l'adhésion des hémocytes au cours de la réaction d'encapsulation (Theopold & Schmidt 1997). Le parasitisme entraîne une absence de ces marqueurs de la surface hémocytaire (Asgari *et al* 1997). La modification de ces marqueurs de surface cellulaire est corrélée à l'inhibition de la réponse immunitaire cellulaire des hôtes parasités.

Le parasitisme peut aussi induire un comportement aberrant des hémocytes vis-à-vis d'une cible pathogène et la formation d'agrégats d'hémocytes (Lovallo & Cox-Foster 1999) ou encore modifier considérablement le nombre d'hémocytes circulants (Strand & Pech 1995). Les hémocytes semblent être éliminés par lyse cellulaire puisqu'on peut observer une

modification de la surface des hémocytes (Lavine & Beckage 1996), ainsi que des débris de cellules dans l'hémolymphe de *Manduca sexta* parasité. D'autres études montrent que selon les modèles étudiés, l'apoptose est observée ou non : cette dernière n'a pas été détectée chez la larve de *P. rapae* parasitée par *C. rubecula* (Asgari *et al* 1996) alors que le parasitisme de *Microplitis demolitor* induit l'apoptose des granulocytes de *Pseudoplusia includens* (Strand & Pech 1995).

L'activité d'une enzyme (la FAD-glucose déshydrogénase) impliquée dans la sécrétion des composés cytotoxiques oxygénés (cf partie IB3a) par les hémocytes après la réaction d'encapsulation est elle aussi altérée lors d'injection de polydnavirus purifié de *C. congregata* ou lors du parasitisme (Lovallo & Cox-Foster 1999).

Les modifications du nombre, de la morphologie et des capacités des différentes populations hémocytaires des hôtes parasités ont pour conséquence principale l'inhibition de la réaction d'encapsulation déclenchée lors de l'intrusion de microorganismes pathogènes ou de parasites dans le milieu intérieur de l'hôte.

IIA2b - Réponse humorale

Le parasitisme induit une inhibition de la synthèse des peptides antimicrobiens (cf partie IB2), au cours du parasitisme par *Campoletis sonorensis*, par exemple, la synthèse de la cécropine est inhibée (Shelby *et al* 1998). De façon intéressante, des gènes codants pour des protéines ankyrines sont rencontrés dans plusieurs génomes d'hyménoptères parasitoïdes braconidae (cf partie IIC et Familles multigéniques, Ankyrines). Ces protéines présentent de fortes similarités avec les protéines cactus de la voie Toll (voie responsable de la synthèse des peptides antimicrobiens (cf partie IA3)), et sont soupçonnées d'inhiber l'activation de la synthèse des peptides impliqués dans l'immunité de l'hôte. Il semble paradoxal que le polydnavirus bloque la voie Toll, puisque cette voie est un rempart permettant à l'hôte de se protéger contre des attaques bactériennes ou fongiques, et par conséquent de protéger les larves de parasitoïdes vivant à ses dépens, mais peut-être est-ce le « prix à payer » par le parasitoïde afin d'inhiber la réponse immunitaire cellulaire pour pouvoir se développer dans l'hôte. Il est en effet possible que ces protéines interagissent avec d'autres voies Toll impliquées dans l'immunité antivirale qui n'ont pas encore été découvertes à ce jour. En effet chez les mammifères la voie homologue (TNF) est impliquée à la fois dans l'immunité humorale et cellulaire.

Le parasitisme d'une chenille lépidoptère par un hyménoptère parasitoïde pourvu d'un polydnavirus peut aussi entraîner l'inhibition de l'activation de la cascade prophénoloxydase (cf partie IB3), intervenant dans la cytotoxicité. La réaction de mélanisation en aval de la cascade phénoloxydase, est altérée durant le parasitisme de *M. sexta* par *C. congregata* (Lavine & Beckage 1996). L'activation de la cascade phénoloxydase fait intervenir une série de sérines protéases (Sugumaran 2002). Une protéine inhibitrice de sérine protéase (ou serpine) a été isolée du fluide du calice de *C. rubecula* (Asgari *et al* 2003, Zhang *et al* 2004). L'action de cette serpine entraîne l'inhibition de la réaction de mélanisation (Asgari *et al* 2003) et elle régule négativement la cascade prophénoloxydase chez *Pieris rapae*. Toutefois, chez certains hôtes de *Campoletis sonorensis*, l'inhibition de la réaction de mélanisation n'est que temporaire (Cui *et al* 2000).

Encore une fois, toutes ces données suggèrent que les moyens utilisés par le parasitoïde et le virus qui lui est associé sont multiples et peuvent interférer avec des cascades de régulations à différents niveaux afin d'inhiber un même mécanisme.

IIB – Les outils utilisés par le parasitoïde afin de mener à bien le parasitisme

Lors de la ponte, outre ses œufs, le parasitoïde introduit d'autres éléments dans l'hôte, tels que les venins, des protéines ovariennes et les polydnavirus. De nombreuses études ont montré que les acteurs responsables des altérations de la physiologie des hôtes parasités par des hyménoptères parasitoïdes contenant des polydnavirus sont multiples. Les sources de facteurs de virulence sont variées, il peut en effet s'agir de la larve de parasitoïde elle-même, de cellules embryonnaires, les tératocytes, de protéines ovariennes de l'hyménoptère parasitoïde, de protéines de venin ou encore de protéines codées par les séquences polydnavirales contenues dans les nucléocapsides et ces facteurs peuvent agir en synergie.

IIB1 – Les larves de parasitoïdes

Les effets du parasitisme affectent souvent des concentrations hormonales de l'hôte. Notamment, un taux anormalement élevé d'hormone juvénile (JH) est responsable du maintien au stade prépupal de la chenille de *M. sexta* parasitée par l'hyménoptère *C. congregata*. Une étude a montré que le type d'hormone juvénile présent dans l'hémolymphe de la chenille parasitée correspond au type d'hormone juvénile produit et sécrété par les

parasitoïde (JHIII) et non au type d'hormone juvénile que la chenille est capable de produire (JHI) (cf partie IIA1). Ces résultats apportent la preuve que le parasitoïde lui-même interagit avec la physiologie de son hôte (Cole *et al* 2002).

Dans le système impliquant l'hyménoptère parasitoïde *Chelonus inanitus* et l'hôte lépidoptère *Spodoptera littoralis*, une activation précoce de la métamorphose est induite par le parasitisme. Cette induction est due à une forte diminution du taux de JH dans l'hémolymphe de l'hôte juste avant la mue du 5^{ème} stade larvaire. Une augmentation de l'activité de JH estérases a longtemps été suspectée comme étant la cause de cette diminution, or l'activité des JH estérases augmente seulement après la mue. Cette étude a montré que les larves du parasitoïde inactivent elles-mêmes les corps allates de l'hôte, pour inhiber la synthèse et la sécrétion d'hormone juvénile et donc entraîner la métamorphose précoce de leur hôte. La diminution du taux de JH n'est donc pas due à une augmentation de la dégradation de JH, mais à une inhibition de sa synthèse de JH par les corps allates (Pfister-Wilhelm & Lanzrein 1996).

IIB2 – Les tératocytes

Les tératocytes sont des cellules de grande taille originaires de la membrane séreuse de l'embryon du parasitoïde dans l'oeuf (Beckage & Buron 1994). Aussitôt après l'éclosion de la larve de parasitoïde, les cellules de la membrane séreuse se dissocient, se dispersent dans l'hémolymphe de l'hôte. Ces cellules sont présentes dans l'hémolymphe de l'hôte parasité où elles vont croître et devenir polyploïdes (Buron & Beckage 1997, Strand & Wong 1991). Les tératocytes présents dans l'hémolymphe de *Manduca sexta* parasité par *Cotesia congregata* atteignent un diamètre de 150 à 200 µm (Buron & Beckage 1997). La surface des tératocytes est recouverte de microvillosités, structures augmentant la capacité d'absorption de nutriments, de protéines sécrétées ou tout autre matériel circulant dans l'hémolymphe (Nakamatsu *et al* 2002).

La culture *in vitro* de tératocytes de l'hôte *Pseudaletia separata* parasité depuis 9-10 jours par *Cotesia kariyai* a révélé une forte synthèse ou sécrétion protéique dans le milieu de culture. Les tératocytes se fixent sur l'enveloppe du corps gras de l'hôte, sécrètent une enzyme responsable de la dégradation locale de l'enveloppe, permettant ainsi aux larves de parasitoïdes en second stade larvaire l'accès et l'ingestion du contenu du corps gras (Nakamatsu *et al* 2002). Ces données indiquent que même au cours des stades les plus tardifs

du développement, les tératocytes peuvent influencer l'hôte et être nécessaires à l'achèvement du développement du parasitoïde (Hotta *et al* 2001). Bien que la fonction des tératocytes au cours du parasitisme ne soit pas parfaitement connue, il y a de fortes présomptions pour que les tératocytes jouent un rôle important dans la manipulation de la physiologie de l'hôte afin de créer un environnement favorable au développement des larves de parasitoïdes.

Les tératocytes jouent un rôle dans le nourrissage des larves de parasitoïde dans l'hôte notamment en leur facilitant l'accès aux ressources. En effet, on observe, dans certains systèmes hôte/parasitoïde une diminution du nombre de ces cellules à la fin du développement larvaire du parasitoïde, accompagnée de la détection de la présence de cellules, de fragments de cellules de tératocytes ainsi que de protéines originaires des tératocytes dans le tube digestif de certaines larves de parasitoïde. Ce qui atteste que les tératocytes constituent une source de nutriments pour les larves de parasitoïdes. En effet, les tératocytes d'un hyménoptère braconidae sécrètent des polypeptides présentant des similarités avec une protéine nutritive, la vitellogénine (Kadono-Okuda & Okuda 1998). Ces polypeptides sont appelés peptides sécrétés par les tératocytes (TSP).

Certains d'entre eux présentent une activité biochimique d'hormone juvénile estérase (Zhang *et al* 1998, Dahlman *et al* 2003), ce qui laisse supposer que les tératocytes ne sont pas impliqués uniquement dans le nourrissage des larves de parasitoïde (Kadono-Okuda & Okuda 1998), mais aussi dans le contrôle du développement de l'hôte. En effet, l'injection de tératocytes seuls dans un hôte non parasité entraîne une altération du développement ainsi qu'une métamorphose incomplète par modification du taux d'hormone juvénile et d'ecdystéroïde. La présence de tératocytes de *Cotesia congregata* dans l'hôte *Manduca sexta* inhibent la mue, entraînent un retard de la métamorphose et la formation d'une puppe anormale (Buron & Beckage 1997). Ceci a été montré par l'injection de tératocytes de parasitoïde seuls, indépendamment de la présence d'autres facteurs de virulence tels que le polydnavirus (Dahlman *et al* 2003). A ce jour, seul un gène de TSP a été séquencé, TSP14, dont la protéine est sécrétée par les tératocytes de l'hyménoptère braconidae *Microplitis croceipes*. Le produit de ce gène inhibe spécifiquement la traduction de certaines protéines de l'hôte comme les protéines de stockage ce qui pourrait servir à mobiliser les ressources de l'hôte en faveur du parasite. La protéine TSP14 présente une similarité significative avec les produits des gènes riches en cystéines de l'ichnovirus de *Campoplex sonorensis* qui pourraient avoir la même fonction (Dahlman *et al* 2003).

D'autre part, les tératocytes interagissent avec la réponse immunitaire de l'hôte parasité (Kitano *et al* 1990). Des expériences effectuées chez *Pieris rapae crucivora* et

Pseudoplusia separata parasités respectivement par *Cotesia glomerata* et *C. kariyai* ont montré une inhibition du processus d'encapsulation des oeufs de parasitoïdes à différents temps après le parasitisme, due aux tératocytes du parasitoïde. L'inhibition de l'encapsulation proviendrait d'une suppression de l'activité phénoloxydase de l'hémolymphe de l'hôte (Kitano *et al* 1990).

IIB3 – Le fluide du calice : effets du venin, des protéines ovariennes et du polydnavirus

Lors de la ponte, les oeufs du parasitoïde sont injectés dans l'hôte, mais pas seuls ; en effet, avec eux, sont injectés notamment des particules de venin et des protéines ovariennes. Il a été montré que ce venin (ou les protéines), la plupart du temps en synergie avec le polydnavirus, notamment les protéines codées par les gènes viraux, est responsable d'un certain nombre de modifications de la physiologie de l'hôte. La plupart des études réalisées analysent globalement l'effet sur l'hôte du fluide ovarien injecté lors de la ponte et ne permettent pas de séparer les effets des différents facteurs contenus dans ce liquide.

Le parasitisme des chenilles du lépidoptère *M. sexta* et de *Pseudaletia separata* respectivement par les hyménoptères *Cotesia congregata* (Reed & Beckage 1997) et *C. kariyai* (Tagashira & Tanaka 1998) induit une atrophie des testicules ou castration de l'hôte. Des injections simultanées de polydnavirus purifié accompagné de venin induisent aussi une dégénérescence testiculaire, de la même façon qu'un analogue de l'hormone juvénile (JH), le méthoprène (Beckage *et al* 2002).

Le parasitisme entraîne aussi des modifications de la croissance et du développement de l'hôte probablement dues à des altérations endocrines de l'hôte. Lorsqu'une larve de lépidoptère non parasitée atteint un certain poids à un certain stade, les mécanismes responsables de la mue et de la métamorphose sont déclenchés (Alleyne & Beckage 1997). Cependant, il n'est pas certain que le venin soit indispensable pour provoquer ces modifications, alors que dans le système *Pseudaletia separata* / *Cotesia kariyai* ou *Pseudoplusia includens*-*Heliothis virescens* / *Microplitis demolitor*, le venin joue un rôle de cofacteur indispensable au polydnavirus pour inhiber la métamorphose de l'hôte (Strand & Dover 1991, Tanaka 1987).

Lors du parasitisme de *Pseudaletia separata*, *Cotesia kariyai* injecte des produits polydnaviraux ainsi que des protéines du venin qui sont responsables de la modification de la croissance par influence sur l'efficacité métabolique. L'injection de polydnavirus purifié et de venin entraîne une augmentation du taux de tréhalose et de protéines dans l'hémolymphe, assurant une quantité de nutriments supérieure, disponible pour les larves de parasitoïde (Nakamatsu *et al* 2001).

Enfin, l'immunosuppression de l'hôte nécessite l'expression des gènes polydnaviraux, mais aussi la présence de protéines ovariennes ou de venin (Tanaka 1987, Luckart & Webb 1996).

Parfois, ce n'est pas la réaction immunitaire, elle-même, qui est altérée, mais la perception des oeufs de parasitoïde par le système immunitaire. Le système de détection de l'hôte ne reconnaît plus ces intrus en tant que non-soi. Lors du parasitisme de l'hôte *Pieris rapae* par l'hyménoptère braconidae *Cotesia rubecula*, cette protection locale des oeufs et des larves en développement est conférée par une protéine, Crp32, qui est sécrétée par les cellules du calice des ovaires de l'hyménoptère parasitoïde. Cette protéine se lie et recouvre la surface des oeufs ainsi que des particules virales inhibant la réaction d'encapsulation de l'hôte (Asgari *et al* 1998).

Très récemment, il a été montré qu'un peptide du venin de *Cotesia rubecula* de 14 acides aminés (1595 Da) Vn1.5 est essentiel pour que les gènes viraux du bracovirus de ce parasitoïde soient exprimés dans les hémocytes de *Pieris rapae* (Zhang *et al* 2004). Ce résultat montre comment le venin peut agir en tant que cofacteur du polydnavirus.

Toutefois, dans notre modèle le venin n'est pas indispensable à la réussite parasitaire puisque l'injection de particules virales purifiées dans l'hôte *M. sexta* dans l'hôte a un effet sur l'immunité et le développement. Le fluide du calice et le venin injectés seuls n'ont aucun effet sur la physiologie de la chenille de *M. sexta* (Le *et al* 2003).

Les analyses partielles ou complètes de plusieurs génomes de polydnavirus d'hyménoptères parasitoïdes ont révélé un certain nombre d'informations quant au contenu génomique de ces séquences. Les gènes viraux sont souvent regroupés en familles de gènes. Certaines de ces familles sont conservées au sein des génomes de bracovirus ou d'ichnovirus. De manière surprenante, certains gènes sont même communs aux ichnovirus et aux bracovirus (gènes codant pour des ankyrines ou des protéines riches en cystéines), ce qui n'est pas

attendu compte-tenu de l'origine évolutive indépendante des associations dans les deux familles de parasitoïdes.

Cependant, actuellement, il y a encore peu de connaissances acquises concernant le rôle individuel de chacun de ces gènes au cours du parasitisme.

IIC – Bilan de la connaissance des gènes polydnaviraux

IIC1 - Différentes familles de gènes viraux identifiées avant le début de mon travail de thèse

Lorsque j'ai commencé mon travail de thèse en 2000, la démonstration avait été faite que l'expression des gènes viraux est indispensable à la réussite parasitaire de l'hyménoptère parasitoïde. Mais, la communauté scientifique des polydnavirus disposait d'une quantité de données assez restreinte en ce qui concerne les gènes viraux exprimés au cours du parasitisme, qui permettaient aux parasitoïdes de modifier la physiologie de leur hôte. Seule l'existence de 4 gènes à motif riche en cystéines (Dib-Hajj *et al* 1993) et 3 gènes à répétition (Theilmann & Summers 1988) avait été démontrée chez *Campoletis sonorensis*. Et les rares gènes bracoviraux connus étaient 3 gènes riches en glycine et en proline chez *Hyposoter didymator* (Volkoff *et al* 1999), 3 gènes codant pour des protéines à motif egf (de type facteur de croissance épidermique) du bracovirus de *Microplitis demolitor* (Strand *et al* 1997, Trudeau *et al* 2000). En ce qui concerne le modèle que j'ai étudié au cours de ma thèse, les connaissances étaient minces, les études d'alors avaient montré que le contenu protéique de l'hémolymphe de la chenille de *Manduca sexta* parasitée, est constitué à plus de 5% par une protéine (EP1 pour Early-Expressed Protein) du bracovirus de *Cotesia congregata* (Harwood *et al* 1994). L'expression de cette protéine de 190 kDa et de 2 protéines associées au parasitisme (EP2 et EP3) ont été étudiées dans différents hôtes de *Cotesia congregata*, et l'expression de ces protéines est corrélée avec le spectre d'hôte de *Cotesia congregata* mais le rôle exact de ces protéines au cours du parasitisme n'a pas été mis en évidence (Harwood *et al* 1998). Le gène codant la protéine EP1 a été isolé par une approche de PCR avec une amorce 5' dessinée d'après l'obtention de la séquence N terminale de la protéine. EP1 ne présente aucune similarité significative avec les protéines recensées dans les banques de protéines.

Depuis, de nombreux autres gènes viraux ont été identifiés grâce à l'analyse de plusieurs génomes polydnaviraux d'hyménoptères parasitoïdes. La structure des protéines

codées par ces gènes donne parfois des indications concernant leur rôle potentiel dans la modification de la physiologie de l'hôte. Cependant, dans la majorité des cas, le rôle précis de ces gènes au cours du parasitisme n'a pas été démontré.

IIC2 - Familles de gènes polydnviraux et gènes isolés

IIC2a - Famille des gènes à motif riche en cystéines

Cette famille de gènes à motif riche en cystéines est la première famille découverte au sein du génome polydnviral, elle est présente au sein de génome d'ichnovirus mais aussi de bracovirus, tels que l'ichnovirus de *Campoletis sonorensis* et de *Cotesia congregata* (CcBV). Cette famille multigénique se définit par la présence dans la séquence protéique d'un motif appelé conotoxin-knot.

Chez *Campoletis sonorensis*, le premier parasitoïde dans lequel ces gènes ont été rencontrés (Blissard *et al* 1887), les peptides codés par cette famille de gènes se caractérisent par la présence d'un motif caractéristique composé de cystéines régulièrement espacées et séparées par des enchaînements d'acides aminés hypervariables (Dib-Hajj *et al* 1993, Cui & Webb 1996). Ces protéines sont nommées crp. Au total, 10 gènes codant pour des crp ont été identifiés dans le génome de *Campoletis sonorensis* (4 gènes de cette famille sont nommés *WHv1.0*, *WHv1.6*, *VHv1.1* et *VHv1.4*), ils sont situés sur 7 segments différents (A, A', F, L U, V et W) (Turnbull & Webb 2002, Kroemer & Webb 2004). L'analyse de l'expression de ces gènes a été réalisée. Les gènes *WHv1.0* et *WHv1.6* sont fortement exprimés dans la larve parasitée de l'hôte *Heliothis virescens* à partir de 48 h pp et les protéines sont sécrétées (Blissard *et al* 1987, 1989). Quant aux protéines codées par les gènes *VHv1.1* et *VHv1.4*, elles sont exprimées dans le corps gras et dans les hémocytes de la larve parasitée de l'hôte *Heliothis virescens* à partir de 5 h pp et leur niveau d'expression reste constant tout au long du parasitisme puisqu'elles sont détectables 10 jours pp. On pense qu'elles pénètrent à l'intérieur des hémocytes par un processus d'endocytose. Cependant, la détection de ces protéines dans le corps gras est à nuancer car elle pourrait être due à la capacité d'adhésion des hémocytes au corps gras, auquel cas, la présence d'hémocytes dans le corps gras biaiserait ces conclusions (Cui *et al* 1997, Li & Webb 1994, Soldevila *et al* 1997). Des expériences d'injection de l'hôte *Heliohis virescens* par du baculovirus recombinant exprimant la protéine codée par le gène *VHv1.1* ont été effectuées, et il s'avère que la protéine VHv1.1 inhibe partiellement la réaction

d'encapsulation de la larve d'*Heliothis virescens* (Li & Webb 1994), il semble donc que cette protéine pourrait jouer un rôle dans l'altération de la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte lors du parasitisme.

Le bracovirus de *Cotesia congregata* contient lui aussi 4 gènes dont les protéines contiennent des motifs riches en cystéine, ils sont nommés *CcBVcrp1*, *CcBVcrp2*, *CcBVcrp3* et *CcBVcrp4* (Espagne *et al* 2004, cf partie II). Une protéine similaire, TSP 14 (pour Teratocyte Secreted Protein) est sécrétée par les tératocytes de *Microplitis demolitor*, (injectés dans l'hôte lors de la ponte), elle est fortement exprimée dans l'hôte *Heliothis virescens* parasité par *Microplitis demolitor*, et pourrait être responsable de l'inhibition de la croissance et du développement de l'hôte (Dahlman *et al* 2003). Des expériences *ex vivo* d'incorporation de méthionine S35 par les testicules de l'hôte lépidoptère (Dahlman *et al* 2003) ont récemment montré que les protéines codées par les gènes de type *crp* entraînent une diminution de la traduction. La structure commune de ces gènes suggère que toutes les protéines codées par des gènes de *crp*, quelle que soit leur origine, y compris celles de l'ichnovirus de *Campoletis sonorensis*, pourraient être impliquées dans la modification des mêmes processus biologiques.

IIC2b - Famille des gènes Rep

La famille des gènes à répétition de séquences (gènes Rep) a été mise en évidence uniquement chez les ichnovirus à ce jour. Cette famille est la plus représentée des familles de gènes identifiées avec 28 cadres ouverts de lecture (Kroemer & Webb 2004, Turnbull & Webb 2004) dans l'ichnovirus de *Campoletis sonorensis*. Les premiers gènes de cette famille ont été décrits par Theilmann et Summers (1987). Cette famille de gènes est caractérisée par une séquence répétée d'environ 540 pb. Certains gènes sont constitués d'une seule répétition de cette région. Tous ces gènes sont exprimés dans l'hôte parasité et dans le parasitoïde (Theilmann & Summers 1988, Hilgarth & Webb 2002, Turnbull & Webb 2004) à l'exception du gène *BHv0,9* dont l'expression n'a été détectée que dans l'hôte parasité et non dans l'oviducte des parasitoïdes *Campoletis sonorensis* (Theilmann & Summers 1988). L'expression des 3 gènes, I0,9, I1,1 et I1,2 du segment I, a été mise en évidence chez *Heliothis virescens* parasité ainsi que chez *Campoletis sonorensis*, ces 3 gènes de la famille des gènes Rep sont portés par le segment I et, comme le gène *BHv0,9*, ils sont dépourvus d'intron et de peptide signal.

Cette famille de gènes est une famille conservée parmi les ichnovirus, des gènes homologues ont été identifiés chez les ichnovirus d'*Hyposoter didymator* (HdIV) et de *Tranosema rostrale* (TrIV) (Volkoff *et al* 2002). Les 3 ORF identifiées chez l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator* sont nommées HdErep1, HdErep2 et HdErep3 et les 2 ORF identifiées chez l'ichnovirus de *Tranosema rostrale*, TrFrep1 et TrFrep2. L'expression des gènes HdErep1 et HdErep3 est détectée dans l'hôte parasité et est maintenue jusqu'à la fin du développement des larves de parasitoïde. Par contre aucune expression n'est détectée dans les parasitoïdes (Volkoff *et al* 2002). L'expression de ces gènes a été testée plus spécifiquement dans différents tissus de la larve parasitée tels que les hémocytes, le système nerveux, l'épiderme, le tube digestif et le corps gras. Les gènes HdErep1 et HdErep3 sont faiblement exprimés dans les hémocytes, et le gène HdErep1 est plus fortement exprimé que HdErep3 dans le système nerveux et dans l'épiderme (Volkoff *et al* 2002). Quant à l'expression des gènes Rep de *Tranosema rostrale*, des résultats ont été obtenus uniquement en ce qui concerne TrFrep1 qui présente un pic d'expression dans la larve de *Chistoneura fumiferana* 24h p.p. par *Tranosema rostrale*. Ce gène n'est pas exprimé dans le tube digestif de la larve parasitée, par contre, il l'est fortement dans le corps gras ainsi que dans le mélange épithélium cuticulaire/muscles et faiblement dans les hémocytes (Volkoff *et al* 2002).

La fonction des protéines codées par les gènes Rep est inconnue et ces protéines ne présentent aucune similarité avec des protéines déjà recensées dans les banques. L'analyse de leur séquence montre qu'elles ne possèdent pas de peptide signal, donc qu'elles ne seront probablement pas sécrétées à partir des cellules infectées (Theilmann & Summers 1887).

IIC2c - Famille des gènes innexine

Une famille de gènes présentant de fortes similarités de séquences avec des innexines ($10^{-30} < E \text{ value} < 10^{-80}$) a été identifiée chez 2 ichnovirus. Les gènes de cette famille sont nommés vinnexin, pour innexine virale. Un gène vinnexin a été identifié dans le virus d'*Hyposoter didymator*, HdVnx-1 (Turnbull & Webb 2002) et 4 dans celui de *Campoletis sonorensis*, CsVnx-D1, CsVnx-Q1, CsVnx-Q2 et CsVnx-G1 (Turnbull & Webb 2002 Adv Virus Res, Kroemer & Webb 2004). Les gènes *CsVnx-D1*, *CsVnx-Q2*, *CsVnx-G1* et *HdVnx-1* sont exprimés respectivement, dans l'hôte *H. virescens* parasité pour les 3 premiers et dans les

lignées de cellulaires infectées pour le dernier, et *CsVnx-D1* est aussi exprimé dans les tissus du parasitoïde *Camponotus sonorensis* (Kroemer & Webb 2004).

Chez les invertébrés, les gènes innexine codent pour des protéines impliquées dans la structure des jonctions gap et la communication intercellulaire. Des jonctions gap sont établies entre les hémocytes au cours du processus d'encapsulation ; c'est pourquoi les gènes vinnexin sont susceptibles de jouer un rôle dans l'inhibition des échanges intercellulaires au cours des mécanismes d'encapsulation chez l'hôte parasité (Turnbull & Webb 2002, Kroemer & Webb 2004).

IIC2d - Famille des gènes ankyrine

Une autre famille multigénique est présente dans la plupart des génomes de polydnavirus, il s'agit de la famille des gènes contenant un motif à répétitions ankyrines. En effet, 7 gènes appartenant à cette famille ont été mis en évidence chez l'ichnovirus de *Camponotus sonorensis* (CsIV), 2 chez l'ichnovirus d'*Hyposoter fugitivus* (HfIV) ainsi que 10 chez le bracovirus de *Microplitis demolitor* (MdBV) (Kroemer & Webb 2004), plusieurs gènes de cette famille sont présents dans le génome de *Toxoneuron nigriceps* (Malva *et al* 2004) et 6 dans notre modèle, le bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV). La caractérisation de ces 6 gènes, dénommés CcBVank1 à CcBVank6 fait l'objet d'un chapitre de cette thèse (cf partie Famille multigéniques, Ankyrines).

Des gènes appartenant à cette famille sont aussi probablement présents au sein du génome de l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator* puisque des analyses en southern blot ont montré une forte hybridation entre des sondes de gènes à ankyrine de l'ichnovirus de *Camponotus sonorensis* avec l'ADN de l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator* HdIV (Kroemer & Webb 2004).

Les gènes ankyrine des polydnavirus présentent des similarités avec un gène codant pour une protéine Cactus de la Drosophile (homologue de IκB des mammifères), cette protéine est un inhibiteur de facteurs de transcription Rel (homologue de NF-κB des mammifères) impliqués dans la voie Toll (voie responsable de l'établissement de l'axe dorso-ventral dans le développement embryonnaire de la drosophile et de la régulation de la synthèse de peptides antimicrobiens au cours de la réponse immunitaire de la drosophile (cf partie IA3)).

L'analyse de la séquence des gènes ankyrine de l'ichnovirus de *Campoletis sonorensis* a montré que ces gènes sont dépourvus d'éléments régulateurs tels que les signaux responsables de la dégradation de complexes protéiques Cactus/Rel (Kroemer & Webb 2004). Ces éléments laissent penser que les peptides codés par ces gènes pourraient être impliqués dans une inhibition constitutive de la voie Toll par liaison permanente à la protéine Dif. Nous avons fait l'hypothèse que les protéines ankyrines virales sont des agents de séquestration permanente de facteurs de transcription de gènes impliqués dans l'immunité des hôtes parasités dont la synthèse serait activée par la voie Toll (cf Familles multigéniques, Ankyrines). Le virus de la fièvre porcine africaine (African swine fever virus) et le poxvirus, *Myxoma virus* possèdent un gène codant pour une molécule de type ankyrine (IKB la protéine cactus de mammifère) qui supprime la réponse inflammatoire en inhibant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B des hôtes infectés (Revilla *et al* 1998, Camus-Bouclainville *et al* 2004). Dans les deux cas, la structure de la protéine virale est la même que pour les ankyrines de polydnavirus, elles ne possèdent que les motifs à répétitions ankyrines, pas les signaux nécessaires pour sa dégradation par le protéasome.

Il est d'autre part intéressant de noter que le fait de retrouver des gènes ankyrine au sein des génomes d'ichnovirus et de bracovirus est inattendu car les deux genres polydnaviraux ont une origine évolutive différente. Ceci révèle sans doute un phénomène d'évolution convergente et suggère que la possession de ces gènes est très importante pour le succès du parasitisme.

IIC2e - Gènes de la famille de lectines de type C

Actuellement, ces gènes ont été décrits uniquement chez des bracovirus du genre *Cotesia*. En effet, 2 gènes homologues ont été mis en évidence chez 2 espèces différentes du genre *Cotesia*, il s'agit des gènes nommés *Cky811* du bracovirus de *Cotesia kariyai*, et *Crf111* du bracovirus de *Cotesia ruficrus*. Les 2 transcrits de ces gènes partagent 72,8% de similarité et portent un domaine caractéristique de lectine² de type C. Ces 2 gènes sont fortement exprimés dans les hémocytes de l'hôte dès 6 h après le parasitisme, l'expression de *Cky811* semble décliner rapidement ensuite. Ce dernier gène est aussi exprimé dans le corps gras de l'hôte 12 h p.p. (Teramoto & Tanaka 2003). En ce qui concerne la fonction de ces protéines, on suppose que leur rôle est identique, mais la seule hypothèse avancée à l'heure actuelle est une participation à la régulation des réactions immunitaires de l'hôte.

Cette famille de gène a aussi été identifiée au sein du génome du bracovirus *Cotesia congregata* (Espagne *et al* 2004) et de *Cotesia rubecula*. En effet, Glatz *et al* (2003) ont caractérisé un gène bracoviral nommé CrV3, dont la protéine partage respectivement, 67 et 61% de similarité avec les protéines codées par les gènes *Crf111* du bracovirus de *Cotesia ruficrus* et *Cky811* du bracovirus de *Cotesia kariyai*. Tous ces gènes homologues pourraient avoir la même fonction encore inconnue.

Le gène CrV3 code pour une protéine partageant des similarités de séquences et structurales avec les lectines de l'hôte. Cette protéine pourrait donc entrer en compétition avec les lectines de l'hôte au niveau des sites de fixation, inhibant ainsi la reconnaissance du parasitoïde et l'induction de la réponse immunitaire (Glatz *et al* 2003).

Les lectines de type C sont des récepteurs préformés (PRR) humoraux (cf partie IA2) qui reconnaissent les sucres portés par des microorganismes pathogènes (bactériens ou fongiques) et qui se lient spécifiquement aux pathogènes. Ce processus d'opsonisation favorise la phagocytose des microorganismes pathogènes. La synthèse de lectines de type C par les bracovirus de 3 genres différents de *Cotesia* pourrait indiquer que ces protéines jouent un rôle important ayant conduit à la conservation de ces gènes au sein des différentes espèces. Si l'on admet que la voie Toll est inhibée par les protéines codées par les gènes ankyrines des bracovirus, on peut proposer l'hypothèse que la production de lectines de type C par le bracovirus pourrait compenser la perte de la réponse immunitaire humorale, qui entraîne une forte vulnérabilité de l'hôte vis-à-vis des microorganismes pathogènes, en favorisant la phagocytose de ces microorganismes.

IIC2f - Gènes de la famille des Protéines Tyrosines Phosphatases (PTP)

Une autre famille multigénique est rencontrée dans les génomes de bracovirus (et semble-t-il d'ichnovirus puisque l'existence d'un gène de PTP dans le génome de l'ichnovirus de *Glypta fumiferanae* a aussi été reportée au meeting de l'American Society of Virology 2004), il s'agit de la famille des Protéines Tyrosines Phosphatases (ou PTP).

En effet, un gène appartenant à cette famille a été décrit pour la première fois par Chen *et al* en 2003. Ce gène du bracovirus de *Glyptapanteles indiensis* (homologue de la CcBV PTPQ), est exprimé précocément dans l'hôte *Lymantria dispar* parasité et son expression est maintenue jusqu'à 8 jours après le parasitisme. L'expression de ce gène est prépondérante dans les hémocytes de l'hôte, ce qui laisse supposer que la protéine pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la réaction d'encapsulation des oeufs du parasitoïde. De plus, l'expression de

ce gène a aussi lieu dans le système nerveux de l'hôte, ce qui suggère que cette protéine tyrosine phosphatase pourrait être impliquée dans le contrôle du développement de l'hôte puisque le système nerveux correspond à l'organe régulateur des synthèses hormonales. Cette hypothèse est appuyée par des études ayant montré que l'interruption du développement est déclenchée par une altération du fonctionnement du système endocrine de l'hôte. En effet, dans le modèle impliquant le parasitoïde *Toxoneuron nigriceps* et son bracovirus associé, et l'hôte *Heliothis virescens*, la diminution de la synthèse protéique, notamment d'ecdystéroïde (l'hormone responsable de la mue) est corrélée à une diminution de l'activité des protéines kinases de l'hôte ainsi qu'à une inhibition de la phosphorylation de protéines régulatrices de la voie de transduction du signal PTH (Pennacchio *et al* 1998a, 1998b). Ces données suggèrent que les PTP virales pourraient contrôler négativement les taux de phosphorylation des protéines à tyrosine.

Les gènes de PTP sont aussi présents dans le génome du bracovirus de *Microplitis demolitor* (Kroemer et Webb 2004). Récemment, cette famille multigénique a été identifiée chez 2 autres espèces de bracovirus, *Cotesia congregata* et *Toxoneuron nigriceps*. Cette étude fait l'objet d'une partie de la thèse (cf partie Familles multigéniques, PTP).

IIC2g - Autres familles de gènes ou gènes isolés

Chez l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator*, les ARN messagers viraux exprimés au cours du parasitisme ont fait l'objet d'une caractérisation systématique. Une famille de 3 gènes a ainsi été mise en évidence, M40, M27 et M24. Ces gènes du groupe M sont caractérisés par un intron conservé dans la partie 5' UTR et par des régions riches en proline et des régions riches en glycine (Volkoff *et al* 1999). Les 3 gènes du groupe M (M24, M27 et M40) sont exprimés dans l'hôte parasité dès 4 h p.p. et leur expression est maintenue jusqu'à la fin du parasitisme.

Toujours au sein du génome de l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator*, un gène appelé K19 a été identifié (Volkoff *et al* 2001). Ce gène contient 2 introns de 119 et 122 pb ainsi qu'une ORF de 321 pb. Deux autres gènes ichnoviraux, HdCorfS6 et HdGorfP30 ont été mis en évidence dans ce modèle. Les 2 gènes sont exprimés dans les hémocytes de l'hôte *Spodoptera sp* parasité, et le gène HdCorfS6 à un niveau particulièrement élevé (Galibert *et al* 2003). La séquence de cette protéine révèle qu'elle possède un domaine transmembranaire. La protéine codée par le gène HdGorfP30, semble quant à elle sécrétée, et elle possède des motifs de type mucine. Une protéine appartenant à cette famille est codée par un gène du

bracovirus de *Microplitis demolitor* (Trudeau *et al* 2000) et possède des propriétés d'association avec la membrane des hémocytes. Cette protéine est connue pour participer à des mécanismes d'immunosuppression, il est donc envisageable que la protéine virale codée par le gène HdGorfP30 intervienne dans l'immunosuppression de l'hôte parasité (Galibert *et al* 2003).

Chez l'ichnovirus de *Tranosema rostrale*, un gène, TrV1 avait été identifié (Béliveau *et al* 2000), 2 autres gènes, TrV2 et TrV4 appartenant au génome de ce même virus ont été mis en évidence (Béliveau *et al* 2003) et ils présentent de fortes similarités de séquence avec TrV1, ce qui les regroupe dans une nouvelle famille multigénique. Ces 3 gènes sont exprimés dans l'hôte parasité mais aucun ne l'est dans les ovaires du parasitoïde *Tranosema rostrale* (Béliveau *et al* 2003). Le rôle des protéines codées par ces gènes demeure inconnu.

Le génome du bracovirus de *Microplitis demolitor* contient lui aussi 3 gènes nommés *MdBV egf1.0*, *egf1.5* et *egf0.4* (egf pour epidermal growth factor) possédant des motifs riches en cystéine (Strand *et al* 1997, Trudeau *et al* 2000). Ces gènes contiennent un domaine qui présente un fort taux de similarité avec un facteur de croissance de l'épiderme. L'analyse de l'expression de ces gènes *MdBV egf* a montré une forte activité transcriptionnelle dans la larve de l'hôte *Pseudoplusia includens* entre 12 à 24 h pp, suivie d'une rapide diminution d'expression (Strand *et al* 1997). L'analyse de l'expression de ces gènes montre un pic suggérant que les protéines codées par ces gènes peuvent être impliquées dans de modifications physiologiques des hémocytes de l'hôte (Strand *et al* 1997.) Outre ces 3 gènes *egf* à régions riches en cystéine, un gène, *MdBVgcl1,8* codant pour une protéine de 515 acides aminés a été mise en évidence (Trudeau *et al* 2000). Cette protéine possède une région centrale fortement glycosylée formée de 6 répétitions en tandem, flanquée de domaines N et C terminaux hydrophobes. Ce gène est exprimé très fortement dans les hémocytes de *Pseudoplusia includens* 24 h après le parasitisme, le niveau d'expression diminue le 2^{ème} et 3^{ème} jour pour disparaître le 4^{ème} jour. Des expériences d'infection de lignées cellulaires High-Five issues de l'hôte *Trichoplusia ni*, par du virus purifié, ont montré une inhibition de la capacité d'étalement de ces cellules, semblable à celle constatée pour les hémocytes de *Pseudoplusia includens* parasité. (Beck & Strand 2003). L'incubation des cellules High-Five infectées avec de l'ARN double brin *gcl1.8* induisant la destruction des ARNm correspondants, supprime l'effet induit par le polydnavirus. Ces expériences démontrent que le produit du gène *gcl1.8* du bracovirus de *Microplitis demolitor* est nécessaire à l'altération des propriétés adhésives

des cellules et par conséquent très probablement impliqué dans l'inhibition de la formation de la capsule par les cellules immunitaires de l'hôte parasité par *Microplitis demolitor* (Beck & Strand 2003).

Outre le gène CrV1 (décrit dans la partie IIA2), 2 autres gènes du bracovirus de *Cotesia rubecula* ont été décrits chez le bracovirus de *Cotesia rubecula*. Le gène nommé CrV2 est formé de 963 pb, il code pour une glycoprotéine de 40 kDa qui est exprimée dans la larve de *Pieris rapae* parasitée. Cette protéine est transcrite dans les hémocytes et le corps gras de l'hôte parasité, elle est sécrétée dans l'hémolymphe puis internalisée par les hémocytes (Glatz *et al* 2004). Il est possible que cette protéine joue elle aussi un rôle dans l'immunosuppression de l'hôte parasité. Le gène CrV3 codant pour une protéine de type C (Glatz *et al* 2003) est décrit dans la partie IIC2e.

L'hyménoptère *Toxoneuron nigriceps* (anciennement appelé *Cardiochiles nigriceps*) contient aussi un bracovirus au sein de son génome. Actuellement, 2 gènes viraux ont été décrits comme ne faisant partie d'aucune des familles multigéniques décrites, il s'agit des gènes CnPDV1 et TnBV2. CnPDV1 code pour une protéine inconnue (Varricchio *et al* 1999) qui est exprimée dans les glandes prothoraciques de l'hôte *Heliothis virescens* 24 h p.p.. L'autre gène identifié TnBV2 code pour une protéine potentielle de 153 acides aminés. Cette protéine présente un domaine conservé d'aspartyl protéase de type rétroviral (Falabella *et al* 2003). Elle est exprimée dans le corps gras, les glandes prothoraciques et les hémocytes de l'hôte parasité. Le rôle de cette protéine reste encore à élucider.

Chelonus inanitus, contrairement à tous les hyménoptères parasitoïdes mentionnés jusqu'à maintenant, est un parasite ovo-larvaire des oeufs du lépidoptère *Spodoptera littoralis*. Le bracovirus de l'hyménoptère *Chelonus inanitus* fait partie des polydnavirus chez lesquels plusieurs gènes ont depuis longtemps été mis en évidence, il s'agit des 3 gènes portés respectivement par les segments CiV12, CiV14 et CiV16,8, qui sont exprimés dans l'hôte au cours du parasitisme (Johner *et al* 1999). D'autres gènes nommés CiV12g1, CiV12g2, CiV14g1, CiV14g2, CiV14.5g1 et CiV16.8g1 sont exprimés dans l'hôte parasité (Wyder *et al* 2002). L'analyse de 2 de ces gènes, CiV14g1 et CiV14g2, a été menée, leurs cDNA mesurent respectivement 2036 et 618 pb et codent pour des peptides de 548 et 77 acides aminés dépourvus de peptide signal et ne présentant aucune homologie avec des séquences protéiques recensées dans les banques. De façon très intéressante, l'expression de ces 2 gènes coïncide

avec l'arrêt du développement au stade prépupal. Ces informations suggèrent que ces 2 gènes pourraient être impliqués dans l'inhibition de la synthèse d'ecdystéroïdes indispensable pour le passage au stade pupal (Johner & Lanzrein 2002). De manière étonnante aucune des protéines de *Chelonus inanitus* prédites à l'heure actuelle ne présente de similarité avec des protéines d'autres polydnavirus, en particulier de bracovirus, en dépit de l'origine évolutive commune supposée de ces virus.

En ce qui concerne le génome du bracovirus de *Cotesia congregata*, des avancées considérables ont été effectuées au cours des 4 dernières années. Les gènes codant pour les protéines précoces, EP1 (cf partie IIC1) sont demeurés pendant longtemps les seules informations dont on disposait quant au contenu génique du bracovirus de *Cotesia congregata*.

L'existence d'un gène homologue au gène CrV1 du bracovirus de *Cotesia rubecula* a été démontrée dans le génome du bracovirus de *Cotesia congregata*. Des transcrits de ce gène sont détectés très précocement dans la larve de *Manduca sexta* parasitée, en effet, dès 3 h pp dans le corps gras et 4 h pp dans les hémocytes (Le *et al* 2003), les protéines codées par CrV1 pourraient inhiber les fonctions normales des hémocytes permettant ainsi aux oeufs de parasitoïde d'échapper à la reconnaissance par l'hôte. D'autre part et de façon surprenante, l'expression de ce gène est dépendante de facteurs différents du virus lui-même, en effet, elle ne semble optimale que lorsque le gène est accompagné de protéines ovariennes (Le *et al* 2003).

Aujourd'hui, pour la première fois, le séquençage complet du génome d'un polydnavirus est achevé, celui du bracovirus de *Cotesia congregata* (Espagne *et al* 2004), il a permis de mettre à jour l'existence de nombreuses familles multigéniques telles que les PTP, les ankyrines, et les protéines riches en cystéines mais aussi la famille multigénique des cystatines. En effet, cette famille n'est rencontrée dans aucun autre polydnavirus alors que le génome de CcBV contient 3 gènes de cette famille. Une partie de cette thèse est consacrée à cette famille de gènes (cf partie Familles multigéniques, Cystatines). La CcBV cyst1 est exprimée dans tous les tissus de l'hôte *Manduca sexta* parasité et dès 4 h p.p. dans les hémocytes, où elle présente un pic d'expression à 12 h p.p. (Espagne *et al* soumis). De plus, il a été montré que la CcBV cyst1 est fonctionnelle, elle possède l'activité d'inhibiteur de cystéine protéase. Ces données suggèrent que ces protéines pourraient, elles aussi, participer à l'immunosuppression de l'hôte au cours du parasitisme.

Outre ces familles de gènes présentant des similarités avec des domaines conservés, le génome du bracovirus de *Cotesia congregata* contient aussi 5 familles de gènes pour lesquelles la nature des protéines codées reste mystérieuse. Enfin, près de la moitié des ORF potentielles codent pour des protéines inconnues (pas de protéines similaires dans les banques) ou hypothétiques (protéines similaires à fonction inconnue) (Espagne *et al* 2004).

PRÉSENTATION DU MODÈLE D'ÉTUDE

Article 1

Polydnavirus genome: integrated vs. free virus

J.-M. Drezen, B. Provost, E. Espagne, L. Cattolico, C. Dupuy, M. Poirie',
G. Periquet, E. Huguet

Journal of Insect Physiology (2003) 49:407-417

LE MODÈLE BIOLOGIQUE ÉTUDIÉ

L'hyménoptère *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastrinae) est un endoparasitoïde koïnobionte de la chenille de lépidoptère *Manduca sexta* (Noctuidae, Sphingidae). La femelle de *Cotesia congregata* pond ses oeufs à l'intérieur de la larve du lépidoptère. Les oeufs du parasitoïde vont éclore, et les larves, se nourrir de l'hémolymphe de la chenille. Au terme de leur développement larvaire, les parasitoïdes vont percer l'épiderme cuticulaire de la chenille, sortir et tisser leur cocon à l'extérieur de la chenille hôte. La métamorphose du parasitoïde s'accomplit dans le cocon dont l'adulte émerge.

Ce cycle peut s'accomplir uniquement grâce à l'intervention d'un troisième partenaire. Il s'agit d'un polydnavirus qui est injecté au sein de la chenille hôte en même temps que les oeufs du parasitoïde, lors du parasitisme. Ce polydnavirus est un bracovirus dont le génome est présent à la fois sous forme de 30 cercles d'ADN double brin dans les particules virales produites par les cellules du calice, une région spécialisée des ovaires de *Cotesia congregata*, mais aussi sous forme intégrée, constituant le provirus, en un locus unique sur le chromosome V du génome de *Cotesia congregata* (Belle *et al* 2002).

Les cercles d'ADN double brin présents dans les ovaires du parasitoïde *Cotesia congregata* sont introduits dans l'hôte et les gènes codés par cet ADN viral vont participer à la réussite parasitaire. En effet, en synergie avec d'autres composés (venin, tératocytes... (cf partie IIB3)), les gènes viraux vont participer à l'arrêt du développement, de la croissance, ainsi qu'à l'immunosuppression de l'hôte, laissant ainsi la possibilité aux oeufs puis aux larves de parasitoïdes de se développer et de mener à bien leur croissance aux dépens de leur hôte.

L'article de synthèse suivant récapitule et décrit les connaissances actuelles à propos des virus de la famille des polydnaviridae formant des associations obligatoires avec des hyménoptères parasitoïdes. Ces polydnavirus (PDV) sont divisés en 2 genres, les bracovirus et les ichnovirus, associés respectivement avec les hyménoptères de la famille des braconidae et des ichneumonidae.

Cet article traite notamment de l'organisation, du contenu et de la répllication des bracovirus et des ichnovirus. Le rôle du polydnavirus au niveau des interactions entre hôte et

parasitoïde est décrit. Ensuite, des hypothèses évolutives sont proposées concernant l'origine de la symbiose entre les polydnavirus et les hyménoptères parasitoïdes et les mécanismes d'excision, de circularisation et d'amplification mis en oeuvre lors de la production de la forme circulaire du génome polydnaviral.

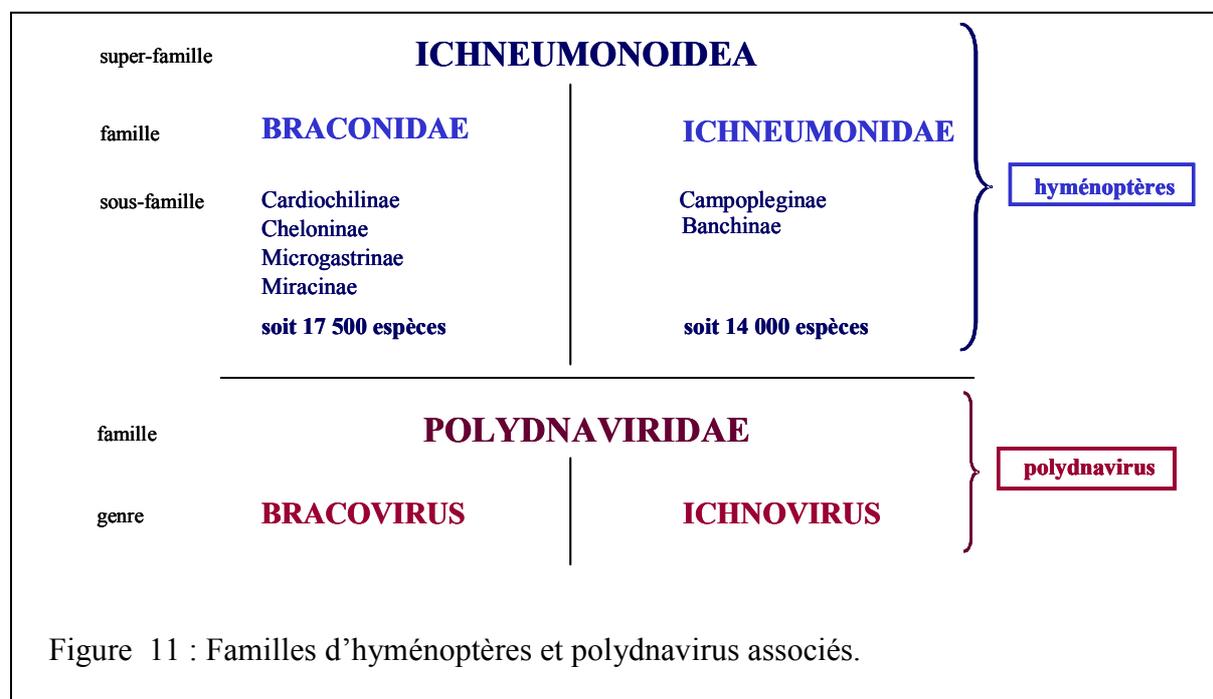
Les particules virales des polydnavirus sont produites par les cellules du calice ovarien de l'hyménoptère femelle, leur réplication se déroule au sein du noyau de ces cellules. Chez les ichnovirus, la libération des particules virales implique un processus continu de bourgeonnement des cellules du calice, alors que chez les bracovirus, la libération a lieu par lyse cellulaire. Les particules virales présentent des différences morphologiques entre les 2 genres viraux : les particules virales de bracovirus sont bordées d'une membrane unique et contiennent des nucléocapsides cylindriques, de diamètre de 35 nm constant et d'une longueur variant entre 30 et 150 nm, alors que les particules virales d'ichnovirus sont entourées d'une double membrane et contiennent des nucléocapsides de forme ellipsoïdale de taille uniforme de 85 par 330 nm.

Les génomes des bracovirus et des ichnovirus sont composés de cercles d'ADN double brin. Pour la première fois, dans cet article, les cercles d'ADN double brin composant le génome du bracovirus de *Cotesia congregata* sont présentés séparés par gel d'électrophorèse en champs inversés (FIGE). L'organisation du génome viral dans les nucléocapsides varie entre les 2 genres polydnaviraux. Dans les ovaires des hyménoptères braconidae, chacun de ces cercles est contenu dans une nucléocapside distincte. Le génome des ichnovirus est, quant à lui, contenu intégralement dans une nucléocapside et toutes les nucléocapsides sont donc identiques à la différence des nucléocapsides des bracovirus.

Les polydnavirus sont des parasites intracellulaires obligatoires, et leur cycle est partagé entre 2 hôtes successifs : le génome du polydnavirus est intégré au génome du parasitoïde hyménoptère. La réplication virale a lieu exclusivement dans les cellules des ovaires du parasitoïde, une série de protéines virales sont synthétisées, puis des virions sont injectés dans l'hôte lépidoptère lors du parasitisme. A l'intérieur de l'hôte, les protéines virales impliquées dans les interactions hôte-parasitoïde sont alors synthétisées.

La transmission des cercles d'ADN polydnaviraux au sein des guêpes se fait de façon chromosomique et suit les lois mendéliennes de l'hérédité.

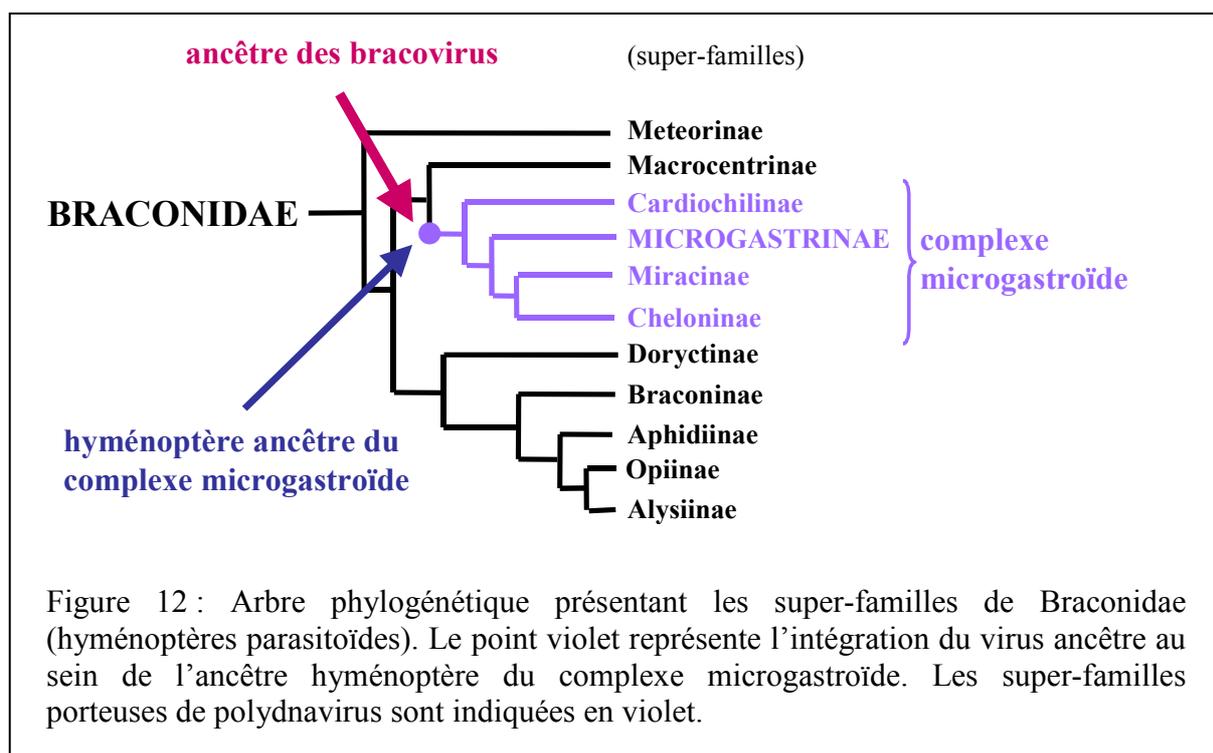
L'origine évolutive des polydnavirus est incertaine, ils ont été rencontrés dans certaines sous-familles de 2 familles d'hyménoptères, les Braconidae (sous-familles des Cheloninae, Cardiochilinae, Miracinae et Microgastrinae) et les Ichneumonidae (sous-familles des Campopleginae et Banchinae) (Fig. 11).



Leur répartition au sein des familles d'hyménoptères ne suit pas parfaitement les groupements phylogénétiques, les espèces hyménoptères porteuses de polydnavirus sont séparées par des lignées dépourvues de polydnavirus. Ceci suggère que l'association hyménoptère/virus a eu lieu au moins 2 fois indépendamment.

En ce qui concerne les hyménoptères porteurs d'ichnovirus, la phylogénie des taxons n'est pas assez bien étudiée pour déterminer si un événement unique a pu être à l'origine de l'association avec les ichnovirus. La seule assertion que l'on puisse émettre est que les ichnovirus et les bracovirus ont pour origine des événements évolutifs indépendants, la classification de ces 2 genres au sein d'une famille virale unique peut être discutée. Les résultats préliminaires fournis par le séquençage de l'intégralité du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* tendent à confirmer cette hypothèse de 2 origines des polydnavirus distinctes.

Les sous-familles Braconidae porteuses d'un bracovirus constituent une lignée monophylétique appelé complexe microgastroïde (Fig. 12), et le génome du polydnavirus est probablement organisé en macrolocus au sein du génome de l'hyménoptère (Belle *et al* 2002); ces données suggèrent par conséquent, que les espèces à bracovirus dérivent probablement d'un événement d'intégration unique du virus ancêtre des bracovirus par une espèce d'hyménoptère parasitoïde ancêtre.



Par contre, l'évolution des génomes des 2 genres polydnavirus semble être soumise à un phénomène de convergence évolutive due aux contraintes environnementales induites par la nécessité du parasitoïde de se développer dans le milieu intérieur d'un hôte lépidoptère.

Après l'intégration au sein du génome hyménoptère, le génome du polydnavirus a continué d'évoluer. Cependant, l'intégration des polydnavirus au génome hyménoptère ainsi que la non-réplication dans les tissus de l'hôte lépidoptère expose le polydnavirus à des contraintes différentes des contraintes habituelles auxquelles les virus classiques sont soumis. En effet, les gènes viraux contrôlant la physiologie de l'hôte lépidoptère sont soumis à une forte pression de sélection puisque la perpétuation du virus est strictement dépendante du succès parasitaire de l'hyménoptère parasitoïde. En théorie, seule la présence des séquences impliquées dans l'expression des gènes viraux dans l'hôte est requise dans les cercles d'ADN viraux. Pendant les millions d'années qui nous séparent de l'intégration du virus au génome

de l'hyménoptère, il est probable que certaines séquences virales ont disparu des cercles viraux mais sont toujours présentes dans le génome de l'hyménoptère. De même, certaines séquences d'origine hyménoptère ont pu être transférées aux cercles d'ADN viraux puis être conservées si leur action s'avérait utile pour le succès parasitaire de l'hyménoptère.

Le séquençage partiel des génomes polydnaviraux montre que les gènes viraux s'organisent en familles virales, une caractéristique inhabituelle pour les génomes viraux classiques, laissant supposer que des événements de duplication ont eu lieu. Les analyses d'expression des gènes potentiels révèlent que ces gènes sont exprimés dans l'hôte parasité, et peuvent ainsi coder pour des facteurs de virulence impliqués dans les interactions hôte-parasitoïde.

Par contre, il semble que très peu de gènes polydnaviraux présentent de similarité avec des séquences virales connues ; ce qui ne fournit pas de confirmation moléculaire sur la ressemblance morphologique observée entre les particules baculovirales et bracovirales, et encore moins d'indices à propos de la nature virale de l'ancêtre capturé par l'ancêtre hyménoptère du complexe microgastroïde.

Le génome polydnaviral tel qu'il est aujourd'hui est le résultat de 2 pressions évolutives divergentes : d'une part, une pression évolutive réductrice, les gènes nécessaires à la réplication virale étant transférés au génome hyménoptère, et une pression évolutive proliférative, due à la diversification et la prolifération de gènes impliqués dans l'altération de la physiologie de l'hôte parasité.

La perte des séquences polydnavirales codant pour des protéines de structure ou nécessaires à la réplication au profit du génome de l'hyménoptère peut s'expliquer par le mécanisme suivant. En effet, chez les bracovirus, les séquences qui vont aboutir aux cercles polydnaviraux sont flanquées de séquences répétées nécessaires à la formation des cercles. Une mutation sur une séquence répétée à l'extrémité d'un cercle viral peut entraîner une disparition de ces séquences dans les particules virales. Si les gènes viraux portés par ce cercle ne sont pas indispensables à la réussite parasitaire de l'hyménoptère, cette mutation sera maintenue, aboutissant à la perte de séquences virales par le génome inclus dans les particules virales.

Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer comment les séquences polydnavirales contenues dans les particules virales sont amplifiées, excisées et circularisées, à partir de la séquence intégrée au génome de l'hyménoptère. Le premier modèle proposé, le

plus simple se compose de 2 étapes : chaque séquence virale est excisée du chromosome de l'hyménoptère, puis circularisée. Les cercles d'ADN double brin produits sont ensuite amplifiés. La deuxième hypothèse consiste tout d'abord en une co-amplification chromosomique des séquences virales adjacentes dans le génome de l'hyménoptère, suivant le modèle d'amplification des gènes de chorion de la drosophile. Les fragments d'ADN double brin sont ensuite excisés, puis circularisés. Mais, ces 2 premiers modèles ont été exclus car ils ne rendent pas compte des résultats expérimentaux. Enfin, l'hypothèse qui semble être la plus probable, au moins dans le cas du bracovirus de *Cotesia congregata* consiste tout d'abord en l'excision d'une longue molécule du génome de l'hyménoptère, qui est ensuite amplifiée. Une seconde étape d'excision a lieu afin d'isoler chaque segment d'ADN double brin. Chacun de ces segments va se circulariser par un mécanisme de recombinaison site-spécifique et former l'ensemble des différents cercles polydnaviraux d'ADN double brin présents individuellement dans les différentes nucléocapsides. Chez les ichnovirus, un mécanisme appelé nesting a été identifié ; les petits cercles d'ADN double brin sont issus de cercles de plus grande taille par l'intermédiaire d'un mécanisme de recombinaison, et produits en quantités différentes. Ce mécanisme aboutit à la présence des gènes polydnaviraux en abondance relative différente dans les particules virales injectées au cours du parasitisme. Il est proposé que ce type d'organisation permettrait d'assurer un niveau d'expression plus important de certains gènes dans l'hôte parasité.

Afin de répondre aux questions relatives aux processus d'excision, circularisation et amplification et à la nature du polydnavirus ancêtre, il faudra, outre le séquençage complet des génomes polydnaviraux, sujet auquel la partie suivante est consacrée, procéder à l'étude de la forme « répliquative » des polydnavirus afin d'identifier les gènes structuraux des polydnavirus, ainsi que la forme intégrée dans le génome de l'hyménoptère.

Review

Polydnavirus genome: integrated vs. free virus

J.-M. Drezen ^{a,*}, B. Provost ^a, E. Espagne ^a, L. Cattolico ^b, C. Dupuy ^a, M. Poirié ^a,
G. Periquet ^a, E. Huguet ^a

^a Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte and Institut Fédératif de Recherche 'Biologie des Transposons et des Virus' CNRS, Faculté des Sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France

^b Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, 91057 Evry, France

Received 8 August 2002; received in revised form 25 November 2002; accepted 26 November 2002

Abstract

Polydnaviruses are unique because of their obligatory association with thousands of parasitoid wasp species from the braconid and ichneumonid families of hymenopterans. PDVs are injected into the parasitized hosts and are essential for parasitism success. However, polydnaviruses are also unique because of their genome composed of multiple dsDNA segments. Cytological evidence has recently confirmed the results of genetic and molecular analyses indicating that PDV segments were integrated in the wasp genome. Moreover a phylogenetic study performed using the age of available fossils to calibrate the molecular clock indicated that the polydnaviruses harboured by braconid wasps have resided within the wasp genome for approximately 70 million years. In the absence of horizontal transmission, the evolution of the PDV genomes has been driven exclusively by the reproductive success they have offered the wasps. The consequences of this particular selection pressure can be observed in the gene content of certain PDV genomes from which increasing sequence data are available. Molecular mechanisms already identified could be involved in the acquisition and loss of genes by the PDV genomes and lead us to speculate on the definition of the virus genome.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Polydnavirus; Parasitoid wasp; Hymenoptera; Braconidae; Ichneumonidae; Genomics; Evolution

Contents

1. Introduction	408
2. PDV particles	408
3. PDV genome organisation in the nucleocapsids	408
4. Polydnavirus DNA is integrated into the wasp genome	409
5. Evolutive origin of polydnaviruses	410
6. Evolution of PDV genome once integrated in the wasp genome	412
7. How can virulence genes be acquired by the PDV genome: de novo integration of virus segments and transposition of mobile elements	413
8. How are structural genes lost to the wasp genome: recognition sequences at the extremities of the virus segments are required for the excision/circularisation of the virus segments	413
9. In CcPDV several segments are co-amplified within a larger precursor molecule comprising a sequence not found in the virus particles. This finding questions the extant of the virus genome	414

1. Introduction

Polydnaviruses form obligatory associations with tens of thousands of species of parasitoid wasps from the ichneumonid and braconid families of hymenopterans. These parasitoid wasp–polydnavirus interactions are unique examples where a virus is used by an eukaryotic organism to manipulate the physiology of another eukaryote. Female parasitoid wasps produce mature virions in the ovaries which are injected into lepidopteran host larvae (or eggs) during oviposition. Once delivered into the host, viral genes are expressed by the cellular machinery, causing major physiological alterations comprising in most cases disruption of the immune defenses and modification of the developmental program (Webb, 1998). Most studies on polydnaviruses are aimed into understanding how viral products interfere with host physiology by characterising virus genes expressed during parasitism.

Polydnaviruses are also unique because of their large segmented genome composed of multiple double-stranded DNA circles included in virus particles. Since these circles contain the genetic information used to manipulate host physiology, the question of how they are produced in the wasp ovaries also deserves investigation.

Polydnaviruses have been classified as a virus family, the polydnaviridae, on the basis of the molecular features of their genome and of their obligate association with endoparasitoid wasps (Stoltz et al., 1984). The bracoviruses harboured by wasps from the Braconidae family differ in many aspects from the ichnoviruses associated with the Ichneumonidae family of wasps. They were thus classified as two different genera (Stoltz et al., 1995). These differences most probably reflect different evolutive histories of the wasp–virus symbiosis in the two parasitoid families. However, as discussed below, similar concepts can be used to understand the evolution of the symbiosis in ichneumonids and braconids.

In this review, we present recent molecular data regarding organisation, content and replication of polydnavirus genomes. We will discuss how these data help us to understand the role of polydnaviruses in the host–parasite interaction and in the dynamics of the evolution of the symbiosis between polydnaviruses and wasps. We will focus on recent data obtained on bracoviruses harboured by two parasitoid wasps of different braconid subfamilies: CcPDV of *Cotesia congregata* (microgastrinae) and CiV of *Chelonus inanitus* (cheloninae) and compare them with the data obtained on the ichnovirus of *Camponotus sonorensis*. For clarity we will first revisit some fundamental data on the simi-

larities and differences between bracoviruses and ichnoviruses.

2. PDV particles

Transmission electronic microscopy (TEM) analyses provided the first evidence regarding the differences between bracoviruses and ichnoviruses. Virus particles of both genera are produced from cells located in a specialised region of the ovary, the calyx. Ichnovirus and bracovirus particle replication occurs within the nuclei, but the fate of the cells supporting virus replication differs. Ichnovirus particles are released continuously through a ‘budding’ process that do not damage the cells (Volkoff et al., 1995). In the cells producing bracoviruses the nuclei greatly enlarge, occupying most of the cell volume at the end of virus replication and virus particles are released most probably through cell lysis (De Buron and Beckage, 1992). The population of cells undergoing bracovirus replication is continuously renewed (Pasquier-Barre et al., 2002, De Buron and Beckage, 1992).

Another major difference between bracoviruses and ichnoviruses concerns the virus particles. Bracoviruses have rod-shaped nucleocapsids with a uniform diameter (35 nm), but variable lengths (30–150 nm) (Fig. 1). Ichnoviruses nucleocapsids are much larger, have an ellipsoid shape and are of uniform size (85 × 330 nm). A unique membrane surrounds bracovirus nucleocapsids while two membranes surround ichnovirus capsids (Webb, 1998).

Among bracoviruses, CcPDV has the particularity that several nucleocapsids are embedded in a protein matrix and enveloped within the same virus particle. Such virus particles are found in the *Cotesia* genus (De Buron and Beckage, 1992; Hamm et al., 1990) while in other bracoviruses such as CiV, nucleocapsids are singly enveloped (Albrecht et al., 1994).

3. PDV genome organisation in the nucleocapsids

The bracovirus genome consists of a collection of DNA circular molecules (see DNA extracted from CcPDV particles in Fig. 1, panel D). Interestingly, it was shown in the case of CiV, that each molecule is contained in a different nucleocapsid. Indeed it was observed using TEM that a single molecule of variable length was released from each nucleocapsid after an osmotic choc (Albrecht et al., 1994). The CiV bracovirus can thus be considered as a heterogeneous population of virions. We have not performed such a detailed analysis on CcPDV, but the similar morphology of the nucleocapsids and the heterogeneity in their lengths suggest a similar organisation.

* Corresponding author. Tel.: +1-33-2-47-36-73-57; fax: +1-33-2-47-36-69-66.

E-mail address: drezen@univ-tours.fr (J.-M. Drezen).

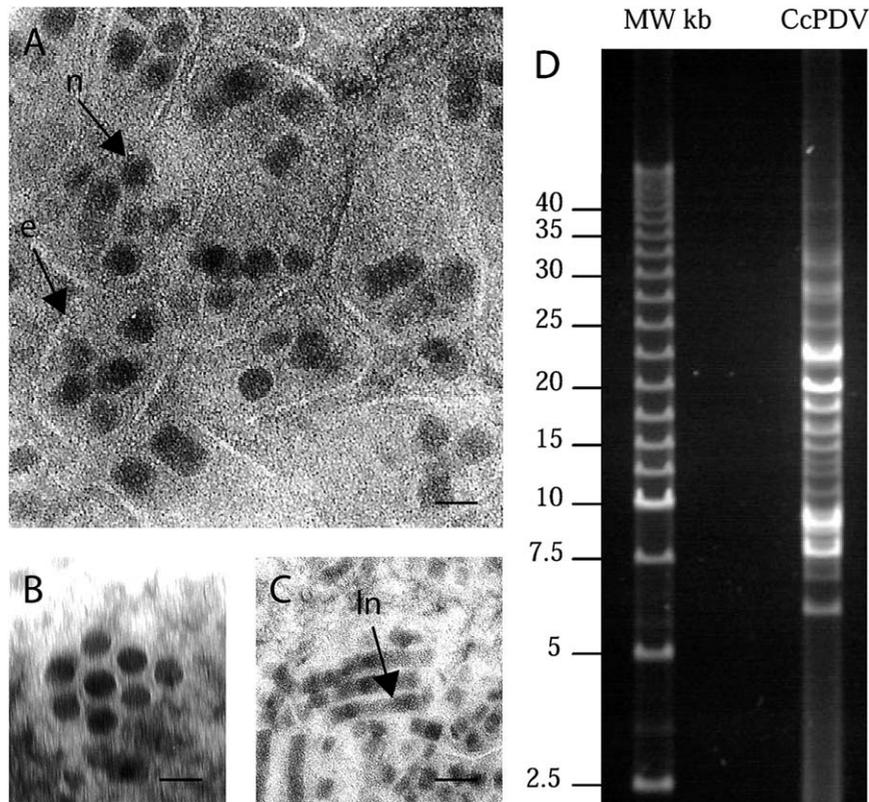


Fig. 1. Electron microscopy of CcPDV particles and electrophoretic analysis of the virus genome. (A) Bracovirus particles in the nucleus of a calyx cell of the braconid wasp *Cotesia congregata*. Several nucleocapsids (n) were found per envelope (e) (bar, 44 nm). (B, C) Longer nucleocapsids (ln, diameter 35 nm and length 200 nm) organised in arrays occasionally found in cells undergoing PDV replication resembling baculovirus particles (B, transversal view, bar, 50 nm; C, longitudinal view, bar, 70 nm). These nucleocapsids present in some calyx cells undergoing PDV replication are much longer than the more common nucleocapsids (n, shown in A, diameter 35 nm, length 30 nm) and are approximately the size of baculovirus nucleocapsids. They are different from the long filamentous particles of the other virus present in the ovaries of *Cotesia congregata* (De Buron and Beckage, 1992). (D) Analysis of the CcPDV viral genome. Undigested virus DNA (0.5 μ g) purified by filtration from dissected ovaries was separated by FIGE (field inverted gel electrophoresis), 18 different molecules are visible (MW, molecular weight marker).

By contrast, the entire viral genome is thought to be packaged in a single ichnovirus particle (Webb, 1998). Virus particles are homogeneous: viral subpopulations with different DNA electrophoretic patterns are not detected in density gradient fractions of purified virus (Krell et al., 1982). Furthermore, the ichnovirus lenticular nucleocapsids are large enough in theory to encapsidate multiple DNAs (Webb, 1998).

4. Polydnavirus DNA is integrated into the wasp genome

Viruses are obligate intracellular parasites which vary considerably in their structure and biology, but exhibit the following characteristics in common: they attach to host cells, penetrate into the cells, replicate their nucleic acid, synthesise virus-specific proteins, and release progeny virions (Newton, 1982). Polydnaviruses meet all these criteria except that their life cycle is split between two different hosts. In the ovary cells of parasitoid wasps, PDVs replicate, synthesise virus-specific pro-

teins, and release virions. They attach and penetrate into lepidopteran cells, where the infection leads to the synthesis of proteins mostly involved in the host–parasite interaction. However, unlike most viruses the infection does not lead to the production of progeny virions. There is neither virus particle replication nor virus DNA replication in host tissues (Theilman and Summers, 1986). Thus the question of how these virus-like entities appeared and were maintained in insects arose very soon after their discovery. The fact that virus DNA could be found in all individual wasps, including males (which do not produce virus particles), suggested a physical association between virus and wasp genomes (Fleming and Summers, 1986). This was confirmed first at the beginning of the 1990s by genetic analyses of ichnovirus and bracovirus transmission performed using polymorphism described for viral DNA circles. Using isogenic lines of two species a braconid (*Cotesia melanoscella*) and an ichneumonid wasp (*Hyposoter fugitivus*), it was demonstrated that transmission of the circles follows the Mendelian rules of heredity, which strongly suggested a chromosomal transmission (Stoltz, 1990).

At the same time, the demonstration that PDV genomes are integrated into wasp chromosomes was obtained using different molecular approaches. In Southern blot analysis, using a viral fragment as a probe, restriction DNA fragments larger than the expected viral circle ('off-size' fragments) were detected in DNA extracted from male wasps *Campoletis sonorensis* (Ichneumonidae) (Fleming and Summers, 1986). The sequences of the viral circle therefore appeared to be integrated into a larger molecule. Integration to the wasp genome was finally demonstrated with the cloning of a fragment containing viral DNA flanked by sequences hybridizing only with wasp genomic DNA (Fleming and Summers, 1991). In *Hyposoter fugitivus* (Ichneumonidae), at least four polydnavirus circles were strongly suggested to be integrated into wasp high molecular weight DNA through the detection of the corresponding 'off-size' fragments (Xu and Stoltz, 1991).

Detailed molecular analyses of bracovirus segments integration have also been performed. In the braconid wasp, *Cotesia congregata*, we have isolated the integrated form of a virus segment. The probes derived from the DNA located 3' of the virus sequences hybridised specifically to wasp genomic DNA in Southern blot analysis (Savary et al., 1997) a condition considered as sufficient to demonstrate integration of virus sequence in the wasp genome. The integrated forms of viral DNA were also studied in the braconid wasp *Chelonus inanitus*. The sequence of two virus segments and their flanking regions were isolated from a genomic library of male wasps that do not even contain traces of virus circles in this species (Gruber et al., 1996; Wyder et al., 2002). However, the physical linkage to wasp chromosomal DNA was not formally proven since all the segments analysed were found to be linked to other virus segments (Wyder et al., 2002).

In addition to genetic and molecular analyses the integration of virus sequences was confirmed very recently using a third approach. We could visualise directly the virus sequences on chromosomes of *Cotesia congregata* using in situ hybridisation (Belle et al., 2002)(Fig. 2). The advantage of this approach is that we could obtain a picture of the overall organisation of the virus genome within wasp chromosomes, i.e. answer the question whether proviral sequences are located either on a single chromosome or scattered in the wasp genome. Furthermore we were also interested in determining whether polydnavirus integration sites are located in particular chromosomal structures like centromeres or telomeres, as demonstrated for many transposons and viruses (Kidwell and Lynch, 2000).

We used several CcPDV probes to hybridise to *Cotesia congregata* metaphase chromosomes (EP1, VP1, VP2). We obtained good metaphase spreads using developing gonads and brain dissected from larvae emerging from parasitized caterpillars (Fig. 2). The *C.*

congregata haploid set of chromosomes ($n = 10$) was identified using haploid males that constitute the sole progeny of virgin females in haplodiploid species. The *C. congregata* karyotype is comprised of six metacentric (1, 2, 3, 4, 6 and 10), three subtelocentric (5, 7 and 8) and one acrocentric (9) chromosomes. Several chromosomes can be clearly distinguished on the basis of their morphology. In particular chromosome 5 can be readily distinguished from the other subtelocentric chromosomes. Interestingly, we found that all virus segments analysed were located on the short arm of *Cotesia congregata* chromosome 5 (Belle et al., 2002) (Fig. 2).

Moreover, we obtained a striking pattern of hybridisation on spermatid nuclei that suggests a telomeric location of virus sequences. The signals were always localised at the periphery of the spermatid nucleus (Belle et al., 2002). Studies on human sperm have yielded a model of sperm nucleus organisation in which the centromeres are grouped into a chromocentre centrally located inside the sperm nucleus, while the telomeres are associated in doublets at the periphery (Zalensky et al., 1995). If this model is applicable to insect spermatids, then the pattern of hybridisation observed indicates a telomeric location of CcPDV sequences. Interestingly, this observation can be related to the high A/T content of bracovirus sequences (CiV 67–68% (Wyder et al., 2002) and CcPDV 68%), a characteristic feature of telomeric sequences.

In *Chelonus inanitus* the flanking sequences of 2 CiV fragments (CiV12 and CiV14) were identified recently and shown to correspond to other virus segments indicating that at least two groups of three segments are clustered in the virus genome (Wyder et al., 2002). The results of both cytological and molecular studies thus indicate that provirus sequences of the different CcPDV and CiV bracovirus segments analysed are clustered in the wasp genome, suggesting that most if not all the proviral sequences of bracoviruses might be organised as a unique macrolocus on a wasp chromosome (Belle et al., 2002).

The demonstration that PDV sequences are integrated into wasp genomes, and are therefore transmitted chromosomally, is essential and serves as a basis for the studies on the origin of the association between parasitoid wasps and their viruses.

5. Evolutionary origin of polydnaviruses

Bracoviruses and ichnoviruses are not present in all subfamilies of ichneumonids and braconids, but in separate lineages within each wasp family. They have been found in two Ichneumonid subfamilies (Campopleginae, Banchinae) and in four braconid subfamilies (Cheloninae, Cardiochilinae, Miracinae and Microgastrinae) (Whitfield, personal communication).

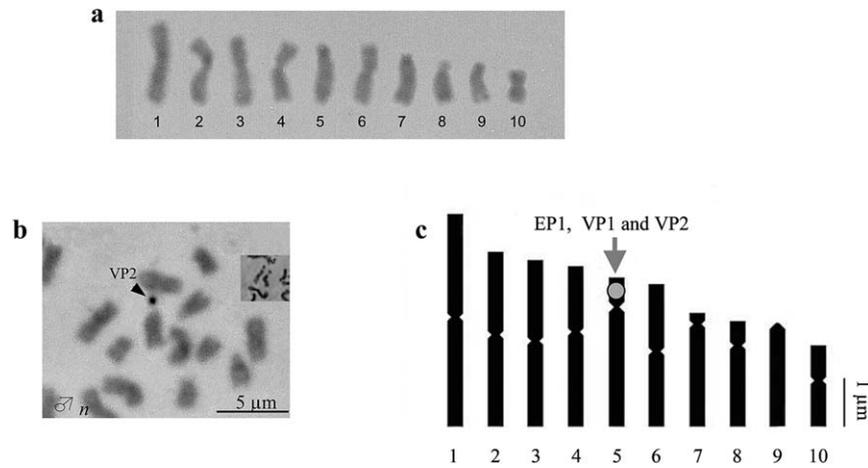


Fig. 2. Visualisation of PDV sequences in a wasp chromosome (a) *C. congregata* karyotype. (b) Summary of the results obtained using in situ hybridisation on wasp chromosomes (Belle et al., 2002). Three different viral probes EP1, VP1, VP2 hybridize to the short arm of chromosome 5. (c) In situ hybridisation on *C. congregata* chromosomes obtained using developing brain cells, with the CcPDV probe VP2. The inset shows that the primary constriction of chromosome 5 can be 'elastic', so that the dot shaped arm of chromosome 5 appears as separated from the centromere.

The total number of species harbouring PDVs is estimated to be approximately 30 000 (Webb, 1998). Ichnovirus and bracovirus carrying species are clearly separated by lineages that lack polydnviruses. Together with the differences in particle morphology and ultrastructural characteristics of calyx cells supporting virus replication, these phylogenetic data suggest that the association with polydnviruses originated at least twice and independently among wasps (Webb, 1998).

Analyses of molecular data (16S RNA) and of 21 morphological characters were performed to study the phylogeny of braconids. Braconids carrying bracoviruses correspond to a monophyletic lineage, the microgastroid complex (Whitfield, 1997), which means that all members of the eight subfamilies from the microgastroid complex contain polydnvirus in contrast to lineages outside this group. This result has subsequently been corroborated by independent analyses of 16S RNA (Dowton et al., 1998) and 28S RNA sequences (Belshaw et al., 1998; Dowton and Austin, 1998). Using the age of available fossils to calibrate the molecular clock, it was recently estimated that the common ancestor of this lineage lived over 73.7 ± 10 million years ago (Whitfield, 2002). Thus, more than 15 000 species carrying bracoviruses might be derived from a single evolutionary event: the integration of the PDV progenitor into the DNA of an ancestor parasitic wasp species.

Given the common localisation of multiple virus segments in *Cotesia congregata* and *Chelonus inanitus* we suggest that the virus genome might be organised as a macrolocus on a particular chromosome (Belle et al., 2002; Wyder et al., 2002). Such an organisation would also support the hypothesis of the unique origin of the braconid wasp–PDV association. A single integration event would have been sufficient to integrate all the virus sequences in the ancestor wasp genome.

If the evolution of virus DNA is driven exclusively via the integrated form, the phylogeny established for virus sequences should be a mirror of that established for wasps. Until recently, few PDV genes had been characterised and each gene had been identified in one wasp species only. Whitfield has recently begun to build a bridge between bracoviruses by cloning the homologue of the CrV1 gene (first isolated from *Cotesia rubecula*) and of the EP1 gene (cloned initially in *Cotesia congregata*) in five and two species from the *Cotesia* genus, respectively (Whitfield, 2000). The phylogeny obtained from the comparison of the CrV1 gene between the six *Cotesia* species matches the one established from wasp mtDNA and NADH DNA analyses which is consistent with PDVs being inherited without horizontal transmission.

By contrast to the situation described for the bracoviruses, the phylogenetic relationship between ichneumonid species bearing ichnoviruses is still poorly defined. In particular, it is not known if one or several events of association led to the obligatory relations observed today. However, it is clear that ichneumonid wasp–virus symbiosis occurred independently from the virus capture in the braconid lineage. The nature of the ancestral virus in braconid and ichneumonid is also probably different. Since the morphology of bracovirus nucleocapsids has not diverged greatly in a 70 million-year period of evolution, it seems reasonable to assume that the different nucleocapsids of ichnoviruses and bracoviruses most probably reflect a different nature of the ancestral viruses captured in the two parasitoid wasp families. Given the differences in the morphology, in the mode of replication, as well as the different history of their association with parasitoid wasps, we can even question the pertinence of classifying bracoviruses and ichnoviruses as a same virus family. In the obligatory

relations of ichneumonid and braconid wasps with viruses, we are probably facing a phenomenon of convergent evolution induced by the same environmental constraint: the necessity to develop within the hemocoel of an insect host.

6. Evolution of PDV genome once integrated in the wasp genome

The fact that PDVs do not replicate in host tissues and that they are integrated into wasp DNA puts the evolution of the PDV genome under specific constraints that are not typical of classical viruses. Genes controlling host physiology and immunity are under high selection pressure since the transmission of virus DNA is strictly dependent upon the success of the parasitoid. Conceptually, only sequences involved in encapsidation and in the expression of virus genes in the lepidopteran host are required to be located on the DNA circles. Since the integration of PDVs in the wasp genome is millions of years old, sequences originating from the ancestral virus might no longer reside in the virus segments, but might be present in the wasp genome as has been described in many other symbiotic interactions. Conversely, genes originating from the wasp might have been transferred into the virus sequences and maintained if they prove useful for parasitism success (Webb, 1998).

We have already obtained the sequence of a significant part of the CcPDV genome (175 kb out of approximately 250 kb) and its content can be compared with the prediction of the theory on the evolution of PDV genomes once integrated in the wasp genome.

The overall sequence is A-T rich (68%) a proportion similar to that found for the sequenced CiV segments (67–68%) (Wyder et al., 2002). The computer analysis of the virus genome (using the programs Genescan (Burge and Karlin, 1997) and AAT (Huang et al., 1997)) indicates that the virus segments contain many putative genes. Among the potential proteins encoded by these genes, some contain well-characterised protein domains, some are homologous to hypothetical proteins identified in eukaryotic genomes, while others have no homology at all with sequences in the data banks. Most of the CcPDV genes analysed contain introns such as the CiV genes described (Wyder et al., 2002; Johner and Lanzrein, 2002) and belong to multigenic families, a situation which is characteristic of eukaryotic genomes and not of virus genomes. Only one segment analysed (the A circle) does not seem to contain any genes from computer analysis. However, it is not possible to exclude that this circle encodes a short peptide. Comparison between A and EP1 circle sequences suggests that one of the circles arose through a duplication event. More generally, the analysis of the circles suggests that many duplication events have occurred, some of them fairly recently

(except if genetic conversion events regularly homogenise the virus sequences), which have contributed to the constitution of multigenic families.

We have assessed using Northern analysis the expression of several potential viral gene families in parasitised host larvae, and found that they were all expressed in the host (personal data). This could be an indication that the genes encode virulence factors involved in the host–parasite interaction.

By contrast to the seemingly abundance in genes encoding potential virulence factors very few potential genes displaying homology with known virus sequences have been found so far. One gene has a significant homology with an ascovirus gene (SF AV1), but the function of the corresponding ascovirus protein is unknown (Staziak et al., 2000). The only other virus-related sequences have a significant homology with retrovirus-type transposons. During the 70 million years of integration of the bracovirus genome within microgastroid genomes it is not surprising that mobile elements have transposed into the integrated form of polydnavirus segments as into any part of the wasp genome. Bracoviruses were originally described as unusual baculoviruses (Krell and Stoltz, 1979) because of their similar particle morphology (Fig. 1). However, so far we have found no significant homology between PDV and baculovirus genes to confirm that this morphological similarity reflects a true phylogenetic relationship. More generally the analysis of CcPDV sequences has not given to date any clue concerning the nature of the ancestral virus captured by the ancestor wasp of the microgastroid lineage.

A possible interpretation is that PDVs did not originate from a virus and thus that a virus structural gene set has never existed within PDV particles. More likely sequences containing virus structural genes might have ‘lost’ the capacity to be encapsidated after millions of years of evolution within wasp chromosomes. If this is the case, genes involved in PDV particle replication should be searched for within the wasp genome. We will discuss below how a recent model of PDV replication could help for the isolation of such genes.

The results obtained on the analysis of ichnovirus sequences sounds very similar. The sequence analysis of the *Campoletis sonorensis* ichnovirus (CsIV) was completed recently (Webb, 2002). The 253 kb genome is ~66% noncoding, containing just over 50 genes (or predicted open reading frames) that belong to six viral gene families. The CsIV genome contains multiple variants of genes expressed during parasitism, but few genes required for virus replication.

Bruce Webb concludes that the extant viral genome results from the divergent action of reductive evolution, genes required for virus replication are lost to the wasp genome, and proliferative evolution, the acquisition and diversification of genes disrupting host immunity and development (Webb, 2002). The loss of viral structural

genes by the virus genome has now been documented. Indeed it was reported that a recently identified gene encoding a structural protein of *Campoletis sonorensis* PDV, the p44 gene, was not encapsidated (Deng et al., 2000).

Altogether the results on sequence analysis of PDV genomes are in accord with the hypothesis that virus sequences have been integrated in parasitoid genomes for a very long period of time. These viruses have evolved following the particular constraints linked to the chromosomal transmission of the virus sequences and the selection of virus genes ensuring parasitism success.

We will now discuss what we know of the molecular mechanisms that might be involved in the loss of structural genes and the acquisition of new virulence genes by the PDV genome.

7. How can virulence genes be acquired by the PDV genome: de novo integration of virus segments and transposition of mobile elements

The properties of some PDV segments to integrate de novo into DNA might provide clues into understanding how virulence genes can be acquired by PDVs.

The question of whether PDV segments still have the capacity to integrate into DNA was raised by the results of cultured cell experiments. Several PDV infection experiments of *Lymantria dispar* cultured cells indicated that viral DNA might persist as an integrated form in the insect host. Cells surviving to infection by *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus (GiPDV) were stably transformed with DNA from at least two segments of the GiPDV genome: almost an entire 18.7 kb GiPDV segment (p157) and a smaller part of a second segment (p384) (McKelvey et al., 1996). Another PDV from *Hyposoter fugitivus* (ichnovirus) has also been shown to integrate into *L. dispar* cell lines (Kim et al., 1996) and specific persistence of the expression of the *Hyposoter dydimator* ichnovirus K gene has been reported in *Spodoptera frugiperda* cells (Volkoff et al., 2001).

The p157 DNA maintained into *Lymantria dispar* cells has been cloned. It contains virus DNA covalently linked to lepidopteran cell DNA, which demonstrates its integration (Gundersen-Rindal and Dougherty, 2000). The segment can also persist in non-host-infected cell lines derived from various lepidopteran species and even from a coleoptera (Gundersen-Rindal et al., 1999). In all cases, the PDV sequences are most probably integrated, since a specific band corresponding to the circular form is consistently absent in the transformed cells (Gundersen-Rindal et al., 1999). The fact that the same viral DNA fragment is consistently detected in the DNA of different insect cells suggests that integration of PDV DNA does not occur by chance, but that a specific mechanism is involved.

The ability of PDV DNA to integrate in vivo into parasitised host cells has not been demonstrated yet and its biological significance would be unclear. Indeed, it is very unlikely that the stability of PDV DNA within host tissues might require the integration into host cells.

However, the ability of some virus segments to integrate could be related to integration into wasp DNA and not host DNA. Bruce Webb has proposed that through 'transposition' within the wasp genome, virus segments have picked up genes that have revealed to be useful for parasitism. For instance, such mechanisms might have enabled the transfer of wasp venom genes to the virus. This would explain the immunological relatedness and physical similarities between ichnovirus proteins and venom proteins of the wasp *Campoletis sonorensis* (Webb and Summers, 1990).

Some transposable elements, by inserting in the integrated form of the PDV genome, may also be a source of virulence genes. Accordingly an aspartyl protease gene of retroviral origin was detected in the *Toxoneuron nigriceps* PDV genome. This gene is highly expressed in host larvae parasitised by the braconid wasp *Toxoneuron nigriceps* (Falabella et al., 2003). PDV sequences that have retained the property to integrate into DNA might also correspond to transposable elements.

8. How are structural genes lost to the wasp genome: recognition sequences at the extremities of the virus segments are required for the excision/circularisation of the virus segments

The other major consequence of the integration of the PDV genome over a long period of time in the wasp genome is the loss of genes required for virus replication to the wasp genome. To understand how structural genes might have been lost it is necessary to know how the virus circles found in PDV particles are produced from the proviral form of the virus genome.

The dsDNA circles contained in virus particles clearly originate from the chromosomal forms of the virus sequences. However, little is known about the mechanism that ensures their production.

The relationship between the integrated form of the virus present in the wasp chromosome and the circular form injected into the parasitised host was investigated in two independent studies performed on the bracoviruses of *Chelonus inanitus* and *Cotesia congregata*. The flanking regions of virus segments were determined in each species (CiV12 and CiV14 for *Chelonus inanitus*, EP1 for *Cotesia congregata*) after cloning of the integrated forms from male genomic DNA libraries (Savary et al., 1997; Gruber et al., 1996; Wyder et al., 2002). Using PCR analyses with primers flanking the integration site in the wasp DNA, specific products were obtained corresponding to the excision of the virus

sequence located between the flanking regions. These results indicate that virus sequences are excised during the production of dsDNA circles which will in turn be enclosed into virions.

In both braconid species, an imperfect direct repeat is found at both extremities of the integrated virus sequence. A recombined form of these repeats is found on the PCR products and on the dsDNA circles. Interestingly, in CcPDV, these repeats contain a potential binding site for a recombinase of the Hin family, located in close vicinity to the position where the DNA strand exchange occurs. This suggests that CcPDV sequences excise via a site-specific recombination mechanism somewhat similar to that mediated by the Hin family of recombinases (Savary et al., 1997, 1999).

Chelonus inanitus repeated sequences have a weak similarity with a Hin site (Wyder et al., 2002). Since *Cotesia congregata* and *Chelonus inanitus* belong to two different braconid subfamilies it is not really surprising that the repeats are different. These differences in the recognition sequences do not exclude that the general mechanism of excision have been inherited from the ancestral bracovirus since it might have significantly diverged during the evolution of the two wasp subfamilies.

The loss of a direct repeat at one extremity of the chromosomal form of a virus segment or a mutation preventing the binding of the recombinase ensuring excision/circularisation could be in theory sufficient for the virus sequence to be lost by the virus genome. Such a loss would have no cost for the parasitoid wasp, as long as the genes encoded by the segment are not involved in the host–parasite interaction. Moreover, new insights in virus replication (see below) suggest that such segments could still be amplified during virus replication.

9. In CcPDV several segments are co-amplified within a larger precursor molecule comprising a sequence not found in the virus particles. This finding questions the extant of the virus genome

Conceptually, virus sequences have to be both amplified and excised/circularised before being encapsidated. Several working models can be proposed for these two key steps, (1) virus sequences are circularised first by excision of the virus segments from the wasp chromosome and the dsDNA circles produced are amplified after (see H1, Fig. 3). (2) Alternatively, virus segments adjacent in the wasp genome are first co-amplified in the same molecule and then excised to give the different dsDNA molecules found in the virus particles (H2, Fig. 3). We found recently that the CcPDV virus segments located at the EP1 locus are indeed co-amplified prior to excision. At least two adjacent segments (and prob-

ably many more) are amplified together (Pasquier-Barre et al., 2002). The EP1 dsDNA circle is produced by excision from this amplified molecule.

The amplification of virus sequences does not occur directly on the chromosome (H2) such as described for example in drosophila ovary cells for the amplification of chorion genes (Spradling, 1981). Indeed, the map of the amplified molecule is different from that of the chromosomal form at a defined position in the downstream flanking region of the EP1 segment (Pasquier-Barre et al., 2002).

Our new model of virus sequence replication thus involves the excision of a very large molecule from *Cotesia congregata* chromosome 5, the amplification of this molecule, followed by the excision of individual circles by a site-specific recombination mechanism (H3, Fig. 3). The amplified molecule might correspond to the whole genome as the virus sequences might be located on the same chromosomal locus according to in situ hybridisation experiments (see above).

Strikingly, the amplified molecule contains a DNA sequence which is not found in the virus particles. This indicates that virus sequences amplified in the wasp do not correspond exactly to the virus genome encapsidated in the particles.

In *Chelonus inanitus*, it would be of interest to determine if the clustered CiV segments are also amplified together before being excised/circularised (Wyder et al., 2002).

In the *Campoletis sonorensis* ichnovirus, smaller circles are generated from larger circles through alternative recombination pathways and produced in different quantities (Xu and Stoltz, 1993; Cui and Webb, 1997), a mechanism called nesting. Both smaller and larger segments are found in the virus particles. Nesting results in an increase in the relative abundance of some polydnavirus genes in the virus particles injected into the parasitised host and this gene dosage might have a physiological function during parasitism (Webb, 1998). The possible occurrence of nesting has been described recently in the case of the *Chelonus inanitus* bracovirus CiV14 segment (Wyder et al., 2002). In the CcPDV genome, we did not detect any indication of nesting so far. However, the co-amplification of virus segments in a large molecule, such as that found for the EP1 locus is a concept very similar to that of nesting, except that the large molecule is not found in the virus particles.

Interestingly, it was reported that the p44 gene encoding a structural protein of *Campoletis sonorensis* PDV, is amplified in females undergoing virus replication although the gene is not encapsidated within virus particles and thus considered as non-viral DNA (Deng et al., 2000). The authors suggest that the corresponding gene was lost from the virus genome during evolution to reside permanently in the wasp genome. However, the fact that it is amplified coincidentally with virus repli-

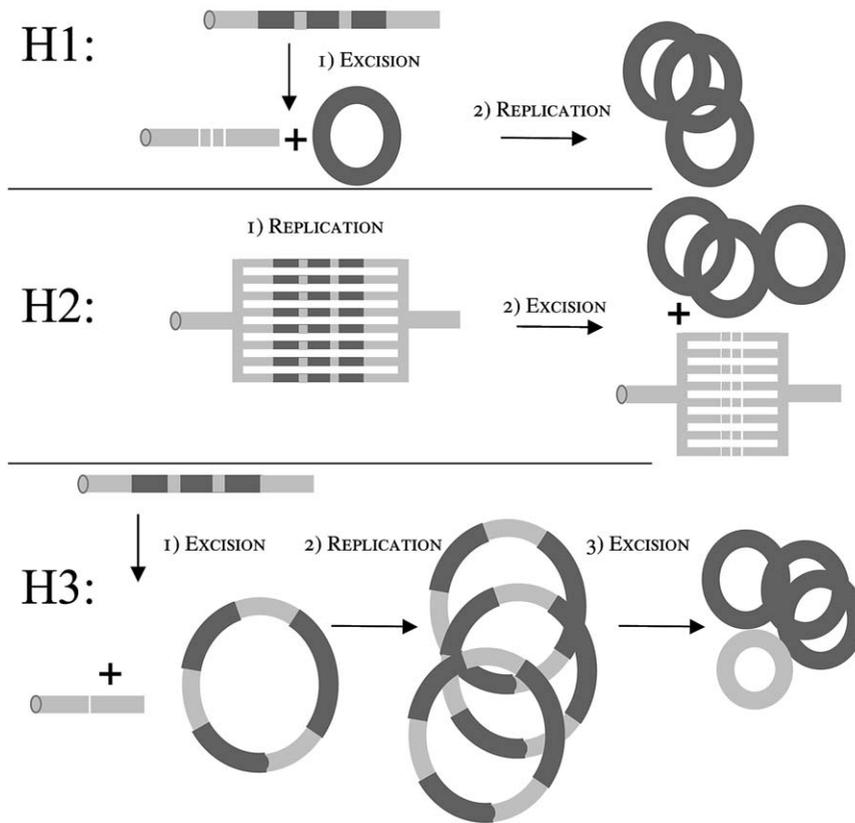


Fig. 3. Working models on PDV excision/circularisation and replication. H1, individual excision of virus segments followed by replication of the circular form. H2, chromosomal replication followed by excision of the virus segments. H3, excision of a large molecule containing the sequence of several virus segments followed by replication and individual excision of virus segments (Pasquier-Barre et al., 2002). In this hypothesis, the sequences located between virus segments in the integrated form might be amplified, but not encapsidated.

cation is puzzling and questions its non-virus nature. Based on our findings that CcPDV sequences not included in virus particles are amplified together with virus segments (Pasquier-Barre et al., 2002) we propose that the sequence encoding the p44 gene might have lost the sequences allowing excision/circularisation, but is still present as a 'replicating form' of the virus genome. This hypothesis has an evolutionary basis. There is no selective pressure for the conservation of structural genes within the dsDNA circles injected into the host, since PDVs do not replicate within host tissues. However, the structural proteins have to be produced in large amounts in calyx cells to achieve a high level of virus particle production. This necessity might have exerted a selection pressure for the sequences encoding structural genes to be maintained at least within a replicating form of the virus genome.

If this hypothesis is confirmed, the analysis of the content of the 'replicative form' of the polydnavirus genome will be a major tool to identify PDV structural genes. It should also prove useful to determine the nature of the ancestral polydnaviruses captured by the wasp genomes.

Acknowledgements

The bracovirus micrographs were obtained at the electronic microscopy facilities of the University of Tours, France. The work concerning CcPDV was supported by the CE contract QLK3-CT-2001-01586.

References

- Albrecht, U., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R., Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Kurt, F., Schümperli, D., Lanzrein, B., 1994. Polydnavirus of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): characterization, genome organization and time point of replication. *Journal of General Virology* 75, 3353–3363.
- Belle, E., Beckage, N.E., Rousselet, J., Poirié, M., Lemeunier, F., Drezen, J.-M., 2002. Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. *Journal of Virology* 76, 5793–5796.
- Belshaw, R., Fitton, M., Herniou, E., Gimeno, C., Quicke, D.L.J., 1998. A phylogenetic reconstruction of the Ichneumonoidea (Hymenoptera) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Systematic Entomology* 23, 109–123.
- Burge, C., Karlin, S., 1997. Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology* 268, 78–94.

- Cui, L., Webb, B.A., 1997. Homologous sequences in the *Campoletis sonorensis* polydnavirus genome are implicated in replication and nesting of the W segment family. *Journal of Virology* 71, 8504–8513.
- De Buron, I., Beckage, N.E., 1992. Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 315–327.
- Deng, L., Stoltz, D.B., Webb, B.A., 2000. A gene encoding a polydnavirus structural polypeptide is not encapsidated. *Virology* 269, 440–450.
- Downton, M., Austin, A.D., 1998. Phylogenetic relationships among the microgastroid (Hymenoptera: Braconidae): combined analysis of 16S and 28S rDNA genes, and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10, 354–366.
- Downton, M., Austin, A.D., Antolin, M.F., 1998. Evolutionary relationships among the braconidae (Hymenoptera: Ichneumoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. *Insect Molecular Biology* 7, 129–150.
- Falabella, P., Varricchio, P., Gigliotti, S., Tranfaglia, A., Pennacchio, F., Malva, C., 2003. *Insect Molecular Biology* 12, 9–17.
- Fleming, J.A.G.W., Summers, M.D., 1986. *Campoletis sonorensis* endoparasitic wasps contain forms of *C. sonorensis* virus DNA suggestive of integrated and extrachromosomal polydnavirus DNAs. *Journal of Virology* 57, 552–562.
- Fleming, J.A.G.W., Summers, M.D., 1991. Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 9770–9774.
- Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Schumperli, D., Lanzrein, B., 1996. Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp genome and excised only in later pupal and adult stages of the female. *Journal of General Virology* 77, 2873–2879.
- Gundersen-Rindal, D., Dougherty, E.M., 2000. Evidence for integration of *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus DNA into the chromosome of *Lymantria dispar* in vitro. *Virus Research* 66, 27–37.
- Gundersen-Rindal, D., Lynn, D.E., Dougherty, E.M., 1999. Transformation of lepidopteran and coleopteran insect cell lines by *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus DNA. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* 35, 111–114.
- Hamm, J., Styer, E.L., Lewis, W.J., 1990. Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 55, 357–374.
- Huang, X., Adams, M.D., Zhou, H., Kerlavage, A.R., 1997. A tool for analyzing and annotating genomic sequences. *Genomics* 268, 78–94.
- Johner, A., Lanzrein, B., 2002. Characterization of two genes of the polydnavirus of *Chelonus inanitus* and their stage-specific expression in the host *Spodoptera littoralis*. *Journal of General Virology* 83, 1075–1085.
- Kidwell, M.G., Lynch, D.R., 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Tree* 15, 95–99.
- Kim, M.K., Sisson, G., Stoltz, D., 1996. Ichnovirus infection of an established gypsy moth cell line. *Journal of General Virology* 77, 2321–2328.
- Krell, P.J., Stoltz, D.B., 1979. Unusual baculovirus of the parasitic wasp *Apanteles melanoscelus*: isolation and primary characterization. *Journal of Virology* 29, 1118–1130.
- Krell, P.J., Summers, M.D., Vinson, S.B., 1982. Virus with a multipartite superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis*. *Journal of Virology* 43, 859–870.
- McKelvey, T.A., Lynn, D.E., Gundersen-Rindal, D., Guzo, D., Stoltz, D.A., Guthrie, K.P., Taylor, P.B., Dougherty, E.M., 1996. Transformation of gypsy moth (*Lymantria dispar*) cell lines by infection with *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 23, 764–770.
- Newton, A.A., 1982. Viruses—exploiters or dependant of the host? *Parasitology* 85, 189–216.
- Pasquier-Barre, F., Dupuy, C., Huguet, E., Monteiro, F., Moreau, A., Poirie, M., Drezen, J.M., 2002. Polydnavirus replication: the EP1 segment of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* is amplified within a larger precursor molecule. *Journal of General Virology* 83, 2035–2045.
- Savary, S., Beckage, N.E., Tan, F., Periquet, G., Drezen, J.-M., 1997. Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastriinae) at potential recombinase binding sites. *Journal of General Virology* 78, 3125–3134.
- Savary, S., Drezen, J.-M., Tan, F., Beckage, N.E., Periquet, G., 1999. The excision of polydnavirus sequences from the genome of the wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastriinae) is developmentally regulated but not strictly restricted to the ovaries in the adult. *Insect Molecular Biology* 8, 319–327.
- Spradling, A.C., 1981. The organization and amplification of two chromosomal domains containing drosophila chorion genes. *Cell* 27, 193–201.
- Staziak, K., Demattei, M.-V., Federici, B.A., Bigot, Y., 2000. Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double-stranded DNA genomes. *Journal of General Virology* 81, 3059–3072.
- Stoltz, D.B., 1990. Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA. *Journal of General Virology* 71, 1051–1056.
- Stoltz, D.B., Beckage, N.E., Blissard, G.W., Fleming, J.G.W., Krell, P.J., Theilmann, D.A., Summers, M.D., Webb, B.A., 1995. Polydnaviridae. In: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Springer Verlag, Wein, Wein, New York, pp. 143–147.
- Stoltz, D.B., Krell, P.J., Summers, M.D., Vinson, S.B., 1984. Polydnaviridae—a proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes. *Intervirology* 21, 1–4.
- Theilman, D.A., Summers, M.D., 1986. Molecular analysis of *Campoletis sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. *Journal of General Virology* 67, 1961–1969.
- Volkoff, A.N., Ravallec, M., Bossy, J., Cerutti, P., Rocher, J., Cerutti, M., Devauchelle, G., 1995. The replication of *Hyposoter didymator* polydnavirus: cytopathology of the calyx cells in the parasitoid. *Biology of the Cell* 83, 1–13.
- Volkoff, A.N., Rocher, J., Cerutti, P., Ohresser, M.C., d'Aubenton-Carafa, Y., Devauchelle, G., Duonor-Cerutti, M., 2001. Persistent expression of a newly characterized *Hyposoter didymator* polydnavirus gene in long-term infected lepidopteran cell lines. *Journal of General Virology* 82, 963–969.
- Webb, B.A., 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In: Miller, L.K., Ball, L.A. (Eds.), *The Insect Viruses*. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 105–139.
- Webb, B.A., 2002. Reductive and proliferative evolution in the genome of an obligately, mutualistic virus. In: 8th European Workshop on Insect Parasitoids, Tours, September, 2002.
- Webb, B.A., Summers, M.D., 1990. Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4961–4965.
- Whitfield, J.B., 1997. Molecular and morphological data suggest a single origin of the polydnaviruses among braconid wasps. *Naturwissenschaften* 84, 502–507.
- Whitfield, J.B., 2000. Phylogeny of microgastroid braconid wasps, and what it tells us about polydnavirus evolution. In: Austin, A.D., Downton, M. (Eds.), *The Hymenoptera: Evolution, Biodiversity and Biological Control*. CSIRO Publishing, Melbourne, pp. 97–104.
- Whitfield, J.B., 2002. Estimating the age of the polydnavirus/braconid

- wasp symbiosis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7508–7513.
- Wyder, S., Tschannen, A., Hochuli, A., Gruber, A., Saladin, V., Zumbach, S., Lanzrein, B., 2002. Characterization of *Chelonus inanitus* polydnavirus segments: sequences and analysis, excision site and demonstration of clustering. *Journal of General Virology* 83, 247–256.
- Xu, D., Stoltz, D.B., 1991. Evidence for a chromosomal location of polydnavirus DNA in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology* 65, 6693–6704.
- Xu, D., Stoltz, D.B., 1993. Polydnavirus genome segment families in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology* 67, 1340–1349.
- Zalensky, A.O., Allen, M.J., Kobayashi, A., Brinkley, B.R., Bradbury, E.M., 1995. Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103, 577–590.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

**SÉQUENÇAGE DU GÉNOME DU
BRACOVIRUS DE *COTESIA*
*CONGREGATA***

Article 2

Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution

E. Espagne, C. Dupuy, E. Huguet, L. Cattolico, B. Provost, N. Martins, M. Poirié, G. Periquet et J.-M. Drezen.

Science (2004) 306:286-289.

CONTEXTE DE L'ARTICLE 2

Les données concernant la composition des génomes polydnaviraux se faisaient cruellement désirer au sein de la communauté scientifique, et on espérait trouver les réponses à plusieurs interrogations en entreprenant le séquençage de l'intégralité du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* contenu dans les particules virales injectées dans l'hôte *Manduca sexta* lors du parasitisme. Les 3 questions auxquelles on souhaitait répondre sont les suivantes :

- **Quelle est la nature du virus ancêtre à l'origine de l'association entre les hyménoptères braconidae et les bracovirus?**
- **Quels sont les mécanismes responsables des processus de réplication puis d'excision, lors du passage de la forme chromosomique du virus à la forme circulaire contenue dans les particules virales?**
- **Quelle est la nature des protéines de virulence impliquées dans la modification de la physiologie de l'hôte au cours du parasitisme?**

Le projet de séquençage de l'intégralité des cercles d'ADN bracoviraux contenus dans les particules virales de *Cotesia congregata* a été réalisé en collaboration avec le Centre National de Séquençage d'Evry (le Genoscope). Ce projet a débuté en 2000, au sein du laboratoire Génome et Stratégies Parasitaires de l'IRBI. Il a consisté à séquencer les cercles d'ADN double brin contenus individuellement dans chacune des nucléocapsides des particules virales présentes dans les cellules du calice des ovaires du parasitoïde (cf partie Présentation du modèle d'étude). A la suite du séquençage, il a fallu procéder à la vérification expérimentale de la validité des séquences théoriques, ainsi qu'à leur assemblage. Enfin, l'analyse informatique de ces séquences a permis l'annotation des séquences obtenues et l'identification du contenu génique du bracovirus.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Science en octobre 2004. Cet article récapitule les résultats innovants correspondant à l'aboutissement de ce projet de grande ampleur (cf article Annexe 1).

QUELQUES PRECISIONS D'ORDRE TECHNIQUE

Séquençage

Les cercles viraux d'ADN double brin ont été séquencés selon une stratégie Shotgun par le Centre National de Séquençage d'Evry (Annexe 2).

Afin de procéder au séquençage, 80 µg d'ADN du bracovirus de *Cotesia congregata* ont été purifiés. Cet ADN a été extrait après dissection de 10000 paires d'ovaires d'individus femelles de *Cotesia congregata* élevés au laboratoire. La purification de l'ADN bracoviral a été effectuée par filtration (SpinX Costar) puis selon le protocole d'extraction décrit par Beckage *et al* (1994) (cf Annexe 4). Après dilacération des ovaires, puis centrifugation, le culot contenant les débris tissulaires, cellulaires, et les oeufs a été écarté. Seul le surnageant contenant les particules virales a été conservé. Le traitement à la protéinase K a permis la digestion des protéines, puis l'ADN a été extrait au phénol-chloroforme. Enfin, l'ADN a été remis en suspension dans une solution de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM).

La première banque d'ADN viral réalisée n'étant pas exhaustive, les cercles d'ADN viral ont été amplifiés par l'ADN polymérase "rolling circle DNA" TempliPhi (Amersham Biosciences) par le mécanisme de cercle roulant, afin de réaliser une nouvelle banque.

Ensuite, 40 µg de cet ADN amplifié ont été coupés en fragments de différentes tailles (Genemachines hydroshear), puis séparés par gel préparatif d'agarose LPM (FMC). Les fragments d'ADN de 5 kb ont été élués avec de la beta-agarase (Biolabs) puis ligaturés dans le vecteur pcDNA2.1 (Invitrogen) préalablement digéré par *Bst*X I. La transformation a été effectuée dans la souche d'*Escherichia coli* électro-compétente DH10B (GIBCO-BRL). Les séquences des extrémités de 2000 clones ont été déterminées par les techniques de séquençage "dye primer" sur le séquenceur automatique LiCor 4200 ou "dye terminator" sur le séquenceur ABI 3700 (PE-Applied Biosystem).

Ensuite les séquences des extrémités de ces clones ont été assemblées en contigs (Annexe 2) grâce à l'utilisation des logiciels PHRED (Ewing & Green, 1998) et PHRAP (Green, non publié). Les brèches ou espaces vides entre les contigs ont été comblés et séquencés par la technique de Primer walking, et les séquences de qualité médiocre vérifiées par 2 techniques de séquençage à l'aide d'amorces spécifiques sur l'automate ABI 3700 et de "dye terminator" sur l'automate ABI 3730 (PE-Applied Biosystem).

La séquence consensus a été obtenue après l'analyse d'au moins 3 lectures de la séquence de chacun des brins, ou bien en utilisant des méthodes de séquençage basées sur les 2 techniques de marquage différentes ("dye primer" ou "dye terminator").

Le consensus des séquences a été validé quand au moins 98% des nucléotides ont été identifiés avec un score supérieur à 40 déterminé par le logiciel PHRAP.

Les séquences ont été soumises à des recherches des cadres ouverts de lecture (ORF) potentielles à l'aide du programme ORF finder, AAT et GENSCAN, puis à des recherches de domaines protéiques grâce à l'utilisation du logiciel MotifScan. Les séquences d'ADN codantes (CDS) ainsi déterminées ont été comparées aux séquences recensées dans les banques de gènes ou de protéines par les programmes Blast, afin de trouver d'éventuelles similarités. Les résultats des annotations des séquences des 30 cercles du bracovirus de *C. congregata* ont été reportés sur le génome en utilisant le logiciel d'annotation et de présentation des séquences d'ADN, Artemis (Sanger Centre).

Vérification de l'assemblage

Certaines solutions d'assemblage ont été rejetées lorsque le contenu en gènes des séquences d'un cercle présentait des redondances avec le contenu en gènes d'un autre cercle déjà déterminé.

La qualité de l'assemblage a ensuite été vérifiée par la cartographie d'un certain nombre de gènes appartenant au génome viral, par analyse en Southern blot de fragments d'ADN viraux digérés par différentes enzymes de restriction ou d'ADN de CcBV purifié séparé par FIGE.

Localisation des cercles par séparation de l'ADN de CcBV par FIGE puis Southern blot

Matériel et méthodes

La taille des cercles viraux a été vérifiée par hybridation de sondes correspondant à des marqueurs spécifiques, sur l'ensemble des cercles d'ADN purifié du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV) séparés par gel d'électrophorèse en champ inversés (FIGE).

Si on considère le cercle 1 de 27346 pb, 2 ORF (PTPI et PTPM), diamétralement opposées l'une par rapport à l'autre sur la séquence théorique du cercle, ont été choisies afin de vérifier l'assemblage de ce cercle.

L'ensemble des cercles viraux de 300 ng d'ADN purifié du bracovirus de *Cotesia congregata* a été séparé par FIGE. Cet ADN a été transféré sur membrane de nylon. Après vérification que les séquences des 2 sondes ne présentaient aucune similarité avec d'autres séquences virales déjà identifiées par le séquençage, les sondes spécifiques des 2 ORF ont été marquées au ^{32}P , puis hybridées avec deux pistes du même gel d'électrophorèse contenant 300 ng d'ADN viral.

Résultats

Le marqueur de poids moléculaire utilisé étant un marqueur linéaire et les molécules d'ADN testées étant circulaires, il faut tenir compte des propriétés de migration de l'ADN suivant sa conformation et c'est l'hybridation d'un ensemble molécules virales de taille différente qui nous a donné une échelle de correction. En effet, un cercle d'ADN viral migrera plus qu'une molécule d'ADN linéaire de la même longueur. Cette technique a permis de localiser les cercles 1, 4, 7, 8, 10, 14, 17, 19 et 26 sur l'ensemble du génome grâce à l'hybridation de sondes spécifiques de 7 CcBV PTP distinctes, 2 CcBV ank, de CcBV cyst1 ainsi que d'ORF ne présentant pas de similarité avec des séquences recensées dans les banques.

La localisation de ces différents cercles d'ADN double brin a ainsi permis d'établir des points de repères par rapport au marqueur linéaire utilisé (2.5 kb ladder, BioRad) comme référence lors des électrophorèses, et de définir une corrélation entre la migration des cercles d'ADN de CcBV et la migration des différentes molécules composant le marqueur.

Dans le cas présenté ici, le signal d'hybridation obtenu pour la sonde spécifique de CcBV PTPI est à la même hauteur que le signal d'hybridation obtenu pour la sonde spécifique de CcBV PTPM, De plus, le niveau de migration correspond à la taille théorique du cercle 1 de 27346 pb ce qui nous permet de conclure à la validité de la séquence théorique du cercle.

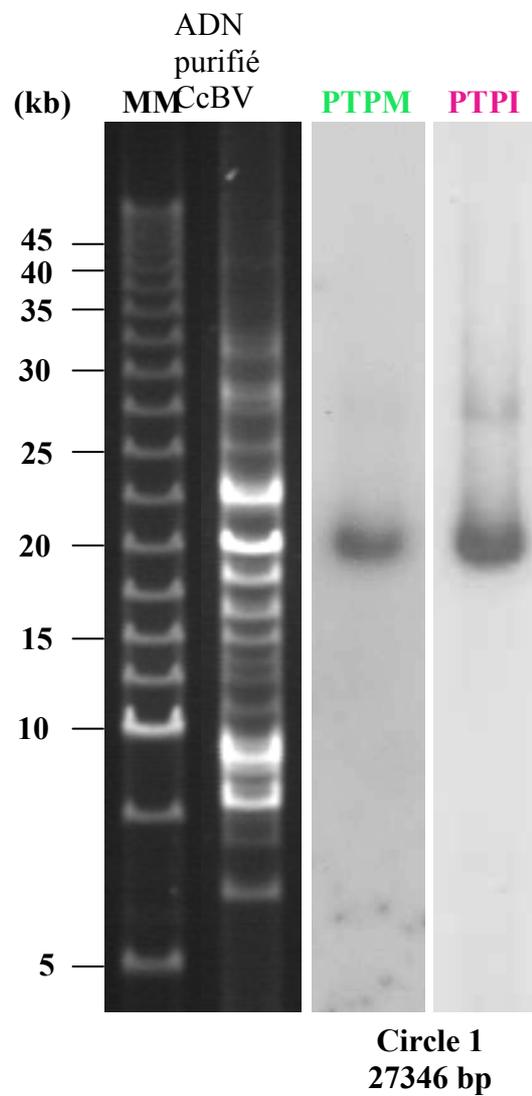
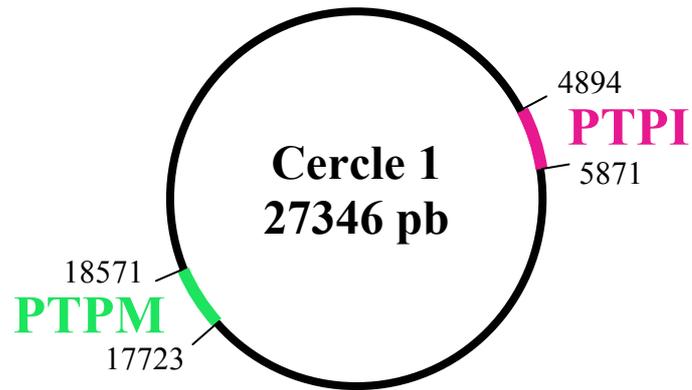


Figure 13 : vérification expérimentale de l'assemblage des cercles viraux.
Hybridation de 2 sondes spécifiques de 2 ORF (PTPI et PTPM) du cercle 1 sur 300 ng d'ADN purifié du bracovirus de *Cotesia congregata*.

Cartographie des cercles par électrophorèse de digestions enzymatiques de l'ADN de CcBV puis Southern blot

Matériels et méthodes

Après étude de la carte de restriction des séquences des cercles théoriques porteurs des gènes testés, pour chaque cercle, une série d'enzymes de restriction est sélectionnée, de telle façon que chacune de ces enzymes coupe de part et d'autre de la séquence du gène ou bien au milieu de la séquence du gène.

Tableau 3 : Enzymes de restriction utilisées pour la cartographie des cercles 1 et 10 et taille des fragments de restrictions porteurs des gènes CcBV PTPI et CcBV PTPN.

Gènes étudiés	Enzymes de restriction utilisées			
Cercle porteur (taille)	Taille des fragments générés (pb) porteurs du gène			
CcBV PTPI	BglII	NcoI	XbaI	
Cercle 1 (27346 pb)	17739	5469	2765	
CcBV PTPN	BamHI	XhoI	EcoRI	EcoRV
Cercle 10 (14286 pb)	14286	10995	7678	3521

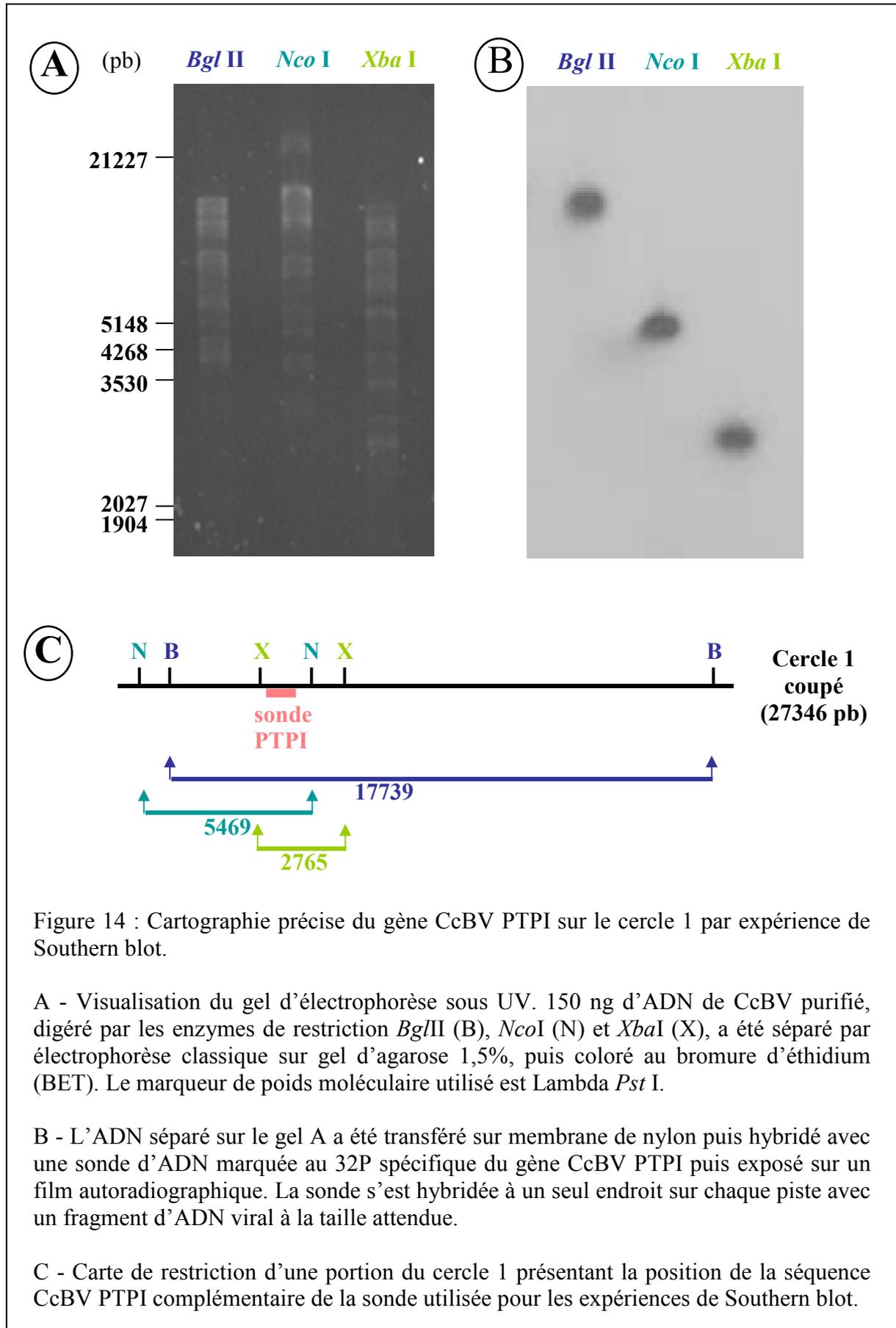
Trois cents nanogrammes d'ADN purifié du bracovirus de *Cotesia congregata* sont digérés par différentes enzymes de restriction (Promega) (Tab. 3). Ces digestions sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel d'agarose 0,5%. Après migration, l'ADN est transféré sur membrane de nylon (Biotrans ICN) en solution NaOH (Sambrook *et al* 1989) et hybridé avec des sondes d'ADN spécifiques de PTP de CcBV.

Les matrices d'ADN, utilisées pour synthétiser les sondes, sont amplifiées par PCR grâce aux amorces décrites dans le tableau 1 de l'article 3. Les produits d'amplification sont ensuite purifiés selon le protocole du kit de purification Qiaquick (Qiagen). La sonde (30 ng d'ADN) est marquée au ³²P grâce à l'utilisation du kit Random priming DNA labelling (Boehringer). L'ADN de CcBV digéré est hybridé avec cette sonde radioactive pendant 20 h à 65°C. Après hybridation, les membranes sont lavées dans différentes solutions de SSC 0,1% SDS, de concentrations de plus en plus stringentes en SSC: de 2x à 0,1x. Les membranes sont ensuite exposées sur un film autoradiographique (Biomax Kodak) pendant des durées variables en fonction de la quantité de radioactivité hybridée avec l'ADN présent sur la membrane.

Résultats

La localisation précise des gènes CcBV PTPI et CcBV PTPN sur leurs cercles respectifs a été vérifiée par les expériences de Southern blot après digestion de l'ADN viral purifié. Voici les résultats obtenus pour CcBV PTPI (Fig. 14) et CcBV PTPN (Fig. 15). Un signal unique d'hybridation a été obtenu pour chacune des digestions. La localisation de ce signal correspond à la taille attendue des fragments de restriction prédits. Ces résultats attestent de la spécificité des sondes pour les gènes étudiés (déjà confirmée par les expériences de FIGE puis de Southern blot pour la localisation des gènes sur l'ensemble du génome) et confirment expérimentalement la carte des cercles d'ADN double brin déterminée après l'assemblage du génome viral.

Ces analyses ont permis de valider expérimentalement l'assemblage réalisé par des méthodes informatiques et la qualité du séquençage.



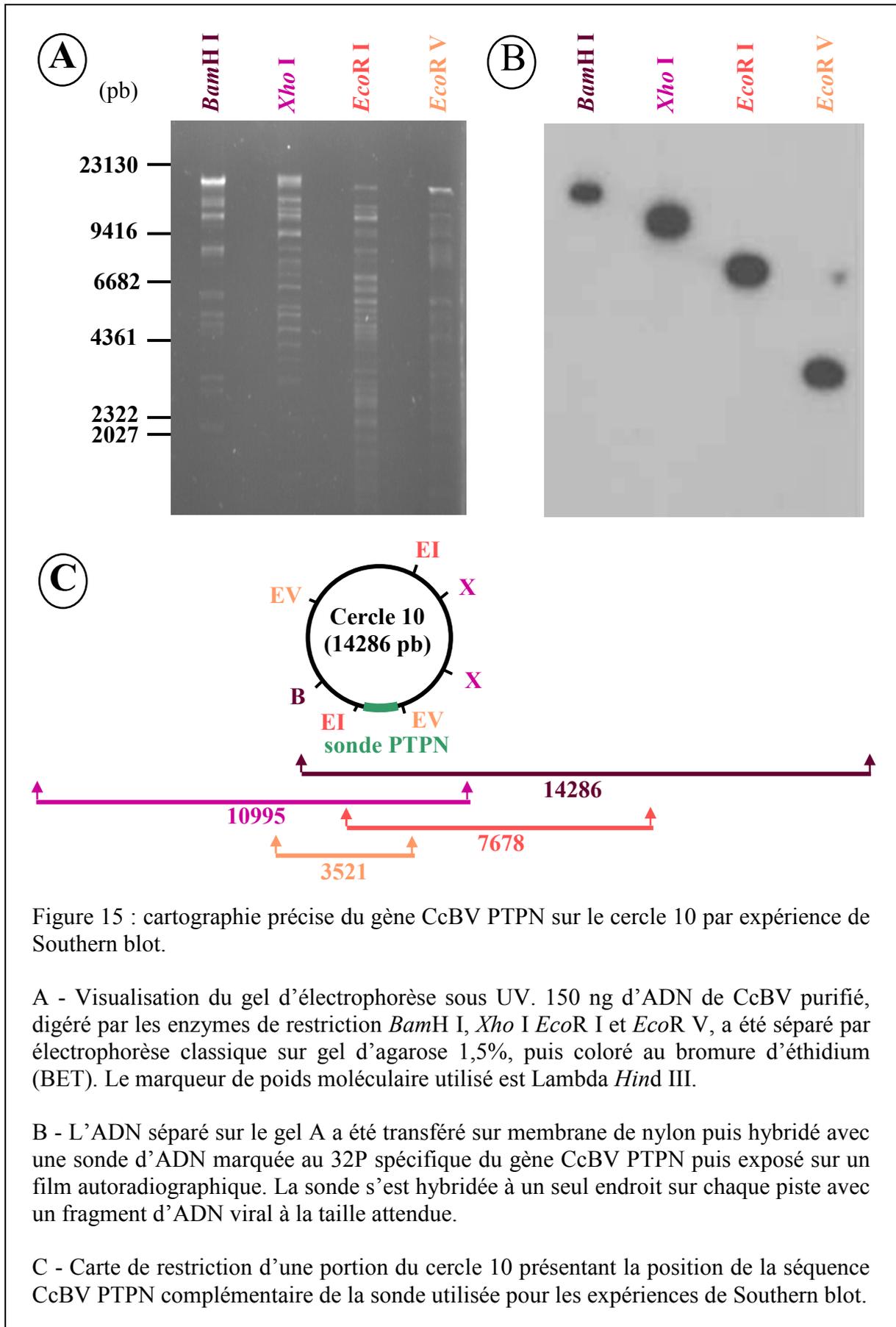


Figure 15 : cartographie précise du gène CcBV PTPN sur le cercle 10 par expérience de Southern blot.

A - Visualisation du gel d'électrophorèse sous UV. 150 ng d'ADN de CcBV purifié, digéré par les enzymes de restriction *BamH I*, *Xho I*, *EcoR I* et *EcoR V*, a été séparé par électrophorèse classique sur gel d'agarose 1,5%, puis coloré au bromure d'éthidium (BET). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est Lambda *Hind III*.

B - L'ADN séparé sur le gel A a été transféré sur membrane de nylon puis hybridé avec une sonde d'ADN marquée au ³²P spécifique du gène CcBV PTPN puis exposé sur un film autoradiographique. La sonde s'est hybridée à un seul endroit sur chaque piste avec un fragment d'ADN viral à la taille attendue.

C - Carte de restriction d'une portion du cercle 10 présentant la position de la séquence CcBV PTPN complémentaire de la sonde utilisée pour les expériences de Southern blot.

of tri- and tetrapeptides (Table 1, entry 10). When an excess of the oxidizing agent was used with phenylalanine thiocarbamate **2**, LC-MS established that a 63% yield of dipeptide was obtained in just 5 min, along with 13% tripeptide, 3% tetrapeptide, and traces of penta- and hexapeptide (Table 1, entry 11).

In experiments in which a mixture of L-serine (Ser, 50 mM) and the phenylalanine thiocarbamate **2** (25 mM) in CHES (400 mM, pH 9.0) were allowed to react, either in the presence of CdCl₂ (25 mM) or K₃Fe(CN)₆ (25 mM), a mixture of peptides was produced corresponding to Phe-Ser, Phe-Phe, Phe-Phe-Ser, and Phe-Phe-Phe. No homopolymers of serine were observed. In another experiment, a mixture of L-serine and L-phenylalanine was exposed to COS (Table 2, entry 4). In contrast to the previous reaction, Ser-Ser and Ser-Ser-Ser were produced, along with polymers of phenylalanine and mixed peptides (Fig. 1B). These observations strongly suggest that the activated α-aminoacyl compound derives from the thiocarbamate structure and that, once activation has occurred, peptide formation proceeds via nucleophilic attack by a second α-amino acid molecule on the in situ–formed NCA. The generality of the COS-mediated α-amino acid condensation reactions in the presence of Pb²⁺ was established with reaction mixtures containing equimolar mixtures of L-phenylalanine and either L-tyrosine, L-leucine, L-alanine, or L-serine (Table 2, fig. S5). In all reactions, efficient production of mixed dipeptides and tripeptides was observed.

Present-day levels of COS in volcanic gases have been reported up to 0.09 mol % (14). Because the gas hydrolyzes rapidly on a geological time scale, it is unlikely to have accumulated to a high concentration in the atmosphere. Thus, if COS was important in prebiotic chemistry, it is likely to have functioned in localized regions close to its volcanic sources. Although it may be unlikely that a substantial proportion of any amino acids present would have been converted to thiocarbamates, this would have been no obstacle to a “polymerization on the rocks” scenario (15, 16) in which peptides long enough to be irreversibly adsorbed near the source of the COS were subject to slow chain elongation. The direct elongation of peptide chains using COS as a condensing agent and the condensations catalyzed by Fe²⁺ or Pb²⁺ ions seem plausible as prebiotic reactions (17). The very efficient polymerizations brought about by oxidizing agents are more problematic as prebiotic reactions, but [Fe(CN)₆]³⁺ has been discussed as a potential prebiotic oxidizing agent (13).

It remains to be determined whether COS could have participated in prebiotic chemistry in other ways—for example, as an interme-

diate in the reduction of CO₂ (18, 19) and as a condensing agent in phosphate chemistry (20, 21).

References and Notes

- R. S. Dewey et al., *J. Org. Chem.* **36**, 49 (1971).
- C. Huber, G. Wächtershauser, *Science* **281**, 670 (1998).
- C. Huber, W. Eisenreich, S. Hecht, G. Wächtershauser, *Science* **301**, 938 (2003).
- Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
- COS is reported to dissolve in water at room temperature to give up to 20 to 30 mM solutions (6, 22).
- R. J. Ferm, *Chem. Rev.* **57**, 621 (1957).
- During the course of the reaction substantial quantities of H₂S are generated, for example, through the hydrolysis of COS. Attack of HS[−] on the NCA would generate α-amino thioacids that can participate in the formation of peptides and side products (23).
- The observed half-life of phenylalanine thiocarbamate **2** (25 mM in D₂O, pD 8.6) formed in situ from the amino acid and COS was 10 hours. In a separate NMR study using an authentic sample of **2** (50 mM in D₂O, pD 9.0), a hydrolysis half-life of ~20 hours was observed.
- Condensations of NCAs with free amino acids (100 mM each in borate buffer pH ≈ 10) at 4°C are typically complete in less than 2 min (1, 24).
- Metal ions that might be present as impurities in the sample are not required for condensation, as demonstrated by formation of product in the presence of the metal chelator EDTA (Table 1, entry 4).
- R. Liu, L. E. Orgel, *Nature* **389**, 52 (1997).
- J. F. Kasting, L. L. Brown, in *The Molecular Origins of Life*, A. Brack, Ed. (Cambridge Univ. Press, New York, 1998), pp. 35–56.

- A. D. Keefe, S. L. Miller, *Origins Life Evol. Biosphere* **2**, 111 (1996).
- R. B. Symonds, W. I. Rose, G. J. S. Bluth, T. M. Gerlach, *Rev. Mineral.* **30**, 1 (1994).
- L. E. Orgel, *Origins Life Evol. Biosphere* **28**, 227 (1998).
- A. R. Hill Jr., C. Bohler, L. E. Orgel, *Origins Life Evol. Biosphere* **28**, 235 (1998).
- Alternative potentially prebiotic condensing agents with relatively high efficiency are inorganic polyphosphates (25, 26).
- W. Heinen, A. M. Lauwers, *Origins Life Evol. Biosphere* **2**, 131 (1996).
- D. R. Herrington, P. L. Kuch, U.S. Patent 4,618,723 (1986).
- W. C. Buringh, U.S. Patent 3,507,613 (1970).
- J.-P. Biron, R. Pascal, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9189 (2004).
- U.S. Environmental Protection Agency, *Chemical Summary for Carbonyl Sulfide* (Publication 749-F-94-009a, Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1994; www.epa.gov/chemfact/s_carbns.txt).
- T. Wieland, K. E. Euler, *Chem. Ber.* **91**, 2305 (1958).
- R. Hirschmann et al., *J. Org. Chem.* **32**, 3415 (1967).
- Y. Yamagata, H. Watanabe, M. Saitoh, T. Namba, *Nature* **352**, 516 (1991).
- J. Rabinowitz, J. Flores, R. Kresbach, G. Rogers, *Nature* **224**, 795 (1969).
- We thank NASA Astrobiology Institute and NASA Exobiology (NAG5-12160) for financial support. L.L. is the recipient of an NSF Predoctoral Fellowship.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5694/283/DC1

Materials and Methods

Figs. S1 to S5

Reference

13 July 2004; accepted 25 August 2004

Genome Sequence of a Polydnavirus: Insights into Symbiotic Virus Evolution

Eric Espagne,^{1*†} Catherine Dupuy,^{1†‡} Elisabeth Huguet,¹ Laurence Cattolico,² Bertille Provost,¹ Nathalie Martins,² Marylène Poirié,¹ Georges Periquet,¹ Jean Michel Drezen¹

Little is known of the fate of viruses involved in long-term obligatory associations with eukaryotes. For example, many species of parasitoid wasps have symbiotic viruses to manipulate host defenses and to allow development of parasitoid larvae. The complete nucleotide sequence of the DNA enclosed in the virus particles injected by a parasitoid wasp revealed a complex organization, resembling a eukaryote genomic region more than a viral genome. Although endocellular symbiont genomes have undergone a dramatic loss of genes, the evolution of symbiotic viruses appears to be characterized by extensive duplication of virulence genes coding for truncated versions of cellular proteins.

Once regarded as a rare biological event, symbiosis is now known to be central to the

origin of eukaryotic cellular organelles. The genomes of mitochondria and plastids are known to be dramatically reduced compared with those of their ancestors—free-living bacteria (1). There are also examples of viral symbionts, but almost nothing is known about the genome rearrangements these have undergone during their evolution.

Polydnaviruses (PDVs) are used by parasitoid wasps to facilitate development of their progeny within the body of immunocompetent insect hosts, which are typically lepidopteran larvae (2). Viral particles are produced in the

¹Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, CNRS UMR 6035, UFR Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France. ²Genoscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, 91057 Evry, France.

*Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, Bat. 400, 91405 Orsay cedex, France.

†These authors contributed equally to this work.

‡To whom correspondence should be addressed. E-mail: catherine.dupuy@univ-tours.fr

wasp ovaries and are injected via the wasp ovipositor into the insect host along with the parasitoid eggs (2). Viral gene products act by manipulating host immune defenses and development, thereby ensuring the emergence of adult parasitoid wasps (3). Unlike most viruses, polydnviruses are not transmitted by infection, because no virus replication occurs in parasitized host tissues. They are exclusively inherited as an endogenous “provirus” integrated in the wasp genome (4–6).

The Polydnviridae are a unique insect virus family on the basis of the molecular features of their genome and of their obligate association with endoparasitoid wasps (7, 8). They are composed of two genera, bracoviruses and ichnoviruses, associated with braconid and ichneumonid wasps, respectively, with distinct evolutionary origins (2). Bracovirus-bearing species have a common ancestor (9). The classical hypothesis is that bracoviruses originate from an “ancestor virus” initially integrated into the genome of the ancestor wasp species that lived 73.7 ± 10 million years ago (10).

Several PDV genes expressed in parasitized host tissues have been isolated from various wasp species but the organization and content of PDV genomes are largely unknown (11). Here, we present the complete nucleotide sequence of the bracovirus (CcBV) injected by the wasp *Cotesia congregata* into its lepidopteran host *Manduca sexta*.

With a full length of 567,670 base pairs (bp), the CcBV genome (Table 1) is one of the largest viral genomes sequenced so far (11). The segmented genome is composed of 30 DNA circles ranging from 5 to 40 kb and contains 156 coding DNA sequences (CDSs) (Fig. 1). The overall sequence displays a strong bias toward A-T content (66%), and more than 70% of the sequence corresponds to noncoding DNA. The circles encode at least one gene (with the exception of a single noncoding circle), and the percentage of potential coding sequences varies from 7.4 to 53.9% depending on the circle, a gene density that is markedly different from the highly compact structure of a “classical” virus genome. Unlike most viral genes, many CcBV genes contain introns (69%), and

42.3% of putative CDSs have no similarity to previously described genes (Fig. 2). Another unique feature of the CcBV genome, compared with classical viruses, is the abundance of gene families: 66 genes (42.5%) are organized in nine families (Table 2). It is noteworthy that the proteins encoded by four of these gene families contain highly conserved domains previously described in virulence factors used by bacterial pathogens or parasitic nematodes.

The largest CcBV gene family comprises 27 genes encoding protein tyrosine phosphatases (CcBV PTP). PTPs are known to play a key role in the control of signal transduction pathways by dephosphorylating tyrosine residues on regulatory proteins (12). We recently identified PTPs in bracoviruses of two distantly related braconid subfamilies (13) (Table 2), which suggests that they constitute a common component of bracovirus genomes. Bracovirus PTPs share significant similarity with cellular PTPs, but they are not homologous to baculovirus or poxvirus PTPs, which counters the hypothesis that bracoviruses originated from baculoviruses as initially suspected (14). Note that some bacterial pathogens, such as *Yersinia pestis*, inhibit host macrophage phagocytosis by injecting PTPs that interfere with the signal transduction pathways controlling actin cytoskeleton dynamics (15). In response to the injection of a foreign body, insect hosts enclose it in a cellular sheath of hemocytes in an encapsulation process that requires adherence, spreading, and attachment of immune cells. Like pathogenic

bacteria, parasitoid wasps may inhibit the cytoskeleton dynamics of immune cells using viral PTPs and thus may prevent encapsulation of parasitoid eggs.

The second largest CcBV gene family (CcBV *ank*) comprises six genes encoding proteins with ankyrin repeat motifs. These proteins belong to the I κ B family (16), whose members are inhibitors of nuclear factor κ B (NF- κ B)/Rel transcriptional factors, implicated in vertebrate and *Drosophila* immune responses (17). As reported recently for other PDVs, CcBV Ank proteins lack the regulatory elements associated with the basal degradation of I κ B proteins. Normally, proteolysis of the inhibitor of nuclear factor κ B (I κ B) releases NF- κ B/Rel, sequestered in the cytoplasm by I κ B, to translocate to the nucleus and to initiate transcription of immune response genes (17). A similarly truncated I κ B-like protein is used by a poxvirus (the African swine fever virus) to inhibit the vertebrate immune response (18). The truncated forms of the six CcBV Ank proteins may play the same role in lepidopteran hosts.

The third gene family encodes for four predicted cysteine-rich proteins (CcBV *crp*) containing a particular cysteine knot motif (19). A similar protein—teratocyte secreted protein 14 (TSP 14)—is encoded by a cellular gene of a braconid wasp species (20). The TSP14 protein is secreted by teratocytes (i.e., wasp cells circulating within the host’s hemolymph) and, notably, inhibits storage protein synthesis. CcBV Crp proteins may also inhibit translation of storage proteins, such as arylphorin, the level of

Table 1. Genomic features of CcBV (*Cotesia congregata* bracovirus).

Genomic features	Complete genome
Length (bp)	567670
A+T ratio (%)	66.05
Percent coding sequence	26.9
tRNA coding genes	7
Predicted genes encoding proteins	156
Genes with functional assignments	42
LTR and transposons	10

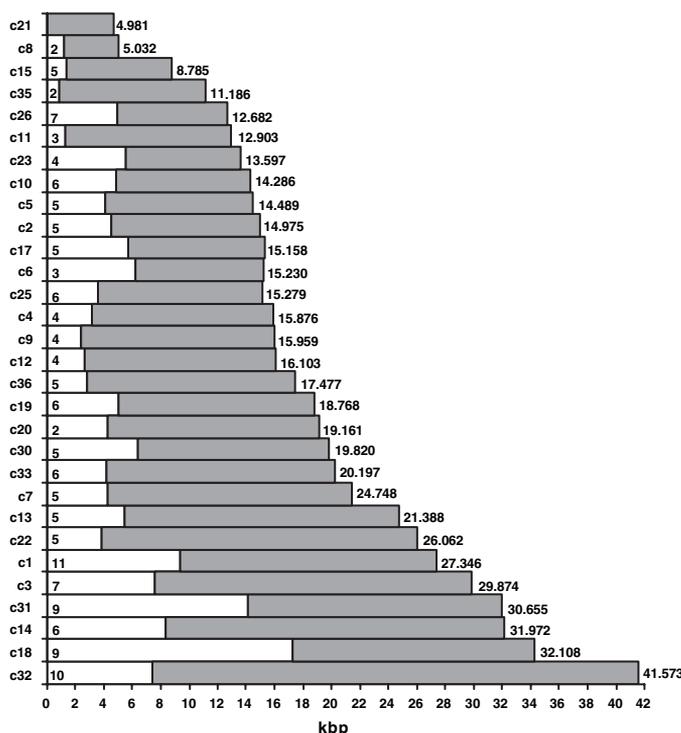


Fig. 1. Graphical representation of the gene distribution for each CcBV circle. Each circle is represented by a bar. Areas in white represent the length of the coding sequence, with the number of coding sequences indicated in black. Areas in gray represent non-coding sequences. The total length of each circle (bp) is indicated in black.

which is dramatically decreased in the hemolymph of parasitized *Manduca sexta* (21). Selective disruption of host protein translation is thought to redirect host metabolism to support endoparasite growth and development.

The fourth gene family encodes three cysteine protease inhibitors (CcBV *cyst*) of the cystatin superfamily. Cystatins have been described in a variety of organisms (22) but have apparently not previously been found in viruses (23). Interestingly, cystatins are also secreted by parasitic filarial nematodes and account for a major part of their immunosuppressive activity (24).

The products of the five other gene families do not contain any conserved domains that would allow prediction of their function (Fig. 2). Two genes are only known

from *Cotesia congregata* bracovirus (CcBV *hypothetical1* and CcBV *hypothetical2* families), and the other three families contain genes described in viruses associated with other *Cotesia* species (25) (CcBV *EP1-like*, CcBV *family1*, CcBV *family2*). Most of these genes are expressed in the host tissues—the EP1 protein, for example, can account for 10% of the hemolymph protein content in parasitized hosts (26)—and presumably are required for successful parasitism.

The complex genome of CcBV devotes at least 26% of its CDS to potential virulence factors. Several genes probably originate from duplication events, resulting in multiple multigenic families consisting of up to 27 genes and constituting almost half the CDS. Such gene diversification may have facilitated the radiation of the bracovirus-bearing wasp

complex, which now consists of 17,500 species (9). Strikingly, CcBV *ank* and CcBV *PTP* resemble truncated versions of cellular genes. Cysteine-knot motif genes have not only been described in PDV genomes, but also in the genome of a braconid wasp (*Microplitis croceipes*) (20). Finally, some of the CcBV genes, such as cystatin and histone H4 genes, have apparently not yet been described previously in viral genomes, which suggests that some of the PDV genes have been acquired from the cellular genome. Gene transfer may have occurred into the chromosomally integrated form of the virus, after recombination or transposition events.

Apart from the abundance of virulence factors, the CcBV genome lacks CDS with significant similarity to other virus genes. There are remnants of genes from retrovirus-like elements, but only three genes share significant similarities with sequences from free replicating viruses. Two putative proteins have a significant similarity with a baculovirus protein (48% similarity with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus gp94) nonessential for infectivity (27). A third protein shows significant similarity (39.9%) to a hypothetical protein from *Spodoptera frugiperda* ascovirus 1 (SfAV1), a member of a family of lepidopteran-infecting viruses (28).

Unexpectedly, the bracovirus genome does not contain any set of genes that offers a hallmark for a known virus family. The paucity of “virus-like” genes may be partly explained by the selection pressures acting on PDVs. The genes involved in the production of virus particles do not have to be present on the DNA injected into insect hosts, because virus particles’ replication is restricted to wasp ovaries. The demonstration that the p44 gene encoding a structural protein of the *Campoletis sonorensis* ichnovirus is amplified in female wasps undergoing virus

Fig. 2. Classification of the 156 genes identified in the CcBV genome: 42.3% of the genes encode proteins showing no similarity to proteins in databanks (in white); 42.5% of the genes are organized in nine multigenic families (indicated with different colors). In blue are shown genes encoding proteins with well-known conserved domains (PTPs, protein tyrosine phosphatases; *ank*, ankyrin; *crp*, cysteine-rich proteins; *cyst*, cystatins). In orange are shown gene families specific of CcBV (*hp1* and *hp2*: hypothetical 1 and 2). In green are shown gene families common to other species of the *Cotesia* genus. Of the genes, 3.2% are single genes encoding proteins that are homologous to “bracovirus proteins” (hatched green); 1.9% (hatched gray) correspond to the three genes encoding proteins with viral structural domains and 3.8% to the genes that resemble retrovirus-like elements (hatched pink). In dotted-line gray are shown 6.4% of the genes encoding proteins that have similarity with proteins in hypothetical databanks.

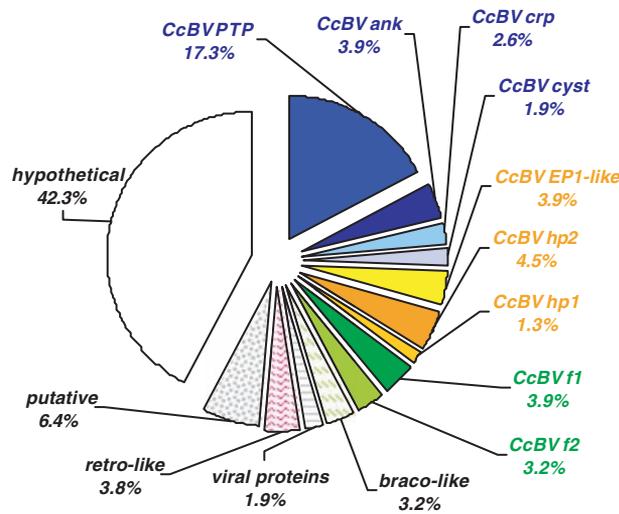


Table 2. Features of the CcBV gene families. The features of each gene family are detailed with the circle (C) localization of each gene and the number of related genes on each circle. The average % of similarity of the related proteins are indicated for each gene family. Other PDVs containing such

families are indicated. GiBV, *Glyptapanteles indiensis* bracovirus; CsiV, *Campoletis sonorensis* ichnovirus; MdBV, *Microplitis demolitor* bracovirus; HflV, *Hyposoter fugitoides* ichnovirus; TnBV, *Toxoneuron nigriceps* bracovirus; CkBV, *Cotesia kariyai* bracovirus; CgBV, *Cotesia glomerata* bracovirus.

Parameter	CcBV families								
	PTP	ank	crp	cyst	EP1-like	hp1	hp2	f1	f2
Number of related genes	27	6	4	3	6	2	7	6	5
Circle no.: no. of related genes	C1:8 C4:2 C7:1 C10:5 C14:3 C17:5 C26:3	C11:1 C14:2 C15:1 C26:2	C18:2 C32:1 C35:1	C19:3	C1:3 C5:1 C7:1 C8:1	C30:1 C18:1	C3:1 C6:1 C9:1 C20:1 C23:1 C25:1 C33:1	C9:2 C23:1 C25:1 C33:2	C19:3 C25:1 C30:1
Percent similarity	<5	19.49	13.79	75	16.34	63.28	33	41.48	75.14
PDVs in which similar gene families are found	GiBV TnBV	CsiV HflV TnBV MdBV	CsiV CgBV MdBV	None	CkBV	None	None	CkBV GiBV	CkBV

replication, but is not encapsidated, lends support to this hypothesis (29).

The idea that all the genes involved in viral DNA replication and virion production have been transferred to the wasp genome is nevertheless difficult to sustain. A more parsimonious hypothesis would be that bracoviruses do not originate from any of the large genome viruses characterized to date (30). They may have been built up from a simple system producing circular DNA intermediates, such as mobile elements, within the wasp genome. The acquisition of a capsid protein, possibly of viral origin, around the circular DNA intermediates would have allowed infection of lepidopteran cells. Finally, virulence genes could have been acquired from the wasp genome at different times during evolution of bracovirus-bearing wasp lineages, thus explaining why CcBV genes encoding proteins with a predicted function resemble cellular genes.

From their genome content, bracoviruses can be discerned as biological weapons directed by the wasps against their hosts. The wasp strategy for delivery of bracovirus genes could inspire medical applications for gene therapy, whereas PDV virulence factors are of interest in agriculture. Currently, a parasitoid gene is already in use in pest-control studies: TSP 14-producing transgenic plants significantly reduce *Manduca sexta* larvae growth and development (31). Cystatins also have pesticide activity, because when expressed in transgenic plants, they

can reduce the growth of nematodes (32). Other potential virulence factors encoded by PDV genomes may also serve as a source of natural molecules with insecticide activity of high specificity (33).

References and Notes

1. S. D. Dyall, M. T. Brown, P. T. Johnson, *Science* **304**, 253 (2004).
2. M. Turnbull, B. A. Webb, *Adv. Virus Res.* **58**, 203 (2002).
3. N. E. Beckage, *Parasitology* **116** (Suppl.), S57 (1998).
4. D. B. Stoltz, *J. Gen. Virol.* **71**, 1051 (1990).
5. E. Belle et al., *J. Virol.* **76**, 5793 (2002).
6. J.-M. Drezén et al., *J. Insect Physiol.* **49**, 407 (2003).
7. D. B. Stoltz, P. Krell, M. D. Summers, S. B. Vinson, *Intervirology* **21**, 1 (1984).
8. B. A. Webb et al., in *Virus Taxonomy*, M. H. V. Van Regenmortel et al., Eds. (Academic Press, San Diego, 2002), pp. 253–260.
9. J. B. Whitfield, *Naturwissenschaften* **84**, 502 (1997).
10. J. B. Whitfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7508 (2002).
11. J. A. Kroemer, B. A. Webb, *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 431 (2004).
12. J. N. Andersen et al., *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7117 (2001).
13. B. Provost et al., *J. Virol.*, in press.
14. J. B. Whitfield, *Parasitol. Today* **6**, 381 (1990).
15. F. Deleuil, L. Mogemark, M. S. Francis, H. Wolf-Watz, M. Fallman, *Cell. Microbiol.* **5**, 53 (2003).
16. S. Ghosh, M. J. May, E. B. Kopp, *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225 (1998).
17. M. S. Dushay, B. Asling, D. Hultmark, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10343 (1996).
18. Y. Revilla et al., *J. Biol. Chem.* **273**, 5405 (1998).
19. J. Einerwold, M. Jaseja, K. Hapner, B. A. Webb, V. Copie, *Biochemistry* **40**, 14404 (2001).
20. D. L. Dahlman et al., *Insect Mol. Biol.* **12**, 527 (2003).
21. N. E. Beckage, M. R. Kanost, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 643 (1993).
22. M. Abrahamson, M. Alvarez-Fernandez, C. M. Nathanson, *Biochem. Soc. Symp.* **70**, 179 (2003).
23. E. Espagne et al., in preparation.
24. P. Schierack, R. Lucius, B. Sonnenburg, K. Schilling, S. Hartmann, *Infect. Immun.* **71**, 2422 (2003).
25. T. Teramoto, T. Tanaka, *J. Insect Physiol.* **49**, 463 (2003).
26. S. H. Harwood, A. J. Grosovsky, E. A. Cowles, J. W. Davis, N. E. Beckage, *Virology* **205**, 381 (1994).
27. R. J. Clem, M. Robson, L. K. Miller, *J. Virol.* **68**, 6759 (1994).
28. K. Staziak, M. V. Demattei, B. A. Federici, Y. Bigot, *J. Gen. Virol.* **81**, 3059 (2000).
29. L. Deng, D. B. Stoltz, B. A. Webb, *Virology* **269**, 440 (2000).
30. L. M. Iyer, L. Aravind, E. V. Koonin, *J. Virol.* **75**, 11720 (2001).
31. I. B. Maiti et al., *Plant Biotechnol. J.* **1**, 209 (2003).
32. P. E. Urwin, M. J. McPherson, H. J. Atkinson, *Planta* **204**, 472 (1998).
33. N. E. Beckage, D. B. Gelman, *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 299 (2004).
34. This work was supported by the European Community program "Bioinsecticides from Insect Parasitoids" (QLK3-CT-2001-01586). The authors thank A. Bézier and J. Hericourt for useful suggestions; C. Ménoret and J. Dérisson for insect rearing; and N. Beckage for early contribution to the project. Genome circle sequences have been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers (to circle 1 to 36 respectively): AJ632304; AJ632305; AJ632306; AJ632307; AJ632308; AJ632309; AJ632310; AJ632311; AJ632312; AJ632313; AJ632314; AJ632315; AJ632316; AJ632317; AJ632318; AJ632319; AJ632320; AJ632321; AJ632322; AJ632323; AJ632324; AJ632325; AJ632326; AJ632327; AJ632328; AJ632329; AJ632330; AJ632331; AJ632332; AJ632333.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/306/5694/286/DC1

Materials and Methods
References and Notes

21 July 2004; accepted 26 August 2004

Turn
a new
page
to...

www.sciencemag.org/books

Science
Books et al.
HOME PAGE

- ▶ the latest book reviews
- ▶ extensive review archive
- ▶ topical books received lists
- ▶ buy books online

Science Supporting Online Material

Genome Sequence of a Polydnavirus: Insights into Symbiotic Virus Evolution

Eric Espagne, Catherine Dupuy, Elisabeth Huguet, Laurence Cattolico, Bertille Provost,
Nathalie Martins, Marylène Poirié, Georges Periquet, Jean Michel Drezen

doi:10.1126/science.1103066

Sequencing strategy: CcBV dsDNA circles were sequenced using a shot gun strategy. Virus particles were purified by filtration (spinX Costar) from 6000 female wasp ovaries from the laboratory strain of *Cotesia congregata*. Virus DNA was extracted as previously described (SI) and amplified using the rolling circle DNA polymerase TempliPhi (Amersham Biosciences). About 40 µg of DNA was sheared (Genemachines hydroshear) and the resulting fragments were separated on preparative LPM agarose gel (FMC). DNA fragments of about 5 kb were eluted using beta-agarase (Biolabs) and ligated to the *Bst*XI-digested pcDNA2.1 vector (Invitrogen). The transformation step was performed in electro-competent bacteria of the *Escherichia coli* strain DH10B (GIBCO-BRL). Sequence reads of 2000 subclone ends were performed using dye primer sequencing on a LiCor 4200 or dye terminator sequencing on an ABI 3700 (PE-Applied Biosystem).

The sequences were assembled into contigs using PHRED (*) and PHRAP (P. Green, unpubl.) softwares. The gaps between the contigs were filled using primer walking, and poor quality sequences were improved using specific primers and dye terminator sequencing on automated ABI 3700 and ABI 3730 sequencers (PE-Applied Biosystem).

Consensus sequences were considered as valid when at least 98% of the nucleotides were base-called with a PHRAP score above 40. The consensus sequence was obtained after analysis of at least 3 sequence reads on both strands, or using sequencing methods based on two different labelling procedures applied on one strand.

Data analysis: following sequencing, putative protein-coding regions were predicted. The predicted Annotation was managed using the Artemis software (www.ac.uk/software) which provided a convenient environment to display the gene structure and organization of the PDV large segmented genome. For each circle, tRNA and Coding DNA Sequences (CDS) were

annotated. DNA sequences were compared with repetitive DNA elements and protein data sets using the Ricegaas server (S2) and ORNL Genome Analysis Pipeline (<http://compbio.ornl.gov/GP3/euk.shtml>). The CDS annotation was corrected and refined by comparison with the CDS prediction obtained with the GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) and AAT softwares (<http://genome.cs.mtu.edu/aat.html>). In addition, circles were scanned for CDS or ORF larger than 100 pb, not defined previously, using the ORF Finder server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Each putative protein was analyzed by comparison with databases using BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tool) (S3) and MotifScan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>).

Reference and notes

- S1. N. E. Beckage, F. Tan, K. W. Schleifer, R. D. Lane, L. L. Cherubin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **26**,165 (1994).
- S2. K. Sakata, *Nucleic Acids Res.* **1**, 98 (2002).
- S3. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **5**, 403 (1990).

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ARTICLE 2, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Caractéristiques et organisation du génome du bracovirus symbionte de *Cotesia congregata*

La séquence nucléotidique complète du bracovirus de *Cotesia congregata* telle qu'elle est injectée dans l'hôte lépidoptère est maintenant connue.

Cette séquence a une longueur totale de 567670 pb, est composée de 30 cercles d'ADN double brin, dont les tailles sont comprises entre 5 et 40 kb, et contient 156 séquences codantes (CDS). L'ensemble de la séquence présente un fort biais en faveur du pourcentage en AT puisque celui-ci est de 66%, et même de 70% parmi les séquences non-codantes.

Tous les cercles portent au moins une séquence codante (à l'exception du cercle 21), et l'ensemble de ces séquences représente entre 7,4 et 53,9% de la séquence totale suivant les cercles considérés. La plupart des gènes (69%) du bracovirus de *Cotesia congregata* présentent un intron. De façon surprenante, cette faible densité de gènes et le fort pourcentage de gènes possédant un intron sont des caractéristiques différentes de celles habituellement rencontrées dans les génomes de virus classiques. Parmi les CDS potentielles, 42,3% d'entre elles ne présentent aucune similarité avec des gènes préalablement décrits.

Familles multigéniques

Le génome de ce virus est original par l'abondance de familles multigéniques qu'il contient. En effet, 42,5% des gènes (66) sont organisés en 9 familles multigéniques, dont 4 correspondent à des gènes possédant des domaines conservés de facteurs de virulence utilisés par des bactéries pathogènes ainsi que des nématodes parasites.

Protéines tyrosines phosphatases

La plus importantes de ces familles multigéniques est celle des protéines tyrosines phosphatases (*CcBV PTP*) représentée par 27 gènes. Ces protéines jouent un rôle important dans la régulation des voies de transduction de signaux en déphosphorylant les résidus tyrosine des protéines régulatrices.

Des PTP ont été identifiées dans le génome d'un autre bracovirus, suggérant que ces protéines sont communes aux génomes des bracovirus (cf partie Familles multigéniques, PTP).

Par contre, les PTP de CcBV ne présentent aucune similarité avec les PTP des baculo- ou des poxvirus, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de l'origine évolutive selon laquelle un baculovirus serait l'ancêtre des bracovirus.

La bactérie pathogène, *Yersinia pestis*, inhibe la phagocytose chez son hôte par injection de PTP qui modifient la dynamique du cytosquelette des macrophages. Comme cette bactérie, les CcBV PTP pourraient être responsables de l'inhibition des propriétés d'adhésion et d'étalement des hémocytes, nécessaires à la réaction d'encapsulation.

Ankyrines

La deuxième famille multigénique est composée de 6 gènes codant pour des protéines de la famille IκB contenant un motif à répétitions ankyrine (*CcBV Ank*). Les protéines cactus de la drosophile (homologue de IκB des mammifères) sont des inhibiteurs du facteur de transcription nucléaire Rel (homologue de NF-κB des mammifères) impliquées dans la réponse immunitaire de la drosophile (voie Toll cf partie IA3). Lorsque la voie Toll est inactivée, les protéines cactus et Rel forment un complexe qui sera dissocié lors de l'activation de la voie. Le facteur de transcription Rel est alors transloqué dans le noyau de la cellule où il active la synthèse de peptides de l'immunité de la drosophile. Le fait que les CcBV Ank soient dépourvues d'un élément régulateur responsable de la dégradation de cactus libérant le facteur de transcription, et qu'un poxvirus et un asfivirus utilisent une protéine tronquée similaire afin de contrer la réponse immunitaire de leur hôte vertébré suggère que les CcBV Ank sont susceptibles de jouer un rôle équivalent au cours du parasitisme (cf partie Familles multigéniques, Ankyrines).

Protéines riches en cystéines

La troisième famille de gènes code pour 4 protéines riches en cystéines (*CcBV crp*). Une protéine similaire, sécrétée par les tératocytes d'un autre braconidé, inhibe la synthèse des protéines de stockage de l'hôte. Les produits des gènes de CcBV crp pourraient être à l'origine de la diminution considérable du taux de protéine de stockage, telle que

l'arylphorine, dans l'hémolymphe de *M. sexta* parasitée (Beckage & Kanost 1993), entraînant un détournement du métabolisme de l'hôte au profit du développement des parasitoïdes.

Cystatines

La quatrième famille de gènes code pour des inhibiteurs de cystéine protéase (CcBV *cyst*) appartenant à la famille des cystatines. Les cystatines n'ont été décrites dans aucun autre génome viral, produites par les nématodes parasites (filaires) elles inhibent la réponse immunitaire des mammifères.

Autres familles de gènes

Les produits des 5 autres familles de gènes ne présentent aucune similarité avec des protéines conservées, ce qui ne laisse pas présager de leur fonction. Par contre, 2 familles de gènes sont spécifiques au génome de CcBV (*CcBV hp1* et *CcBV hp2*), et les 3 dernières familles (*CcBV EPI-like*, *CcBV family1* et *CcBV family2*) regroupent des gènes identifiés dans des génomes de bracovirus associés à d'autres espèces de *Cotesia*. Ces gènes sont presque tous exprimés dans les tissus de l'hôte parasité, laissant supposer un rôle au cours du parasitisme.

Hypothèses évolutives

Au moins un quart des CDS du génome de CcBV code pour des facteurs de virulence. Il est probable qu'un grand nombre de ces gènes doivent leur existence à des événements de duplication (*CcBV PTP* et *CcBV Ank*). La multiplicité et la variété de ces gènes ayant peut-être favorisé l'expansion du complexe des hyménoptères porteurs de bracovirus, comptant aujourd'hui 17500 espèces. D'autres gènes (*CcBV cyst*) ont probablement été acquis par le génome bracoviral suite à des événements d'acquisition à partir de génomes cellulaires.

Mis à part ce nombre important de facteurs de virulence, le génome de CcBV est très pauvre en CDS présentant des similarités importantes avec des gènes viraux classiques. Ce défaut de gènes présentant des similarités avec des séquences virales peut être attribué à une pression de sélection due au fait que la réplication virale a lieu exclusivement dans les ovaires

de l'hyménoptère, par conséquent, les gènes de CcBV impliqués dans la réplication ne sont pas présents dans les particules virales.

L'hypothèse évolutive selon laquelle les bracovirus ont pour origine l'intégration d'un virus à grand génome de type baculovirus, suivie du transfert au sein du génome de l'hyménoptère de tous les gènes impliqués dans la réplication est difficile à maintenir du fait de la rareté en gènes de baculovirus restant dans les particules. Une hypothèse plus parcimonieuse serait d'admettre qu'à l'origine, un système relativement simple a été intégré ; le CcBV pourrait provenir de l'acquisition d'un système de production de cercles d'ADN, tel que des éléments mobiles. L'acquisition, autour de ces séquences précurseurs de cercles, de gènes viraux de capsid a pu avoir lieu, permettant l'infection des cellules de l'hôte. Enfin, des gènes de virulence ont pu être capturés à partir du génome de l'hyménoptère, au cours de l'évolution, ce qui expliquerait les similarités des gènes de CcBV avec des gènes cellulaires.

Intérêts agronomiques et médicaux

En terme d'applications médicales et agronomiques, ce modèle semble intéressant à plusieurs titres : le mode de libération des gènes viraux dans l'hôte pourrait être une source d'inspiration en thérapie génique. Ce système est un modèle naturel dont on peut s'inspirer en thérapie génique afin de créer des pseudo-particules virales permettant de faire pénétrer une séquence codante dans un type cellulaire où elle sera exprimée, et les facteurs de virulence contrôlant la physiologie de certains insectes pourrait souffler des idées pour le contrôle de ravageurs. En effet, si une protéine d'origine bracovirale est identifiée comme étant responsable de l'inhibition du développement de l'hôte, cette protéine pourrait représenter un intérêt agronomique nouveau. Le gène codant pour cette protéine pourrait être introduit dans des plantes transgéniques, ou encore, un analogue de cette protéine pourrait être synthétisé et dispersée sur des cultures.

CARACTÉRISATION DE 3 FAMILLES MULTIGÉNIQUES

FAMILLE DES PROTÉINES TYROSINES PHOSPHATASES

Article 3

Bracoviruses contain a large multigenic family coding for protein tyrosine phosphatases

B. Provost, P. Varricchio, E. Arana, E. Espagne, P. Falabella, E. Huguet, R. La Scaleia, L. Cattolico, M. Poirié, C. Malva, J. A. Olszewski, F. Pennacchio et J.-M. Drezen.

Journal of Virology (2004) 78:13090-13103.

CONTEXTE DE L'ARTICLE 3

Le séquençage de l'intégralité du génome viral et des données préalables ont révélé la présence de nombreux gènes codant pour des protéines tyrosines phosphatases (PTP) dans le génome du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV). En effet, cette famille de gènes, composée de 27 séquences différentes, constitue la famille multigénique la plus représentée au sein du génome de CcBV.

Les protéines tyrosines phosphatases sont des enzymes ubiquistes appartenant au groupe des hydrolases, et elles sont connues pour être impliquées dans une multitude de voies de transduction de signaux. Elles provoquent le passage de la forme phosphorylée à la forme non-phosphorylée de nombreuses protéines impliquées dans tous types de mécanismes cellulaires.

La probabilité est donc très forte pour que ces protéines tyrosines phosphatases agissent comme facteurs de virulence impliqués dans les mécanismes aboutissant à l'altération de la physiologie de l'hôte *Manduca sexta* lors du parasitisme par *C. congregata*. Ces soupçons sont alimentés par les observations faites chez *Heliothis virescens* parasité par *Toxoneuron nigriceps* montrant que le parasitisme est accompagné d'une forte diminution du taux de phosphorylation d'une protéine impliquée dans la voie de biosynthèse de la neurohormone prothoracotrope, déclenchant elle-même la synthèse de l'hormone de mue.

Les questions principales auxquelles il fallait répondre s'agissant de ces PTP étaient les suivantes :

- **Les gènes du bracovirus de *C. congregata* codant pour des protéines tyrosines phosphatases (CcBV PTP) sont-ils exprimés dans l'hôte parasité?**
- **Certains de ces gènes CcBV PTP possèdent-ils une expression tissu-spécifique?**
- **Certaines de ces protéines tyrosines phosphatases possèdent-elles l'activité phosphatase?**

L'article suivant, répondant à ces questions, a été écrit dans le cadre d'un projet européen "Bioinsecticides from Insect Parasitoids", de 3 ans qui a débuté en septembre 2001 (QLK3-CT-2001-01586). Ce projet avait pour objectif, à terme, d'identifier des molécules pouvant être utilisées comme biopesticides. En effet, la chenille-hôte *Manduca sexta* de

l'hyménoptère *Cotesia congregata* impliquée dans notre modèle à 3 partenaires, est un ravageur du tabac, et potentiellement d'autres solanacées. C'est pourquoi la lutte contre la chenille de ce lépidoptère présente des intérêts agronomiques certains. Ce projet impliquait plusieurs laboratoires, notamment 2 laboratoires italiens : Istituto di Genetica e Biofisica, C. N. R. de Naples, et *Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università della Basilicata-Macchia Romana* de Potenza travaillant sur un modèle hôte/parasitoïde comparable au nôtre, puisqu'il s'agit de l'hyménoptère *Toxoneuron nigriceps* parasitoïde de la larve du lépidoptère *Heliothis virescens* qui porte lui aussi un bracovirus au sein de son génome. Le séquençage d'une partie du génome du bracovirus de *Toxoneuron nigriceps* (TnBV) a aussi révélé la présence de plusieurs gènes bracoviraux codant pour des protéines appartenant à la famille des protéines tyrosines phosphatases (TnBV PTP).

Cet article présente la caractérisation de ces gènes de PTP, par analyse cartographique au sein de leur génome viral respectif, ainsi que l'étude de leur expression au cours du parasitisme dans différents tissus de l'hôte parasité. Des études fonctionnelles ont aussi été menées sur des protéines tyrosines phosphatases du bracovirus de *Cotesia congregata* en collaboration avec un laboratoire anglais Department of Biological Sciences, Imperial College de Londres.

Bracoviruses Contain a Large Multigene Family Coding for Protein Tyrosine Phosphatases

Bertille Provost,¹ Paola Varricchio,² Eloisa Arana,³ Eric Espagne,^{1†} Patrizia Falabella,⁴
Elisabeth Hugué,¹ Raffaella La Scaleia,⁴ Laurence Cattolico,⁵ Marylène Poirié,¹
Carla Malva,² Julie A. Olszewski,³ Francesco Pennacchio,⁴
and Jean-Michel Drezen^{1*}

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Tours,¹ and Genoscope, Centre National de Séquençage, Evry,⁵ France; Istituto di Genetica e Biofisica, Consiglio Nazionale della Ricerca, Naples,² and Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università della Basilicata-Macchia Romana, Potenza,⁴ Italy; and Department of Biological Sciences, Imperial College, London, United Kingdom³

Received 21 April 2004/Accepted 19 July 2004

The relationship between parasitic wasps and bracoviruses constitutes one of the few known mutualisms between viruses and eukaryotes. The virions produced in the wasp ovaries are injected into host lepidopteran larvae, where virus genes are expressed, allowing successful development of the parasite by inducing host immune suppression and developmental arrest. Bracovirus-bearing wasps have a common phylogenetic origin, and contemporary bracoviruses are hypothesized to have been inherited by chromosomal transmission from a virus that originally integrated into the genome of the common ancestor wasp living 73.7 ± 10 million years ago. However, so far no conserved genes have been described among different braconid wasp subfamilies. Here we show that a gene family is present in bracoviruses of different braconid wasp subfamilies (*Cotesia congregata*, Microgastrinae, and *Toxoneuron nigriceps*, Cardiochilinae) which likely corresponds to an ancient component of the bracovirus genome that might have been present in the ancestral virus. The genes encode proteins belonging to the protein tyrosine phosphatase family, known to play a key role in the control of signal transduction pathways. Bracovirus protein tyrosine phosphatase genes were shown to be expressed in different tissues of parasitized hosts, and two protein tyrosine phosphatases were produced with recombinant baculoviruses and tested for their biochemical activity. One protein tyrosine phosphatase is a functional phosphatase. These results strengthen the hypothesis that protein tyrosine phosphatases are involved in virally induced alterations of host physiology during parasitism.

Hymenoptera is an extremely diversified insect order that includes, among others, well-known social species such as ants and bees and hundreds of thousands of wasp species, highly adapted to parasitic life (49). Wasp larvae that develop within the tissues of the parasitized hosts must face the challenge such a habitat presents. In particular, insect hosts have the capacity to fight macroscopic intruders with an immune response that leads to the production of a capsule, a cellular sheath of hemocytes that surrounds the foreign body (32, 38). Cytotoxic radicals are also produced that are proposed to be involved in killing the invader. To prevent this immune response, parasitic hymenoptera have evolved different strategies, including an association with polydnviruses, unique in the virus world for their genome, composed of multiple circular double-stranded DNA segments (37).

The relationship between wasps and polydnviruses constitutes one of the few known cases of mutualism between viruses and eukaryotes (15), in addition to retroviruses contributing to human placenta organogenesis (41). Viral replication is re-

stricted to specialized cells of the wasp ovary, and the virus is transmitted exclusively by Mendelian inheritance (55) through a proviral form, chromosomally integrated in the wasp genome (10, 21, 51). Virus particles are injected during wasp oviposition in the hemocele of the host, typically a lepidopteran larva. In the host cells, viral genes are expressed, but there is no viral replication (58, 70). Polydnvirus gene products are responsible for several alterations of host physiology induced by parasitism, comprising suppression of immunity and control of the caterpillar developmental program (61).

Polydnviruses harbored by wasps from the Braconidae family belong to the genus bracovirus and are associated with wasp species forming a monophyletic group, the microgastroid complex (which comprises seven braconid subfamilies: Cheloniinae, Dirrhopinae, Mendesellinae, Khoikhoiinae, Cardiochilinae, Miracinae, and Microgastrinae) (69). All wasp-bracovirus associations might thus have originated from a unique event, the integration of an ancestral bracovirus in the chromosome of the ancestor of the microgastroid complex living 73.7 ± 10 million years ago (66). Since this integration event, the bracovirus is likely to have contributed to the tremendous diversification of the microgastroid lineage, comprising 17,500 described species (37). Some genes inherited from the putative ancestral virus are expected to be common to all bracoviruses. However, while numerous bracovirus genes have been characterized in the last few years (12, 13, 31, 63), conserved genes

* Corresponding author. Mailing address: Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Parc Grandmont, 37200 Tours, France. Phone: 33 (0)2 47 36 73 57. Fax: 33 (0)2 47 36 69 66. E-mail: drezen@univ-tours.fr.

† Present address: Institut de Génétique et Microbiologie, UMR CNRS 8621, Université Paris Sud, Orsay Cedex, France.

have been identified so far only in closely related species of the *Cotesia* genus (39, 67).

In this paper, we present the characterization of a gene family shared by two subfamilies of bracovirus-bearing wasps, *Microgastrinae* and *Cardiochilinae*, that diverged more than 40 million years ago (66). Twenty-seven members of this gene family were identified in the genomes of CcBV, the symbiotic virus of *Cotesia congregata* (*Microgastrinae*), and 13 members in TnBV, the bracovirus associated with *Toxoneuron nigriceps* (*Cardiochilinae*). These genes encode proteins belonging to the protein tyrosine phosphatase family which, together with protein tyrosine kinases, are known to play a key role in the control of signal transduction pathways in vertebrates (3).

The protein tyrosine phosphatase family is divided into three groups of enzymes: classical, dual-specificity, and low-molecular-weight protein tyrosine phosphatases. The bracovirus protein tyrosine phosphatases identified belong to the classical protein tyrosine phosphatases, characterized by the domain composed of 10 conserved motifs whose functions are well known from structural and functional analyses in vertebrates (3). Although it has been proposed that the ancestral bracovirus was a baculovirus (15, 19), the bracovirus protein tyrosine phosphatases are not related to baculovirus or poxvirus protein tyrosine phosphatases, which belong to the dual-specificity protein tyrosine phosphatases.

To initiate functional characterization of protein tyrosine phosphatases and to assess the role they might play in host-parasite interactions, their expression profile was analyzed. Furthermore, two CcBV protein tyrosine phosphatase proteins were produced, with recombinant baculoviruses, in order to determine whether they display tyrosine phosphatase activity.

MATERIALS AND METHODS

Insect rearing. *C. congregata* (Hymenoptera, Braconidae, Microgastrinae) and *T. nigriceps* (Hymenoptera, Braconidae, Cardiochilinae) were reared under laboratory conditions on their host larvae, *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae), respectively, which were maintained on an artificial diet (27, 47) at 27 and 29°C for *M. sexta* and *H. virescens*, respectively, under a 16-h light/8-h dark photoperiod and 70 ± 5% relative humidity. Both host life cycles, normally composed of five larval instars followed by a pupal stage and an adult stage, are interrupted in the fifth larval instar by parasitism.

Viral DNA purification and sequencing. Wasp ovaries were dissected and viral DNA was extracted from virus particles purified by filtration or sucrose gradient as previously described (8, 18). CcBV DNA segments were sequenced with a shot gun strategy (17a). Sequencing of TnBV DNA was carried out at the TIGEM-IGB sequencing core service, Naples, Italy.

The coding DNA sequences were identified, and the potential genes were designated CcBV PTP for protein tyrosine phosphatase followed by a letter (A to Z and α to ϵ) and TnBV PTP followed by a number (1 to 13).

RNA isolation. RNA isolation was performed on different *M. sexta* tissues, which were dissected from 10 fifth-instar larvae and separately rinsed several times in Ringer solution before their use. For parasitized host larvae, dissections were carried out 12 and/or 24 h postoviposition. Parasitization was checked visually, and only host larvae stung twice by *C. congregata* females were processed. Synchronous nonparasitized host larvae served as controls. Hemocytes were collected by hemolymph centrifugation at 800 × g for 10 min. All the tissues were crushed for 1 min at 4°C with an Ultraturrax T8 (Ika-Verke-Staufen) homogenizer. RNA extractions were carried out with the RNeasy plant kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The quality of samples was checked by electrophoresis on an ethidium bromide-stained 1% agarose gel. To eliminate trace amounts of viral DNA present in total RNA, polyadenylated RNAs were purified with the Oligotex kit (Qiagen). *H. virescens* RNA extraction from parasitized and nonparasitized host tissues and polyadenylated RNA purification were carried out as previously described (18).

Preparation and screening of genomic and cDNA libraries. Viral genomic libraries and cDNA libraries from parasitized host tissues, such as hemocytes and the head and thorax region of *H. virescens* final-instar larvae 48 h postoviposition, were prepared and screened according to protocols reported in detail in previous papers (18, 63).

A cDNA library was constructed from total RNA isolated from *M. sexta* fifth-instar larvae fat body 24 h postoviposition, with a SMART cDNA library construction kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The library was screened with the CcBV PTPI and PTPM probes with standard methods (50). Individual positive plaques from the secondary screening were isolated in agar plugs, eluted in SM buffer, and then converted into a plasmid (pTriplEx2) in *Escherichia coli* (BM25.8) by in vivo excision and circularization. DNA sequencing reactions of selected clones were carried out according to the manufacturer's instructions on an ABI Prism 3100 Avant sequencer (Applied Biosystems). The DNA and protein sequences were subjected to computer BLAST analysis (2).

PTPA and PTPN cDNAs were isolated by reverse transcription-PCR from mRNA extracted from the fat body and hemocytes of *M. sexta* fifth-instar larvae 24 h postoviposition, with Omniscript reverse transcriptase (Qiagen) and high-fidelity ExTaq (Takara). The primers were designed from the annotated genomic sequence to amplify the whole predicted coding DNA sequences (PTPIatg, TGACGTAGATGTCAAATAAGTG; PTPIstop, CGGAGTCTGATCGATTA AACTC; PTPMatg, GCGGACGTCCACATATTGTCTA; and PTPMstop, TGAGTCCCTAGCCGTAATAATGA).

Field inversion gel electrophoresis and Southern blot mapping. Undigested CcBV or TnBV DNA (250 ng) was separated by electrophoresis (with 1% pulse field certified agarose gels; Bio-Rad) on a field inversion gel electrophoresis apparatus (Bio-Rad), delivering alternative 120-V forward and 180-V reverse pulses for 20 h. The duration of the pulses ranged from 0.4 s at the beginning to 0.7 s at the end of the run. After migration, the DNA was transferred to a nylon membrane (50) and hybridized to ³²P-labeled protein tyrosine phosphatase-specific probes. The probes were PCR amplification products obtained with CcBV virus DNA and the primers indicated in Table 1, purified with the Qiaquick kit purification (Qiagen), or TnBV protein tyrosine phosphatase cDNAs.

For Southern blot analysis, 300 ng of viral DNA was digested with restriction enzymes (Promega) and separated on 0.5% agarose gels. After transfer onto a nylon membrane, the DNA was hybridized with specific probes prepared as indicated above.

Membranes were prehybridized in Church buffer (46) at 65°C for 3 h and washed in 2× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)–0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) twice for 15 min and in 0.2× SSC–0.1% SDS twice for 15 min at 65°C.

Reverse transcription multiplex PCR. Polyadenylated mRNA purified from *M. sexta* larvae was reverse transcribed (Omniscript reverse transcriptase; Qiagen) and reverse transcription multiplex PCRs (Qiagen) were performed following the manufacturer's instructions. The 22 CcBV protein tyrosine phosphatase products were amplified in four different reactions with the primers listed in Table 1, and single-stranded cDNAs were obtained from 15 ng of polyadenylated mRNA. PCRs were also performed on 15 ng of mRNA (without reverse transcription) to exclude viral DNA contamination. The multiplex PCR program included a denaturation step (95°C for 15 min), followed by 30 amplification cycles (denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 57°C for 90 s, and extension at 72°C for 90 s) and a final extension step (72°C for 10 min).

Northern blot analysis. Northern blot analyses were performed with polyadenylated RNA with standard techniques (50) and separated on a formaldehyde gel. The RNA samples used in the experiments were extracted from hemocytes of *H. virescens* fifth-instar larvae at different times after *T. nigriceps* parasitization and from synchronous nonparasitized controls.

Phylogenetic analysis. Alignments of bracovirus protein tyrosine phosphatases with human and insect protein tyrosine phosphatase domains were performed with ClustalX (59). The alignment optimization was guided by the localization of the motifs described in vertebrate protein tyrosine phosphatase domains (3). Distance and parsimony analyses were performed with the PAUP4 program (56). The trees were checked by bootstrap analysis (20). Maximum-likelihood analysis was performed with Tree-puzzle 5.1 (52).

Construction of recombinant baculoviruses expressing CcBV protein tyrosine phosphatases. Recombinant baculoviruses were generated from a novel *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus engineered genome, maintained as a bacterial artificial chromosome, which facilitates the rapid creation of recombinant baculovirus expression vectors (30). We used a second generation of the reported engineered genome, a polyhedrin-positive variant of bAcGOZA called bApGOZA, in which the polyhedrin gene is expressed from the p10 locus (Y. H. Je et al., unpublished data). Briefly, bApGOZA DNA purified from bacteria was

TABLE 1. Primers^a

PCR	Gene	Forward and reverse primer sequences (5'→3')	Expected PCR product size (bp)
1	PTPA	AGTTCTGCAGACTCGTCCTT	902
		AGTTCTGCAGACTCGTCCTT	
	PTPY	TGTGAAGAGCACCACAAAAT	800
		CAAAGCAAACTGCATAACAA	
	PTPR	AGCCGAAAAGCTAACAGAA	699
		AAACTCTGGAACCTTGCTTG	
	PTP δ	GAACAGGGGGAGCTACATAA	599
		TTCCCGAATACTGGACACT	
	PTPB	CACAATGCTAAGGGAAGGTT	513
		GCTAACTGTGCTCTCTCGT	
2		ACATCAACGCGAGCTACATA	420
	PTPQ	TCACTGCTGTAGCGGTAT	
	PTPP	CCCCTACTAACGCAAGCTAC	306
		CCCCTACTAACGCAAGCTAC	
	PTPL	GCTCTGGAACAGATGAACT	187
		GTTGTTCCAGACCATTTTC	
	PTPI	GTTGAGCAAGTACCGGAAAT	903
		CGGGCTTTTGTCTCTTATC	
	PTPN	GATGCTTTGCTGAAGTTCC	796
		CGCACATTA AAAACCCTTG	
3	PTPZ	ATGGCAGTAACTCCGCTGT	581
		TCCGGCTTGTGAGAAAAGTT	
	PTPX	ATCCATGCGAACTATGTTGA	480
		ACAGAGATCCACAGCACAAA	
	PTP0	GGGTTTCGATATGTTCTCCAC	391
		TCACCATCTCCAAGAAAGGAT	
	PTP α	CATTGCACCGATAGTAGCAG	179
		TGAATGGCTTGATAGCAGAA	
	PTPE	TTTTGAGCAAGTAGCCGAAT	867
		TCACCTAAGCGATGACAGAA	
4	PTPH	TAGGGTGGTCTTAAATCCA	727
		ATGTGAGCGTAATTTCCAGGT	
	PTPS	TATGGCAACAATTTTCGATG	619
		AAATTCGAGGAAAAATTCGAG	
	PTPM	ACGGAACCTACGAAAACCTGG	475
		TCTTCTTCATGGGGAAATGT	
	PTPK	GAAGAAAAGAAGTCCCACGA	317
		TACAAGGAGCCTCCATCTTC	
	PTPC	CCTCGATTTTGTGTTACCC	174
		TTTTGACTGAGCCCTTTTC	
4	PTPV	TGGGCAGAACATATTTGGAT	743
		AACGTGATCACACTGGAATG	
	PTPW	CTGCCATGAATCTGCATCA	651
		GTAGCACCACACGGTAACAA	

^a Boldface indicates primers used to synthesize CcBV protein tyrosine phosphatase probes for Southern blot analysis.

cotransfected into *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF21 (Sf 21) cells (64) with the polyhedrin-based transfer vector pBacPAK8 (Clontech), in which the PTPA or PTPM gene from CcBV was cloned (pBacPAK8-PTPA or pBacPAK8-PTPM). The transfection was performed with DOTAP liposomal transfection reagent (Roche), according to the manufacturer's protocol. After 6 days, the culture medium containing the resulting viral progeny was collected. Recombinants were subjected to one round of plaque purification as previously described (45). Viruses were propagated to passage number 3 in monolayers of Sf21 cells, grown at 28°C in TC-100 (Gibco-BRL) containing 10% fetal bovine serum (M. B. Meldrum).

Analysis of recombinant baculovirus mRNA expression. Sf21 cells seeded in 60-mm dishes (2×10^6 cells per dish) were infected at a multiplicity of infection of 10 PFU/cell with wild-type or recombinant baculoviruses expressing CcBV PTPA (Rec-PTPA) or CcBV PTPM (Rec-PTPM). Three days postinfection, cells were harvested (45) and resuspended in RLT buffer (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. The samples were homogenized by loading them

into a QIAshredder column (Qiagen) and spinning for 2 min at 14,000 rpm. Total RNA extraction was performed from these lysates with RNeasy (Qiagen) according to the manufacturer's protocol.

For reverse transcription-PCR, contaminant DNA was removed by digestion of eluted RNA with 1 U of RNase-free DNase RQ1 (Promega) for 10 min at 37°C. Reverse transcription was carried out according to the manufacturer's instructions (Promega), and amplification was done with primer pairs ARTF (5'-ACTGGCCCGACAACAGTATC-3') and ARTR (5'-CTTGACAGATTTT TGGCTTC-3') to detect PTPA transcripts and RTMF (5'-TGTTGTACATGG CAATGCTGG-3') and RTMR (5'-TGAGTCCCCTAG CCGTAAAATG-3') to detect PTPM transcripts. PCR conditions were 2 min at 94°C, followed by 35 cycles of 15 s at 94°C, 15 s at 45°C, and 45 s at 72°C.

Characterization of recombinant gene expression by SDS-PAGE. Sf21 cells seeded in 60-mm dishes (2×10^6) were infected with the viral stocks with an multiplicity of infection of 10 PFU/cell. Samples were collected at 24, 48, and 72 h postinfection. Cell monolayers were harvested by resuspension in the supernatant medium and recovered by low-speed centrifugation. The pellet was rinsed with phosphate-buffered saline twice and resuspended in 50 μ l of NP-40 lysis buffer (45). Following incubation on ice for 30 min, one volume of 1 \times SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) loading buffer was added to the samples, and 7.5 μ l of each sample was separated by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel) and stained with Coomassie brilliant blue. For metabolic labeling of proteins, cultures were methionine starved for 1 h, pulse labeled for 1 h with 25 μ Ci of Trans³⁵S label (ICN Biomedicals, Inc.), and resuspended in 500 μ l of medium without methionine. Samples were collected, resolved by SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel), and stained with Coomassie brilliant blue. The dried gels were exposed to X-ray film.

Protein tyrosine phosphatase assay. We infected 5×10^6 Sf21 cells with the viral stocks with a multiplicity of infection of 10. They were harvested at 5 days postinfection by scraping into the culture medium and recovered by centrifugation. The pellets were lysed with 150 μ l of Tris-buffered saline (50) supplemented with 1% NP-40, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail (BD Biosciences Pharmingen). The samples were incubated for 30 min on ice and homogenized by loading them into QIAshredder columns. The lysates were brought to 2.5 ml with Tris-buffered saline supplemented with 1 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, precleared to remove endogenous free phosphates by loading them into PD-10 desalting columns containing Sephadex G-25 (Amersham Biosciences).

The measurement of protein tyrosine phosphatase activity was performed with the tyrosine phosphatase assay system (Promega), according to the manufacturer's instructions, in 96-well plates with a flat bottom. Briefly, 85 μ l of the cleared lysates was incubated with Tyr phosphopeptide 1, END(pY)INASL (0.13 mM), in the presence and absence of 1 mM sodium vanadate. The reaction buffer used was Tris-buffered saline supplemented with 1 mM dithiothreitol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After 30 min at 30°C, the enzymatic reaction was stopped with 115 μ l of a molybdate dye-additive mixture, which was used for visualization of liberated phosphate by the formation of a colored complex. The optical density of the samples was read at 600 to 650 nm range with a Metertech Σ 960 plate reader; background absorbance due to the reaction mix was subtracted from the reported values and converted to a concentration. Two to five independent phosphatase assays (from independent infections) for each infected cell lysate were analyzed statistically by a paired Student *t* test (Microsoft), and data were graphed with the standard error of the mean with Microsoft Excel.

Accession numbers. The CcBV and TnBV protein tyrosine phosphatase sequences have been deposited in GenBank under accession numbers AJ634653 to AJ634660 and AJ640087 to AJ640113, respectively.

RESULTS

Identification of protein tyrosine phosphatase genes in CcBV and TnBV genomes. Protein tyrosine phosphatase genes were identified through sequencing of the complete genome of CcBV (17a) and of multiple fragments of the TnBV genome. From the analysis of the potential coding DNA sequences of the virus genomes, 23 CcBV and eight TnBV sequences were found to encode putative proteins containing a full protein tyrosine phosphatase conserved domain, while four CcBV and five TnBV sequences encoded partial domains. BlastP results demonstrated highly significant homologies with a wide range of proteins belonging to the classical protein tyrosine phosphatase

tases, including receptor-like protein tyrosine phosphatases (data not shown). The highest similarity (higher than 50%) was observed between viral genes and vertebrate and invertebrate protein tyrosine phosphatases of the Meg2 subtype. The expected values for obtaining such similarities by chance were as low as 1×10^{-39} with nrprot sequences. The similarity was observed over the whole protein tyrosine phosphatase domain constituting most of the bracovirus protein tyrosine phosphatases with the exception of a short stretch in the N-terminal part.

Protein tyrosine phosphatase genes were found on seven segments of the CcBV genome (17a) and on 38 out of 194 genomic overlapping TnBV clones. They constituted the major gene family of the CcBV genome in terms of number of genes (17a). Unlike many CcBV and TnBV genes, protein tyrosine phosphatase genes are not predicted to contain introns. This was confirmed by the isolation of four cDNAs from CcBV (PTPA, PTPI, PTPM, and PTPN) and 2 cDNAs from TnBV (PTP5 and PTP7). The organization of the different putative proteins was similar and resembled that of vertebrate PTP1B (3) with a single domain not associated with other conserved protein domains. In the coding DNA sequences encoding a truncated product (CcBV PTP γ , CcBV PTPD, TnBV PTP12, and TnBV PTP13), the premature interruption was due to a frameshift or to the presence of a stop codon. The missing part of the protein tyrosine phosphatase domain was found downstream of the stop codon, suggesting that a single mutation occurred recently. In contrast, two CcBV genes displayed more complex rearrangements, suggesting that they constitute pseudogenes (CcBV PTPT and CcBV PTP ϵ).

Comparison and relationships between bracovirus, invertebrate, and vertebrate protein tyrosine phosphatases. The amino acid sequences of bracovirus protein tyrosine phosphatases were deduced from the gene sequences by assuming that the cDNAs and the genes have the same sequence as predicted by Genscan analysis (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), as is the case for the six protein tyrosine phosphatase genes for which the cDNA was isolated. Bracovirus sequences were aligned to the profile of the protein tyrosine phosphatase domain of vertebrates (<http://science.novonordisk.com/ptp>) and to several insect protein tyrosine phosphatase domains with the ClustalX program.

The 10 conserved motifs that define the protein tyrosine phosphatase family (3) were identified in bracovirus protein tyrosine phosphatases (Fig. 1). Among these motifs, the protein tyrosine phosphatase loop, which has a cysteine residue in a conserved position, has been shown by mutational analysis to be critical for protein tyrosine phosphatase activity (22, 62). Interestingly, some of the bracovirus protein tyrosine phosphatases lack this cysteine residue. Moreover, several bracovirus protein tyrosine phosphatases lack other less conserved motifs (see Fig. 1).

In cellular protein tyrosine phosphatases, the protein tyrosine phosphatase domain is generally combined with other conserved protein domains involved in modulating the function of the protein (3). As a general rule, the bracovirus protein tyrosine phosphatases are characterized by a very high divergence in their amino acid sequences (even if some of them show strong similarity, including CcBV PTPC and PTP α , CcBV PTP ϵ and PTPX, and TnBV PTP5 and PTP7, showing

96%, 94%, and 84% amino acid similarity, respectively). Bracovirus protein tyrosine phosphatases are more divergent than vertebrate protein tyrosine phosphatase domains (<http://www.univ-tours.fr/irbi/ptp>) having different subcellular localizations and biological functions (3). Bracoviruses were originally described as unusual baculoviruses because of similarities in their particle morphology (36).

In order to study the relationship between bracovirus and baculovirus protein tyrosine phosphatases, comparisons were also performed between protein tyrosine phosphatases from bracovirus and other viruses (data not shown). Poxvirus and baculovirus protein tyrosine phosphatases are much shorter and belong to the dual-specificity protein tyrosine phosphatases. As generally observed when comparing classical and dual-specificity protein tyrosine phosphatases, some homology was detected only in the phosphatase catalytic sites (protein tyrosine phosphatase loop).

The phylogenetic relationship between bracovirus, vertebrate, and invertebrate protein tyrosine phosphatases was analyzed with the methods of distance, parsimony, and maximum likelihood. Due to the high divergence of the bracovirus sequences, it was not possible to reconstruct a complete history of their phylogeny (the trees were not completely resolved) or to demonstrate that bracovirus proteins originated from a particular type of invertebrate or vertebrate protein tyrosine phosphatase (data not shown). However, several clades of protein tyrosine phosphatase genes were consistently obtained with the different methods with significant bootstrap values (Fig. 2), indicating that the corresponding genes originated from a common ancestor, probably through several rounds of gene duplication.

Localization of the protein tyrosine phosphatase genes in the virus genome. To map the protein tyrosine phosphatase genes in the CcBV and TnBV genomes, CcBV and TnBV segments were separated by field inversion gel electrophoresis (13, 71). UV visualization of ethidium bromide-stained gels allowed us to conclude that the TnBV genome is much smaller than that of CcBV, as corroborated by sequence data and fine mapping of different TnBV segments (F. Pennacchio et al., unpublished data). After transfer onto a membrane, the viral DNA was hybridized with a series of probes specific for seven CcBV protein tyrosine phosphatase genes (see Materials and Methods) and a TnBV protein tyrosine phosphatase probe (TnBV PTP7). An intense hybridization signal, corresponding to a molecule of the expected size from the assembly of the virus genome, was obtained with each CcBV probe, indicating that seven CcBV double-stranded DNA virus segments actually contain a protein tyrosine phosphatase gene (Fig. 3). Two signals were obtained for TnBV protein tyrosine phosphatases corresponding to the hybridization of the probe to two closely related genes (TnBV PTP5 and TnBV PTP7, 84% homologous) located on different segments.

The precise localization of several genes (CcBV PTPI and PTPN and TnBV PTP5 and PTP7) within the corresponding segments was verified by Southern blot analysis with restriction digestion-purified viral DNA (data not shown).

Protein tyrosine phosphatase gene expression in parasitized host tissues. The occurrence of pseudogenes in bracovirus protein tyrosine phosphatase gene families and of potential proteins lacking the catalytic cysteine residue in the protein

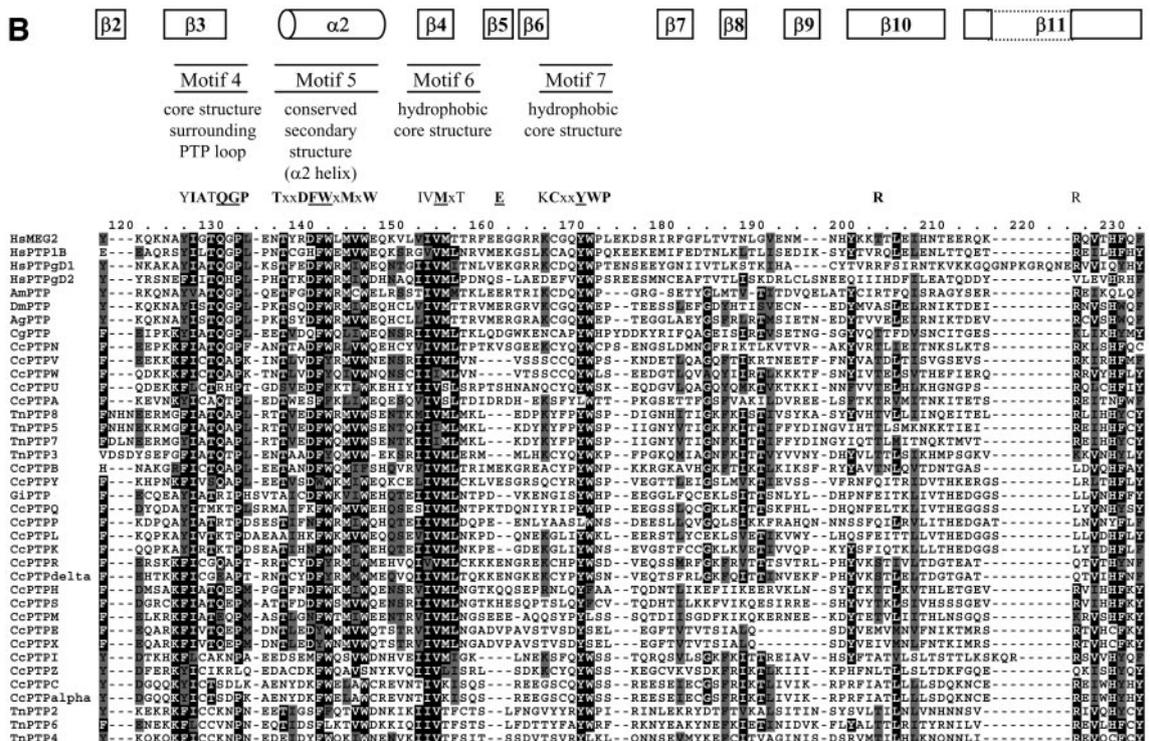
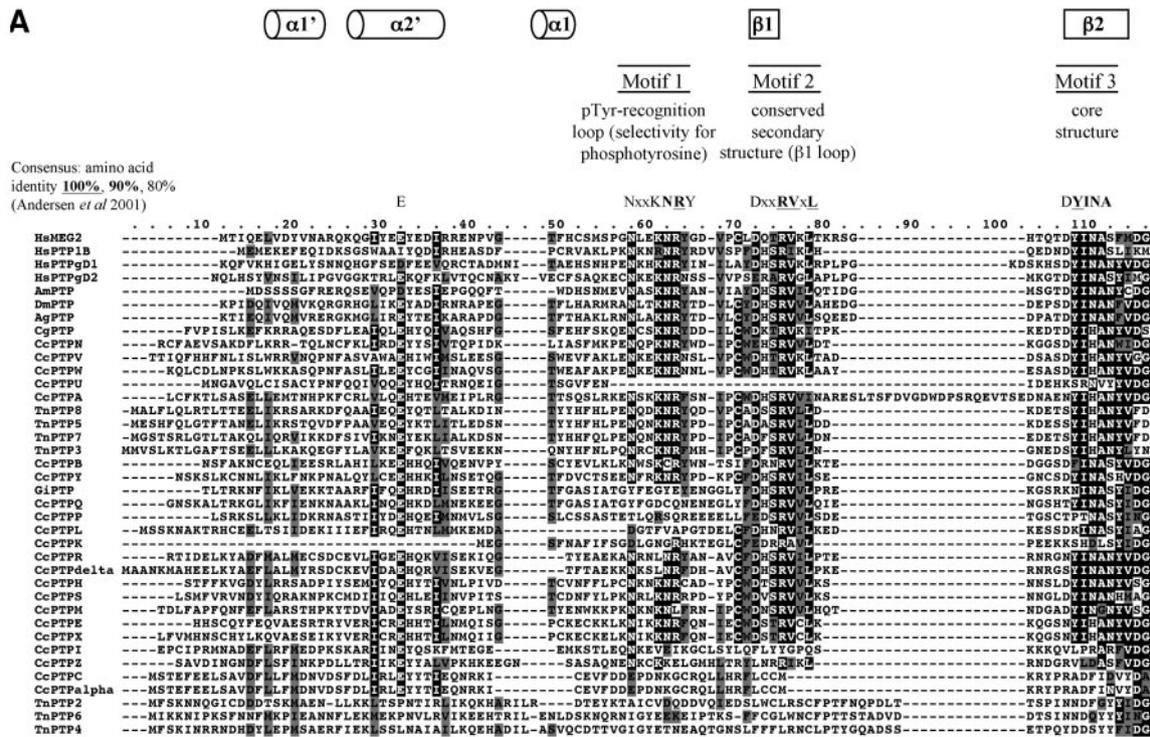


FIG. 1. Sequence comparison of bracovirus protein tyrosine phosphatases with human and insect protein tyrosine phosphatase domains. The localization of alpha-helices and beta-strands based on the X-ray crystal structure of PTP1B are shown above the alignment (4). The 22 invariant residues (underscoring) and the 42 highly conserved residues ($>80\%$ identity) of vertebrate protein tyrosine phosphatase D1 domains are indicated at the top of the alignment with a brief description of the function of the motif (3). Proteins: human HsMEG2, HsPTP1B, HsPTPgD1 and HsPTPgD2 (for the gamma D1 and D2 domains, respectively) (GenBank accession numbers M83738, M33689, and L09247, respectively); AmPTP, *Apis mellifera* protein tyrosine phosphatase domain (sequence 2044722913BCM from the *Apis mellifera* genome sequence); DmPTP and AgPTP, protein tyrosine phosphatase domains from *Drosophila melanogaster* and *Anopheles gambiae* protein tyrosine phosphatases, respectively (EMBL AE003447 and GenBank XM322055, respectively). Bracovirus protein tyrosine phosphatases: CcPTPs, TnPTPs, CgPTP, and GiPTP, bracovirus proteins from *C. congregata*, *T. nigriceps*, *Cotesia glomerata* (GenBank AY466396), and *Glyptapanteles indiensis* (GenBank AAP37630), respectively.

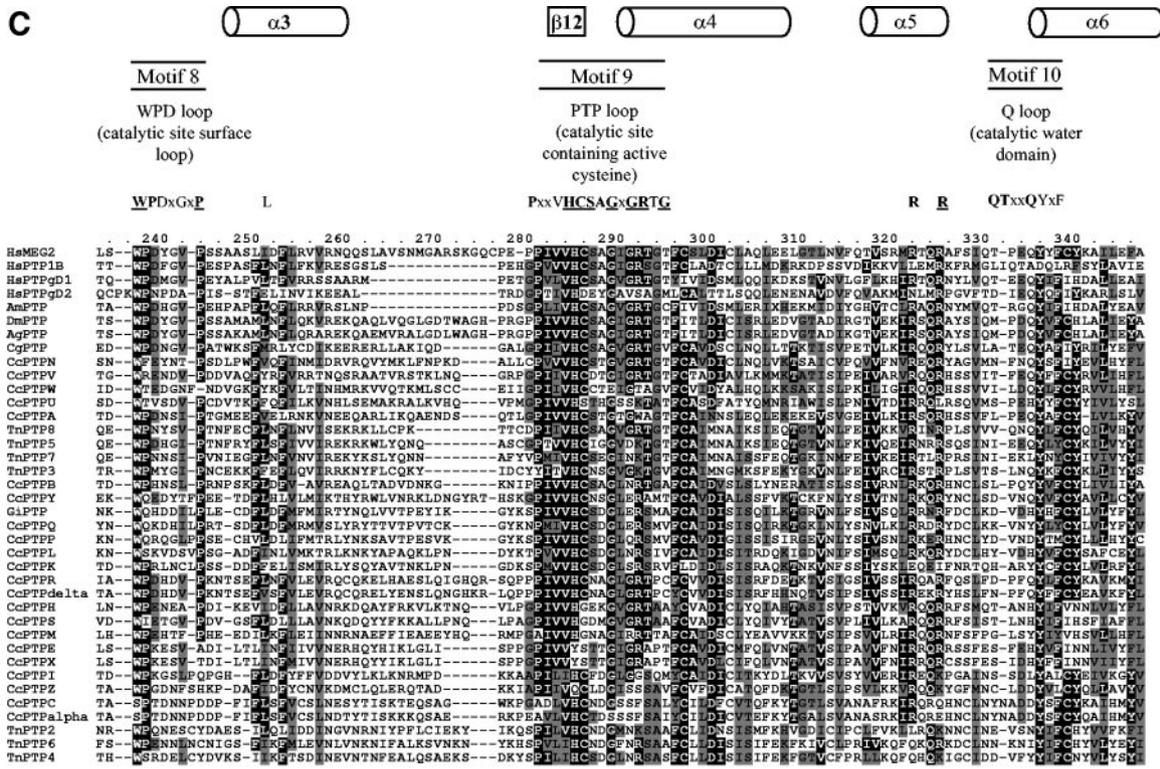


FIG. 1—Continued.

tyrosine phosphatase loop suggests that only a subset of protein tyrosine phosphatases might be involved in the regulation of host-parasite interactions. Detecting the expression of different protein tyrosine phosphatase genes during parasitism could constitute a first indication of their involvement in bracovirus-induced alterations of host physiology. To obtain a large picture of CcBV protein tyrosine phosphatase gene expression during parasitism, a multiplex PCR approach was chosen (72) with primers designed to amplify specific regions of the cDNAs of 22 protein tyrosine phosphatase genes. To validate the technique, reverse transcription multiplex PCR analysis was first performed with purified viral DNA; PCR products of the expected sizes were obtained for the 22 genes tested (Fig. 4).

Protein tyrosine phosphatase gene expression was then assessed with mRNA extracted from five tissues of the parasitized host: nervous system, fat body, midgut, Malpighian tubules, and hemocytes dissected 12 or 24 h postoviposition. No amplification signal was obtained from mRNA samples without reverse transcription, indicating that samples were not contaminated with viral DNA.

For each gene analyzed, a product of the expected size was obtained with mRNAs extracted from one or several tissues (Fig. 4). The number of protein tyrosine phosphatase mRNAs detected ranged from nine, in mRNA extracted from Malpighian tubules, to 20, in the nervous system (Table 2). Several genes displayed a ubiquitous expression profile (CcBV PTPA, PTPK, PTPI, PTPL, PTM, PTPP, PTPR, PTPS, and PTPX), while expression of the other genes was restricted to different subsets of the tissues analyzed (Table 2).

To analyze the expression profile of TnBV protein tyrosine

TABLE 2. Protein tyrosine phosphatase mRNA expression in parasitized *M. sexta* larvae and in the parasitoid was *C. congregata*

PCR	Gene	Expression in parasitized <i>Manduca sexta</i> tissues					
		CcBV DNA	Nervous system	Midgut	Malpighian tubules	Fat body	Hemocytes
1	PTPA	+	+	+	+	+	+
	PTPY	+	+	+	+	+	+
	PTPR	+	+	+	+	+	+
	PTPδ	+	+	—	—	—	+
	PTPB	+	+	—	—	—	—
	PTPQ	+	+	—	—	—	—
2	PTPP	+	+	+	+	+	+
	PTPL	+	+	+	+	+	+
	PTPI	+	+	+	+	—	+
	PTPN	+	+	+	—	—	—
	PTPZ	+	+	—	+	+	—
	PTPX	+	+	—	+	+	—
3	PTPO	+	—	—	—	—	—
	PTPα	+	—	—	—	—	+
	PTPE	+	+	—	—	+	+
	PTPH	+	+	—	—	+	—
	PTPS	+	+	—	+	+	+
	PTPM	+	+	+	+	+	+
4	PTPK	+	+	+	—	—	+
	PTPC	+	—	—	—	+	—
	PTPV	+	+	+	—	—	—
	PTPW	+	+	—	—	+	—

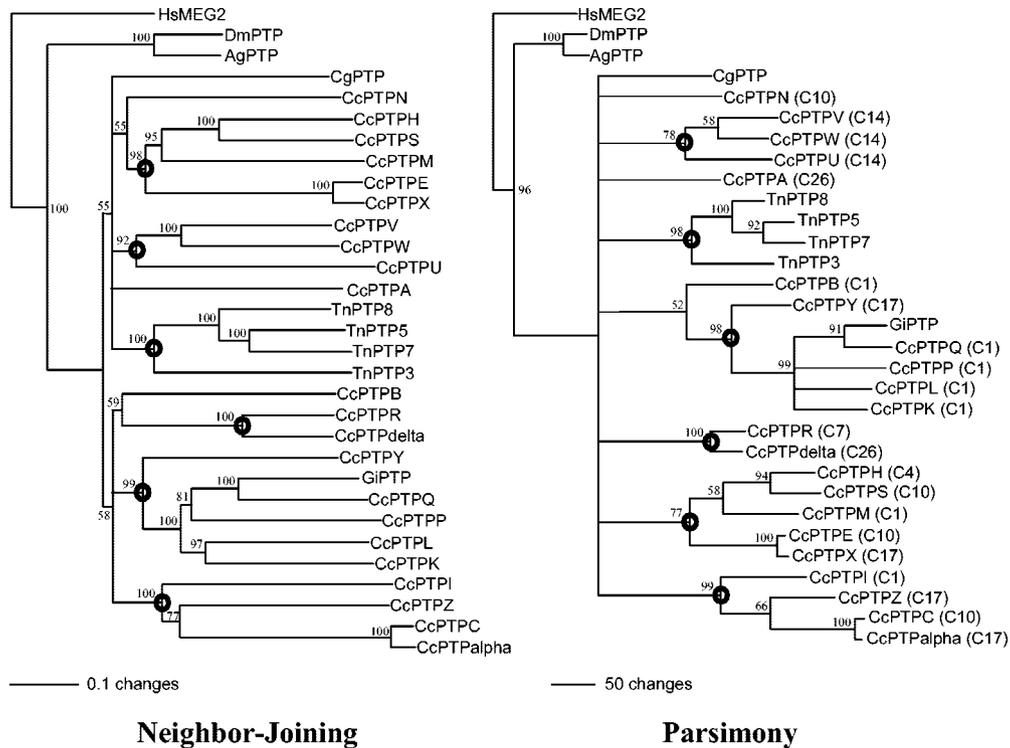


FIG. 2. Phylogenetic analysis of bracovirus protein tyrosine phosphatases. The neighbor-joining tree and one of the most parsimonious trees (parsimony) were generated with PAUP4 from the alignment shown in Fig. 1. (The more divergent sequences [TnBV PTP2, PTP 4, and PTP 6] were not included in the analysis.) The trees were rooted with human and insect protein tyrosine phosphatases of the MEG2 subtype (Hs, *Homo sapiens*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Ag, *Aedes aegypti*) as outgroups. Bootstrap values of >50% are indicated. The circles designate the most internal nodes supported by bootstrap values of >75% which define six monophyletic groups of bracovirus protein tyrosine phosphatases consistently found with different phylogenetic methods. On the parsimony tree for the CcBV protein tyrosine phosphatases, the PDV segments containing the corresponding genes are indicated in brackets (C1 to C26).

phosphatase genes, the TnBV PTP7 and PTP5 cDNAs were used as probes in Northern blot analysis of mRNAs extracted from hemocytes of parasitized larvae isolated at different times postoviposition. Due to their homology, the two probes gave the same hybridization pattern. The results obtained with PTP7 cDNA as a probe are shown in Fig. 5. With mRNAs extracted from hemocytes, a hybridization signal corresponding to a molecule of approximately 1 kb (consistent with the size of the cDNAs cloned) was faint but detectable 6 h postoviposition and intense at 24 and 48 h postoviposition. A low-intensity signal corresponding to a larger molecule (approximately 3 kb) was also detected, which might correspond to a splicing variant or to cross-hybridization of the probe with another protein tyrosine phosphatase gene. Overall, the results indicate that at least one of the TnBV protein tyrosine phosphatase genes studied is highly expressed in parasitized host hemocytes.

Thus, the protein tyrosine phosphatase genes of both parasitoid species are expressed in the tissues of parasitized hosts, suggesting that they contribute to bracovirus-induced alterations in the physiology of the parasitized host.

Expression of CcBV PTPA and PTPM in baculovirus-infected insect cells. To evaluate the potential role of bracovirus protein tyrosine phosphatases in parasitism, we had to determine if they displayed protein tyrosine phosphatase activity. To assess the biochemical activity of bracovirus protein tyrosine

phosphatases, a baculovirus expression system was used to generate two different CcBV protein tyrosine phosphatases, one with a regular protein tyrosine phosphatase loop (CcBV PTPA) and the other without the cysteine in the loop (CcBV PTPM). Recombinant baculoviruses Rec-PTPA and Rec-PTPM were produced, with the genes expressed under the control of the very late baculovirus *polh* promoter. After infection of Sf21 cells, expression of each protein tyrosine phosphatase was checked by reverse transcription-PCR. Specific bands were obtained for PTPA (380 bp) and PTPM (259 bp) after Rec-PTPA and Rec-PTPM infections, but not with wild-type infections (Fig. 6A and C). Metabolic labeling of proteins produced during baculovirus infection of Sf21 cells and subsequent SDS-PAGE analysis demonstrated the production of a novel protein following Rec-PTPA and Rec-PTPM infections at very late times (Fig. 6B and D). The migrations of the baculovirus-expressed PTPA and PTPM were consistent with their predicted sizes (37.3 and 34.5 kDa, respectively).

Assessment of protein tyrosine phosphatase activity. In order to test the ability of CcBV PTPA and CcBV PTPM to dephosphorylate substrates containing tyrosine residues, we assessed the protein tyrosine phosphatase activity of cell lysates from Rec-PTPA, Rec-PTPM, and wild-type baculovirus infections of Sf21 cells (Fig. 6E). Infected cell lysates, precleared of free phosphate, were incubated with a chemically synthesized phosphopeptide, and the amount of free phosphate generated

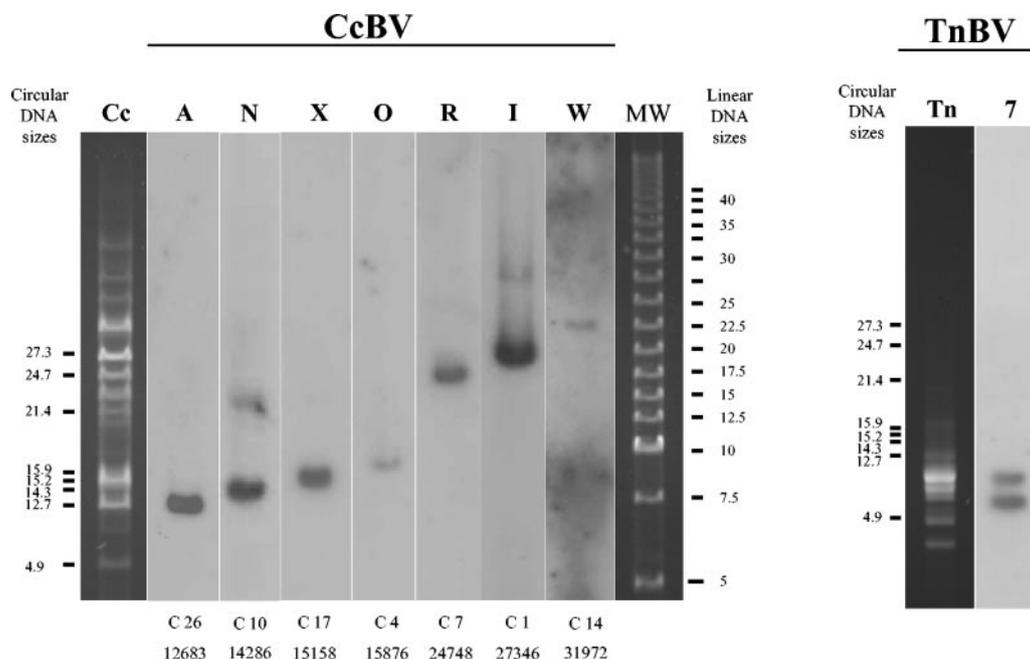


FIG. 3. Hybridization of CcBV and TnBV protein tyrosine phosphatase probes to DNAs (250 ng) extracted from viral particles separated by field inversion gel electrophoresis (exposure time, 16 h). Ethidium bromide-stained CcBV and TnBV DNA segments are visualized in lanes Cc and Tn, respectively (the average size of TnBV segments is much smaller than that of CcBV segments). The sizes of a set of double-stranded DNA segments determined from genome assembly and identified by hybridization of non-protein tyrosine phosphatase probes are indicated on the left (circular DNA sizes), and a linear size marker (2.5 kb ladder from Bio-Rad) is shown (lane MW). Seven probes were used to hybridize to CcBV DNA (lanes A, N, X, O, R, I, and W hybridized with the CcBV PTPA, PTPN, PTPX, PTPO, PTPR, PTPI, and PTPW probes, respectively), and one probe was used to hybridize to TnBV DNA (lane 7, TnBV PTP7). A major signal was obtained with each CcBV protein tyrosine phosphatase probe, corresponding to a molecule of the expected size (indicated below each lane in base pairs with the name of the corresponding CcBV segment); the intensity of the signal varied according to the relative abundance of the different segments in the viral DNA and the specific activity of the probe. The upper signals visualized in lanes N and I correspond to the linear sizes of segments C10 and C1, suggesting that a small fraction of the molecules were damaged during viral DNA extraction, as previously observed for the EP1 segment (46). Two signals were obtained with the TnBV probe, one corresponding to hybridization with the segment containing PTP7, and the other corresponding to hybridization with another segment harboring the homologous PTP5.

was measured by recording the absorbance of a colored complex of phosphomolybdate and malachite green.

As shown in Fig. 6E, wild-type virus-infected cell extracts showed some protein tyrosine phosphatase activity, as previously reported (26, 34, 53) and as expected from the presence of dual-specificity protein tyrosine phosphatases in the baculovirus. However, the Rec-PTPA virus-infected cell lysates released significantly more free phosphate than wild-type virus-infected cell lysates ($P = 0.02$). In contrast, the Rec-PTPM virus-infected cell lysates generated the same amount of free phosphate as wild-type-infected cells, indicating that PTPM overexpression does not lead to additional protein tyrosine phosphatase activity in baculovirus-infected cells. Incubation of either type of infected cell lysate with the general tyrosine phosphatase inhibitor sodium vanadate resulted in a decrease in the amount of free phosphate generated. Overall, our results indicate that CcBV PTPA is a functional tyrosine phosphatase, while CcBV PTPM might have a different activity.

DISCUSSION

Protein tyrosine phosphatase occurrence in different braconid subfamilies. A major prediction of the current theory of the common origin of wasp-bracovirus associations is that some bracovirus genes should be conserved within the different braconid wasp lineages harboring viruses that constitute the

microgastroid complex. However, the bracovirus genes characterized to date are conserved only in closely related species (25, 39, 68). The genes coding for protein tyrosine phosphatases are the first bracovirus genes analyzed so far that are present in viruses of two different braconid subfamilies, *Microgastriinae* and *Cardiochilinae*.

It would be of great interest to determine if protein tyrosine phosphatase genes are also encoded by bracoviruses from other braconid subfamilies of the monophyletic microgastroid complex (66). Conceivably, some protein tyrosine phosphatase genes might have been present in the gene set of the nonintegrated ancestor of the bracoviruses, and indeed viruses are known to pick up cellular genes, including protein tyrosine phosphatases, that are beneficial for their life cycle in infected hosts (29). The structure of the bracovirus protein tyrosine phosphatases, with 10 motifs conserved in classical protein tyrosine phosphatases, strongly suggests that they are indeed of cellular origin.

Based on morphological similarities between bracovirus and baculovirus particles, it was proposed that the ancestral bracovirus was a baculovirus (15, 19). However, bracovirus and baculovirus protein tyrosine phosphatases are unrelated; baculoviruses contain genes for dual-specificity protein tyrosine phosphatases (dephosphorylating tyrosine and serine residues) (26). Thus, the identification of the bracovirus protein tyrosine

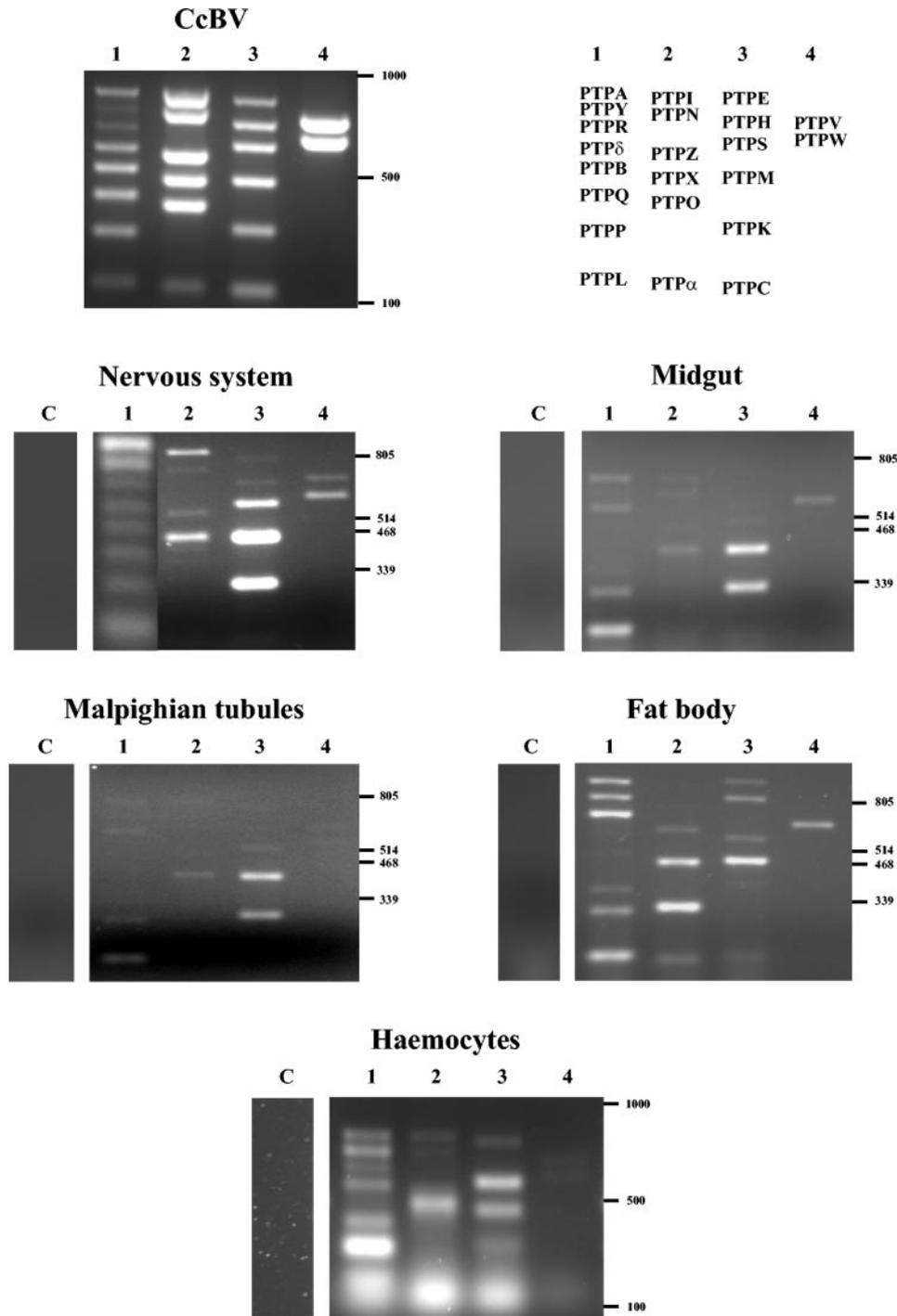


FIG. 4. Analysis of CcBV protein tyrosine phosphatase gene expression in tissues of parasitized *M. sexta* larvae with reverse transcription multiplex PCR (see Table 2 for a summary of the results). For CcBV, the ethidium bromide-stained electrophoresis gel of PCR products obtained with purified viral DNA amplified in four separate reactions (1 to 4) (the primers used are listed in Table 1) is shown. On the right are shown the positions of the products corresponding to the different genes analyzed. For the nervous system, midgut, Malpighian tubules, fat body, and haemocytes, the ethidium bromide-stained gel electrophoresis of PCR products obtained with cDNA extracted from the tissues of parasitized *M. sexta* larvae dissected either 24 h postoviposition (hemocytes and fat body) or 12 h postoviposition (other tissues) is shown. Lanes C, amplification performed to assess viral DNA contamination in the mRNA sample (without reverse transcription).

phosphatases does not support the hypothesis of a baculovirus origin of bracoviruses.

The considerable divergence of bracovirus protein tyrosine phosphatase sequences might be explained by the fact that the

two subfamilies to which the wasp species examined here belong have been separated for tens of millions of years (66) and that these genes, like other polydnavirus (PDV) genes involved in the host-parasitoid interaction, may have undergone fast

evolutionary changes (16). However, the hypothesis that protein tyrosine phosphatases were acquired independently in the two lineages through a convergent evolution process cannot be rejected. Independent acquisitions from wasp chromosomes might have occurred through recombination or transposition events, resulting in the integration of wasp genes in the chromosomal form of the virus genome.

Bracovirus protein tyrosine phosphatase organization in a large gene family. A characteristic feature common to the bracovirus protein tyrosine phosphatases is their organization into large gene families. Such an organization provides an efficient mechanism for generating genetic diversity (44). For example, animal toxins are often encoded by gene families (35) and appear to have diversified by gene duplication and adaptive evolution. However, gene families are rare among free-replicating viruses compared to cellular genomes. This paucity has been attributed to the limitation in size of the genome to one that can be efficiently encapsidated in virus particles (29). Accordingly, in viruses that have large genomes, some genes, such as the *bro* genes of baculoviruses, are organized in gene families (29).

Polydnviruses have some of the largest virus genomes (568 kb for CcBV) (17a), and gene families are common in both ichnoviruses (9, 23, 37, 65) and bracoviruses (18, 37, 57, 60). The organization of bracovirus genomes in large double-stranded DNA segments encapsidated in distinct nucleocapsids (1) and the fact that they are exclusively chromosomally transmitted (in the absence of virus replication within the host tissues) probably relieved constraints on viral genome size, allowing the formation of gene families. It is noteworthy that closely related genes are not necessarily encoded by the same virus segment (Fig. 3), suggesting the occurrence of duplications, likely by unequal crossing-over events, of the chromosome regions where the integrated forms of the virus sequences are clustered (10, 71). The high sequence similarity (see Results) of some protein tyrosine phosphatase genes isolated from the bracovirus suggests that they originated from recent duplication events.

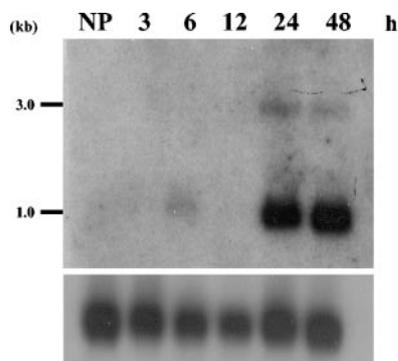


FIG. 5. Northern blot analysis of TnBV protein tyrosine phosphatase mRNA expression in parasitized *H. virescens* larvae. Upper panel: hybridization of PTP7 cDNA to RNA extracted from *H. virescens* hemocytes collected at different times (from 3 to 48 h) following *T. nigriceps* parasitization and from nonparasitized control larvae (NP). Lower panel: control of the amount and quality of the RNA samples by hybridization of a cDNA of *H. virescens*, coding for a putative protein showing high similarity with *M. sexta* ribosomal protein S3 (63), as a probe.

The expansion of the protein tyrosine phosphatase gene family is particularly striking. Indeed, the CcBV genome contains 27 protein tyrosine phosphatase genes, while other CcBV gene families contains at most half a dozen (17a). Protein tyrosine phosphatase genes are also numerous in the TnBV genome, which contains more than 13. This suggests either that duplication of protein tyrosine phosphatase sequences is a particularly frequent phenomenon or that duplicated protein tyrosine phosphatase genes have been selectively conserved during the evolution of the bracovirus genome, probably because of the strong selection pressures associated with their role in successful parasitism.

Diversification of bracovirus protein tyrosine phosphatases. Protein tyrosine phosphatases are almost as abundant in CcBV DNA as in eukaryotic genomes (the human genome contains 37 protein tyrosine phosphatase genes), but their organization is comparatively rudimentary. Bracovirus protein tyrosine phosphatases consist essentially of a protein tyrosine phosphatase catalytic domain, while in cellular protein tyrosine phosphatases, the protein tyrosine phosphatase domain is generally associated with other conserved protein domains involved in modulating the function of the protein (3). Interestingly, dual-specificity protein tyrosine phosphatases from poxviruses and baculoviruses, including VH1 from vaccinia virus, which inhibits the interferon signaling pathway by dephosphorylating transcription factor Stat1 (42), are also composed of a single protein tyrosine phosphatase domain that might be sufficient for viral products to act as inhibitors.

In contrast to their homogeneous organization, bracovirus protein tyrosine phosphatases show considerable diversity in their amino acid sequences; they are much more divergent than the protein tyrosine phosphatase domains of vertebrate proteins with different biological functions. Protein tyrosine phosphatases are a key group of signal transduction enzymes that, together with protein tyrosine kinase, control the levels of cellular protein phosphorylation (43), playing a pivotal role in cellular signaling. Each protein tyrosine phosphatase dephosphorylates phosphotyrosine residues on a specific substrate. Since the protein tyrosine phosphatase domain itself confers the target specificity of protein tyrosine phosphatases (3), the bracovirus protein tyrosine phosphatases might interact with distinct host target proteins to interfere with different signaling processes of the host. Furthermore, as some wasps parasitize several host species (28), the diversity of bracovirus protein tyrosine phosphatases might also mirror the diversity of molecular targets in different hosts. Bracovirus protein tyrosine phosphatase diversification might have thus contributed to wasp adaptive radiation, allowing the colonization of new ecological niches. It might have also helped parasitoids to deal with new resistance genes arising from the evolutionary arms race between host and parasites, as suggested for other PDV genes (16).

Potential role of bracovirus protein tyrosine phosphatases during parasitism. The analysis of protein tyrosine phosphatase gene expression in parasitized hosts suggests that most protein tyrosine phosphatases have a function in contemporary host-parasitoid interactions. Indeed, the mRNAs of the 22 CcBV protein tyrosine phosphatase genes tested were detected in tissues of the parasitized host larvae with reverse transcription multiplex PCR. Similarly, a protein tyrosine phosphatase

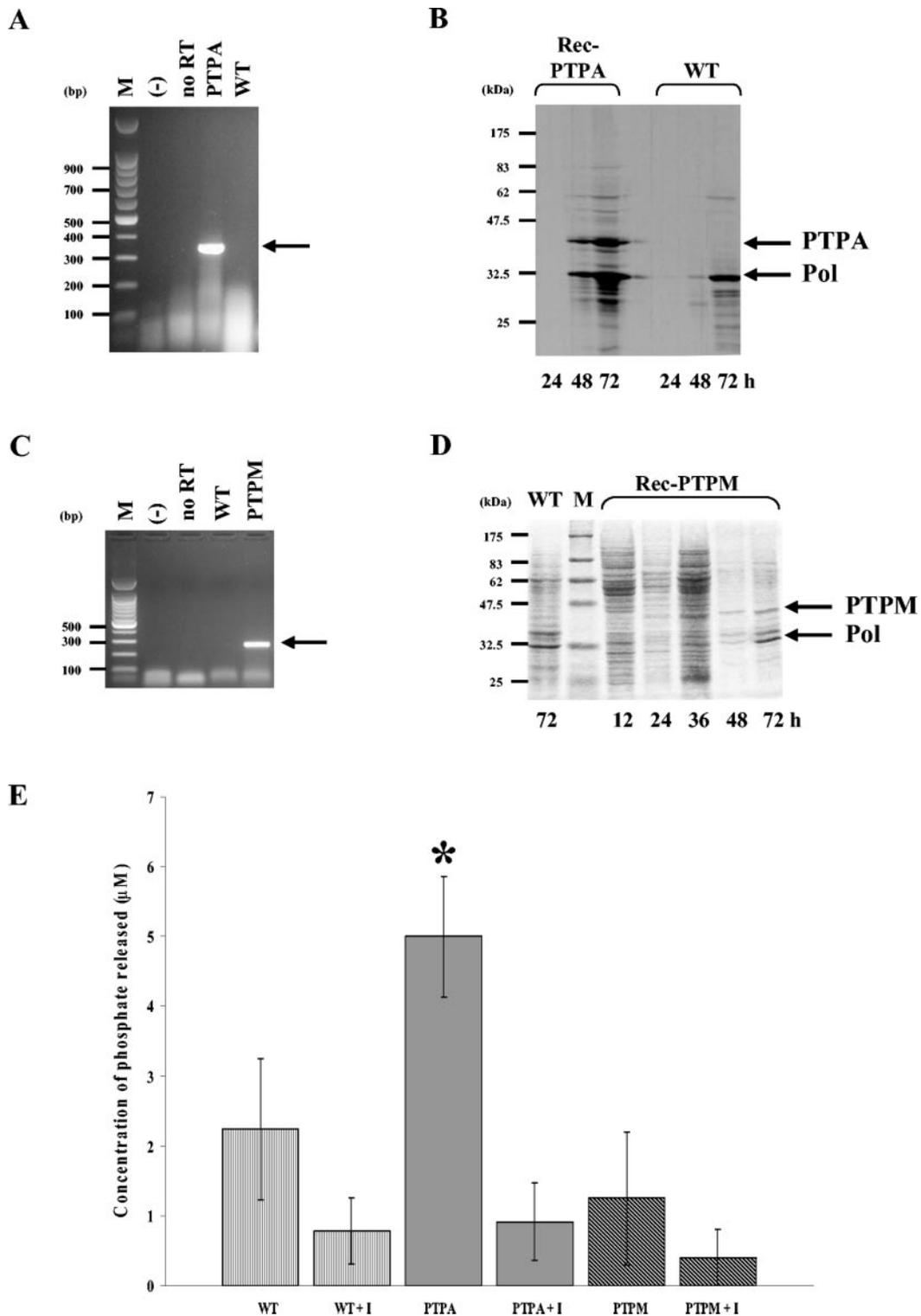


FIG. 6. Expression of CcBV PTPA and PTPM from baculovirus infections and screen for protein tyrosine phosphatase activity. Sf21 insect cells were infected with wild-type *A. californica* nucleopolyhedrovirus (lane WT) or recombinant baculovirus Rec-PTPA or Rec-PTPM. Infected cell RNA was collected and subjected to reverse transcription-PCR, and the products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels (A and C). PTPA- and PTPM-specific bands (A and C, respectively) are indicated with arrows. DNA markers (lane M), template-free reaction (lane -), and reaction lacking reverse transcriptase (lane no RT) are indicated. Panel B shows protein metabolic labeling and SDS-PAGE of proteins from Rec-PTPA-infected cells, and panel D shows SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining of proteins from Rec-PTPM-infected cells at various times postinfection (hours). Pol, *A. californica* nucleopolyhedrovirus very late structural protein. Infected cell lysates (E), precleared of free phosphate, were exposed to a synthetic tyrosine phosphopeptide (Promega), and liberated phosphate was measured spectrophotometrically at 600 nm. +I indicates the presence of a protein tyrosine phosphatase inhibitor. The asterisk denotes significantly more protein tyrosine phosphatase activity ($P = 0.02$) compared to wild-type-infected extracts.

gene characterized recently from another wasp of the Microgastrinae subfamily (a gene from *Glyptatanteles indiensis* resembling CcBV PTPQ) is ubiquitously expressed in parasitized hosts (12, 13). TnBV protein tyrosine phosphatase expression was also detected during the host-parasite interaction, the expression of TnBV PTP5 and/or PTP7 being observed by Northern blot analysis in the hemocytes and thorax of the parasitized host. Preliminary experiments suggest that some protein tyrosine phosphatases are also expressed in adult wasps, and more analyses are currently being performed to determine if expression is restricted to particular tissues, such as ovaries, where virus particles are produced.

Surprisingly, the protein tyrosine phosphatase genes do not necessarily encode a product with protein phosphatase activity. Indeed, several CcBV protein tyrosine phosphatases (CcBV PTPM, PTPS, PTPH, PTPD, PTPU, PTPO, PTPE, and PTPX) are mutated in the protein tyrosine phosphatase loop at a site critical for activity (the catalytic center cysteine residue). Only 15 out of 27 CcBV protein tyrosine phosphatases have a regular catalytic site. To determine if bracovirus protein tyrosine phosphatases actually comprised both functional and inactive phosphatases, a protein of each type (with a regular or mutated protein tyrosine phosphatase loop) was produced with the baculovirus expression system. Interestingly, protein tyrosine phosphatase activity was characterized from baculoviruses producing PTPA (with a regular protein tyrosine phosphatase loop) and not from those producing PTPM (mutated in the protein tyrosine phosphatase loop). The fact that CcBV PTPA is active as a protein tyrosine phosphatase strongly suggests that bracovirus protein tyrosine phosphatases have a biological function during host-parasite interactions. A protein tyrosine phosphatase without phosphatase activity might have a different biochemical function, such as trapping phosphorylated tyrosine proteins, as suggested by the example of the D2 domain of the human protein tyrosine phosphatase CD45, which is similarly altered in the protein tyrosine phosphatase loop and involved in CD45 substrate (T-cell receptor ζ) recruitment (33).

The diversity of the bracovirus protein tyrosine phosphatases, together with the exquisite specificity of characterized protein tyrosine phosphatases for their substrates conferred by the protein tyrosine phosphatase domain, theoretically provides the parasitoid with the opportunity to interfere with multiple pathways, in particular with those controlling host development and immunity.

The prothoracic glands of mature *H. virescens* larvae show a dramatic reduction in biosynthetic activity when parasitized by *T. nigriceps*, and this alteration is reproduced by TnBV infection (40, 48). The reduced ecdysone biosynthesis is associated to the underphosphorylation of key regulatory proteins of the prothoracicotropic hormone signal transduction pathway, which culminates with a translational block of host protein synthesis (48). The possibility that this alteration is induced by TnBV-encoded protein tyrosine phosphatases remains to be experimentally tested. Because prothoracicotropic hormone stimulates a number of rapid protein phosphorylations in the prothoracic glands via protein kinase A, mitogen-activated protein kinases, and other uncharacterized kinases (24), it is reasonable to speculate that these pathways could be targeted by virulence factors such as protein tyrosine phosphatases. This

might also prove to be true in other host-parasitoid systems, such as *M. sexta* parasitized by *C. congregata* (54), that become refractory to prothoracicotropic hormone stimulation (6, 7) even though prothoracic gland degeneration is not observed (5).

Bracovirus protein tyrosine phosphatases might also be able to disrupt the host signal transduction pathways controlling hemocyte cytoskeleton dynamics during encapsulation and phagocytosis, mimicking bacterial strategies of phagocytosis inhibition (17). Indeed, certain bacterial pathogens use protein tyrosine phosphatases as virulence factors to interfere directly with the host signal transduction pathway, mediated by β 1-integrin receptors, which control actin rearrangements. In particular, the protein tyrosine phosphatase virulence factor YopH and the cytotoxin YopE of *Yersinia pestis* (the agent that causes bubonic plague), which are injected by the type III secretion system into human macrophages, have dramatic effects on actin rearrangements (14), resulting in inhibition of phagocytosis (11). β -Integrin subunits were recently characterized in *Pseudoplusia includens*, strongly suggesting that this signaling pathway leading to actin rearrangements is conserved in lepidopteran hosts and might thus constitute a target for bracovirus protein tyrosine phosphatases (38).

Future work will be directed toward characterization of the molecular targets of the different bracovirus protein tyrosine phosphatases to identify which host signaling pathways they effectively alter and thus to determine how they are involved in the alteration of host immunity and development.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the European Union contract "Bioinsecticides from Insect Parasitoids" (QLK3-CT-2001-01586), by the Research Federative Institute for "Viruses and transposable elements," by the Italian Ministry of Education (MIUR FIRB, project no. RBNE01YXA8), and by a Special Project of the Italian Ministry of Agriculture and Forestry (MIPAF), "Risorse genetiche di organismi utili per il miglioramento di specie di interesse agrario e per un'agricoltura sostenibile."

We thank J. Dérisson and C. Ménotret for their involvement in *M. sexta* and *C. congregata* rearing in Tours and E. T. Caprioli for *H. virescens* and *T. nigriceps* rearing in Potenza.

REFERENCES

- Albrecht, U., T. Wyler, R. Pfister-Wilhelm, A. Gruber, P. Stettler, P. Heinger, E. Kurt, D. Schumperli, and B. Lanzrein. 1994. Polydnavirus of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): characterization, genome organization and time point of replication. *J. Gen. Virol.* **75**:3353-3363.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Andersen, J. N., O. H. Mortensen, G. H. Peters, P. G. Drake, L. F. Iversen, O. H. Olsen, P. G. Jansen, H. S. Andersen, N. K. Tonks, and N. P. Moller. 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7117-7136.
- Barford, D., A. J. Flint, and N. K. Tonks. 1994. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **263**:1397-1404.
- Beckage, N. E., and I. De Buron. 1993. Lack of prothoracic gland degeneration in developmentally arrested host larvae of *Manduca sexta* parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *J. Invertebr. Pathol.* **61**:103-106.
- Beckage, N. E., and D. B. Gelman. 2001. Parasitism of *Manduca sexta* by *Cotesia congregata*: a multitude of disruptive effects, p. 59-81. In J. P. Edwards and R. J. Weaver (ed.), *Endocrine interactions of parasites and pathogens*. BIOS, Oxford, United Kingdom.
- Beckage, N. E., D. A. Reed, D. B. Gelman, and T. J. Kelly. 1998. Effects of parasitization by *Cotesia congregata* on the brain-prothoracic gland axis of its host, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **44**:323-332.
- Beckage, N. E., F. Tan, K. W. Schleifer, R. D. Lane, and L. L. Cherubin. 1994. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydna-

- virus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **26**:165–195.
9. B eliveau, C., A. Levasseur, D. Stoltz, and M. Cusson. 2003. Three related TrIV genes: comparative sequence analysis and expression in host larvae and Cf-124T cells. J. Insect Physiol. **49**:501–511.
 10. Belle, E., N. E. Beckage, J. Rousselet, M. Poir e, F. Lemeunier, and J. M. Drezen. 2002. Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. J. Virol. **76**:5793–5796.
 11. Bleves, S., and G. R. Cornelis. 2000. How to survive in the host: the Yersinia lesson. Microbes Infect. **2**:1451–1460.
 12. Chen, Y. P., J. A. Higgins, and D. E. Gundersen-Rindal. 2003. Quantitation of a *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus gene expressed in parasitized host, *Lymantria dispar*, by real-time quantitative RT-PCR. J. Virol. Methods **114**:125–133.
 13. Chen, Y. P., P. B. Taylor, M. Shapiro, and D. E. Gundersen-Rindal. 2003. Quantitative expression analysis of a *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus protein tyrosine phosphatase gene in its natural lepidopteran host, *Lymantria dispar*. Insect Mol. Biol. **12**:271–280.
 14. DeVinney, I., I. Steele-Mortimer, and B. B. Finlay. 2000. Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. Trends Microbiol. **8**:29–33.
 15. Drezen, J. M., B. Provost, E. Espagne, L. Cattolico, C. Dupuy, M. Poir e, G. Periquet, and E. Huguet. 2003. Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. J. Insect Physiol. **49**:407–417.
 16. Dupas, S., M. W. Turnbull, and B. A. Webb. 2003. Diversifying selection in a parasitoid's symbiotic virus among genes involved in inhibiting host immunity. Immunogenetics. **55**:351–361.
 17. Ernst, J. D. 2000. Bacterial inhibition of phagocytosis. Cell Microbiol. **2**:379–386.
 - 17a. Espagne, E., C. Dupuy, E. Huguet, L. Cattolico, B. Provost, N. Martins, M. Poir e, G. Periquet, and J. M. Drezen. 2004. Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. Science **306**:286–289.
 18. Falabella, P., P. Varricchio, S. Gigliotti, A. Tranfaglia, F. Pennacchio, and C. Malva. 2003. *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus encodes a putative aspartyl protease highly expressed in parasitized host larvae. Insect Mol. Biol. **12**:9–17.
 19. Federici, B. A., and Y. Bigot. 2003. Origin and evolution of polydnaviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. J. Insect Physiol. **49**:419–432.
 20. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**:783–791.
 21. Fleming, J. G., and M. D. Summers. 1991. Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:9770–9774.
 22. Flint, A. J., T. Tiganis, D. Barford, and N. K. Tonks. 1997. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:1680–1685.
 23. Galibert, L., J. Rocher, M. Ravallec, M. Duonor-Cerutti, B. A. Webb, and A. N. Volkoff. 2003. Two *Hyposoter didymator* ichnovirus genes expressed in the lepidopteran host encode secreted or membrane-associated serine and threonine rich proteins in segments that may be nested. J. Insect Physiol. **49**:441–451.
 24. Gilbert, L. I., R. Rybczynski, and J. T. Warren. 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. Annu. Rev. Entomol. **47**:883–916.
 25. Glatz, R., O. Schmidt, and S. Asgari. 2003. Characterization of a novel protein with homology to C-type lectins expressed by the *Cotesia rubecula* bracovirus in larvae of the lepidopteran host, *Pieris rapae*. J. Biol. Chem. **278**:19743–19750.
 26. Hakes, D. J., K. J. Martell, W. G. Zhao, R. F. Massung, J. J. Esposito, and J. E. Dixon. 1993. A protein phosphatase related to the vaccinia virus VH1 is encoded in the genomes of several orthopoxviruses and a baculovirus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:4017–4021.
 27. Harwood, S. H., A. J. Grososky, E. A. Cowles, J. W. Davis, and N. E. Beckage. 1994. An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. Virology **205**:381–392.
 28. Harwood, S. H., J. S. McElfresh, A. Nguyen, C. A. Conlan, and N. E. Beckage. 1998. Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. J. Invertebr. Pathol. **71**:271–279.
 29. Herniou, E. A., J. A. Olszewski, J. S. Cory, and D. R. O'Reilly. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. Annu. Rev. Entomol. **48**:211–234.
 30. Je, Y. H., J. H. Chang, J. Y. Choi, J. Y. Roh, B. R. Jin, D. R. O'Reilly, and S. K. Kang. 2001. A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for generation of baculovirus expression vectors. Biotechnol. Lett. **23**:575–582.
 31. Johner, A., and B. Lanzrein. 2002. Characterization of two genes of the polydnavirus of *Chelonus inanius* and their stage-specific expression in the host *Spodoptera littoralis*. J. Gen. Virol. **83**:1075–1085.
 32. Kanost, M. R., M. K. Zepp, N. E. Ladendorff, and L. A. Andersson. 1994. Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. Arch. Insect Biochem. Physiol. **27**:123–136.
 33. Kashio, N., W. Matsumoto, S. Parker, and D. M. Rothstein. 1998. The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR-zeta in vivo. J. Biol. Chem. **273**:33856–33863.
 34. Kim, D., and R. F. Weaver. 1993. Transcription mapping and functional analysis of the protein tyrosine/serine phosphatase (PTPase) gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology **195**:587–595.
 35. Kordis, D., and F. Gubensek. 2000. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. Gene **261**:43–52.
 36. Krell, P. J., and D. B. Stoltz. 1979. Unusual baculovirus of the parasitic wasp *Apanteles melanoscelus*: isolation and primary characterization. J. Virol. **29**:1118–1130.
 37. Kroemer, J. A., and B. A. Webb. 2004. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. Annu. Rev. Entomol. **49**:431–456.
 38. Lavine, M. D., and M. R. Strand. 2003. Hemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. Insect Mol. Biol. **12**:441–452.
 39. Le, N. T., S. Asgari, K. Amaya, F. F. Tan, and N. E. Beckage. 2003. Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. **49**:533–543.
 40. Malva, C., P. Varricchio, P. Falabella, R. La Scaletta, F. Graziani, and F. Pennacchio. 2004. Physiological and molecular interaction in the host-parasitoid system *Heliothis virescens*-*Toxoneuron nigriceps*: current status and future perspectives. Insect Biochem. Mol. Biol. **34**:177–183.
 41. Muir, A., A. Lever, and A. Moffett. 2004. Expression and functions of human endogenous retroviruses in the placenta: an update. Placenta **25**(Suppl. A): S16–S25.
 42. Najarro, P., P. Traktman, and J. A. Lewis. 2001. Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. J. Virol. **75**:3185–3196.
 43. Neel, B. G., and N. K. Tonks. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. Curr. Opin. Cell Biol. **9**:193–204.
 44. Ohta, T. 2000. Evolution of gene families. Gene **259**:45–52.
 45. O'Reilly, A. M., L. K. Miller, and V. A. Luckow. 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York, N.Y.
 46. Pasquier-Barre, F., C. Dupuy, E. Huguet, F. Monteiro, A. Moreau, M. Poir e, and J. M. Drezen. 2002. Polydnavirus replication: the EP1 segment of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* is amplified within a larger precursor molecule. J. Gen. Virol. **83**:2035–2045.
 47. Pennacchio, F., P. Falabella, R. Sordetti, P. Varricchio, C. Malva, and S. B. Vinson. 1998. Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera: Braconidae). J. Insect Physiol. **44**:845–857.
 48. Pennacchio, F., C. Malva, and S. B. Vinson. 2001. Regulation of host endocrine system by the endophagous braconid *Cardiochiles nigriceps* and its polydnavirus, p. 123–132. In J. P. Edwards and R. J. Weaver (ed.), Endocrine interactions of insect parasites and pathogens. BIOS, Oxford, United Kingdom.
 49. Quicke, D. L. J. 1997. Parasitic wasps. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
 50. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N.Y.
 51. Savary, S., N. Beckage, F. Tan, G. Periquet, and J. M. Drezen. 1997. Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastinae) at potential recombinase binding sites. J. Gen. Virol. **78**:3125–3134.
 52. Schmidt, H. A., and A. Von Haeseler. 2003. Maximum-likelihood analysis using TREE-PUZZLE., unit 6.6. In A. D. Baxevanis et al. (ed.), Current protocols in bioinformatics. Wiley and Sons, New York, N.Y.
 53. Sheng, Z., and H. Charbonneau. 1993. The baculovirus *Autographa californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. J. Biol. Chem. **268**:4728–4733.
 54. Smith, W., J. Priester, and J. Morais. 2003. PTH-stimulated ecdysone secretion is dependent upon tyrosine phosphorylation in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. Insect Biochem. Mol. Biol. **33**:1317–1325.
 55. Stoltz, D. B. 1990. Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA. J. Gen. Virol. **71**:1051–1056.
 56. Swofford, D. L., G. J. Olson, P. J. Waddell, and D. L. Hillis. 1996. Phylogenetic inference, p. 407–514. In D. M. Hillis et al. (ed.), Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
 57. Tanaka, K., S. Tsuzuki, H. Matsumoto, and Y. Hayakawa. 2003. Expression of *Cotesia kariyai* polydnavirus genes in lepidopteran hemocytes and Sf9 cells. J. Insect Physiol. **49**:433–440.
 58. Theilmann, D. A., and M. D. Summers. 1986. Molecular analysis of *Camponotus sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. J. Gen. Virol. **67**:1961–1969.
 59. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for

- multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**:4876–4882.
60. **Trudeau, D., R. A. Witherell, and M. R. Strand.** 2000. Characterization of two novel *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in *Pseudaletia includens* haemocytes. *J. Gen. Virol.* **81**:3049–3058.
61. **Turnbull, M., and B. Webb.** 2002. Perspectives on polydnavirus origins and evolution. *Adv. Virus Res.* **58**:203–254.
62. **Van Vactor, D., A. M. O'Reilly, and B. G. Neel.** 1998. Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:112–126.
63. **Varricchio, P., P. Falabella, R. Sordetti, F. Graziani, C. Malva, and F. Pennacchio.** 1999. *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**:1087–1096.
64. **Vaughn, J. L., R. H. Goodwin, G. J. Tompkins, and P. McCawley.** 1977. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**:213–217.
65. **Volkoff, A. N., C. Béliveau, J. Rocher, R. Hilgarth, A. Levasseur, M. Duonorcerutti, M. Cusson, and B. A. Webb.** 2002. Evidence for a conserved polydnavirus gene family: ichnovirus homologs of the CsIV repeat element genes. *Virology* **300**:316–331.
66. **Whitfield, J. B.** 2002. Estimating the age of the polydnavirus/braconid wasp symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:7508–7513.
67. **Whitfield, J. B.** 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* **43**:129–151.
68. **Whitfield, J. B.** 2000. Phylogeny of microgastroid braconid wasps, and what it tells us about polydnavirus evolution, p. 97–105. *In* A. D. Austin and M. Dowton (ed.), *Hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control*. CSIRO Press, Melbourne, Australia.
69. **Whitfield, J. B., and S. Asgari.** 2003. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *J. Insect Physiol.* **49**:397–405.
70. **Wyder, S., F. Blank, and B. Lanzrein.** 2003. Fate of polydnavirus DNA of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* in the host *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* **49**:491–500.
71. **Wyder, S., A. Tschannen, A. Hochuli, A. Gruber, V. Saladin, S. Zumbach, and B. Lanzrein.** 2002. Characterization of *Chelonus inanitus* polydnavirus segments: sequences and analysis, excision site and demonstration of clustering. *J. Gen. Virol.* **83**:247–256.
72. **Yan, H., F. Yagyu, S. Okitsu, O. Nishio, and H. Ushijima.** 2003. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and Astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *J. Virol. Methods* **114**:37–44.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ARTICLE 3

Identification de la famille multigénique des protéines tyrosines phosphatases (PTP) au sein de 2 génomes bracoviraux (BV) et organisation génique.

L'analyse du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* et de plusieurs fragments du bracovirus de *Toxoneuron nigriceps* a permis de découvrir l'existence de 27 et 13 gènes de protéines tyrosines phosphatases, respectivement au sein des génomes des 2 bracovirus. Les 27 PTP de CcBV constituent la famille de gènes la plus importante en terme de nombre de gènes, et elles sont réparties sur seulement 7 cercles viraux ; les PTP de TnBV sont rencontrées sur 38 des 194 clones obtenus.

L'analyse des CDS de ces gènes a révélé que 23 séquences de CcBV et 8 de TnBV codent pour des domaines complets de PTP, tandis que 4 séquences de CcBV et 5 de TnBV codent pour des domaines tronqués. Toutes ces séquences présentent de fortes similarités (jusqu'à 50%) de l'ensemble de leur séquence avec de nombreuses protéines tyrosines phosphatases appartenant toutes aux PTP de type classique (notamment de type Meg2). L'organisation de ces gènes possédant un domaine PTP unique, ressemble à celle de la PTP1B des vertébrés. Aucun de ces gènes ne contient d'intron, ce qui a été confirmé par l'analyse de 6 ADNc (4 de CcBV PTP et 2 de TnBV PTP).

Parmi les séquences codant pour des domaines tronqués, certaines présentent un saut de phase, et d'autres sont interrompues par un codon d'arrêt, dans ce cas, la partie manquante du domaine est retrouvée en aval du codon d'arrêt, laissant supposer une mutation récente.), ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de pseudogènes.

Deux gènes de CcBV PTP ont subi des réarrangement plus complexes (plusieurs sauts de phase), ce qui suggère qu'il pourrait s'agir de pseudogènes.

Comparaisons et relations entre les PTP de bracovirus, d'invertébrés et de vertébrés.

Des alignements de séquences des PTP de bracovirus, humaines et d'insectes ont été réalisés (en supposant que la séquence traduite des gènes viraux correspond à la séquence génomique, comme l'analyse des ADNc l'a montré). Les 10 motifs caractéristiques du domaine PTP sont présents dans l'ensemble des PTP de bracovirus. Par contre, le site catalytique appelé boucle PTP ("PTP loop"), responsable de l'activité phosphatase, contient

un résidu cystéine à une position conservée, or, certaines PTP de bracovirus sont dépourvues de ce résidu cystéine.

Contrairement aux PTP cellulaires dans lesquelles le domaine phosphatase est généralement associé à d'autres domaines protéiques, les PTP de bracovirus sont composées uniquement d'un domaine phosphatase. De plus, les PTP de bracovirus sont globalement très divergentes entre elles au niveau peptidique (excepté 3 couples partagent plus de 84% de similarité), et plus divergentes que des PTP humaines entre-elles dont les localisations sub-cellulaires et les fonctions sont très différentes.

L'hypothèse selon laquelle l'ancêtre des bracovirus serait un baculovirus n'est pas corroborée par les comparaisons entre les PTP de différents virus. En effet, les PTP de bracovirus appartiennent à la famille des PTP classiques alors que les PTP de baculo- et de poxvirus sont des PTP plus courtes à "double-spécificité", les seules similarités sont observées au niveau du site catalytique phosphatase.

Les analyses phylogénétiques menées n'ont pas permis, en raison des fortes divergences séparant les séquences bracovirales, de reconstruire la phylogénie des bracovirus, ni de déterminer la protéine à l'origine des PTP bracovirales. Cependant, les PTP bracovirales se regroupent en clades, traduisant peut-être que plusieurs gènes de PTP partagent un ancêtre commun dont elles sont issues probablement par duplications successives.

Localisation des BV PTP au sein des génomes bracoviraux.

Les différents cercles d'ADN double-brin composant les génomes de CcBV et de TnBV ont été séparés par gel d'électrophorèse en champs inversés. Cette séparation a permis d'évaluer la taille du génome de TnBV, plus petit que celui de CcBV.

Chacun des 7 cercles viraux de CcBV porteur de gènes PTP a été identifié et localisé avec une sonde spécifique d'une de ses PTP.

La cartographie précise de plusieurs cercles porteurs de gènes PTP a été déterminée par analyses de Southern blot après digestion enzymatique de l'ADN viral (cf Séquençage de CcBV).

Expression des gènes de PTP dans les tissus de l'hôte parasité.

L'expression de nombreux gènes de CcBV PTP a été analysée par des expériences de transcription inverse suivies de PCR multiplex. Cette technique d'amplification permet

d'amplifier plusieurs fragments d'ADN dans un seul volume réactionnel, ici, 22 gènes ont été étudiés dans seulement 4 réactions différentes et dans 5 tissus/organes de l'hôte: le système nerveux, le tube digestif, le corps gras, les tubes de Malpighi et les hémocytes, 12 ou 24 h après le parasitisme. Tous les gènes analysés semblent être exprimés dans au moins un tissu/organe. Plus d'un tiers des gènes testés présentent un profil d'expression ubiquitaire, les autres étant exprimés dans certains tissus uniquement.

L'expression de 2 gènes très similaires de TnBV PTP a été testée par analyse de Northern blot d'ARNm d'hémocytes de l'hôte 3, 6, 12, 24 et 48 h après le parasitisme. Un signal d'hybridation avec une molécule de 1 kb est détecté dans les hémocytes à 24 et 48 h après le parasitisme.

Ces données suggèrent une implication des protéines tyrosines phosphatases dans l'altération de la physiologie des hôtes parasités.

Expression de 2 CcBV PTP dans des cellules d'insectes par le système baculovirus et détermination de l'activité d'une CcBV PTP.

Afin d'en savoir plus quant au rôle potentiel de ces protéines au cours du parasitisme, il fallait déterminer si elles présentaient une activité phosphatase. Deux PTP de CcBV, l'une possédant (CcBV PTPA) et l'autre dépourvue (CcBV PTPM) du résidu cystéine au niveau du site catalytique responsable de l'activité phosphatase, ont été produites en système d'expression baculoviral. Des cellules d'insectes infectées par du baculovirus recombinant de type PTPA et de type PTPM ont été produites et l'activité phosphatase de lysats de ces 2 types de cellules infectées a été mesurée. Le lysat de cellules infectées par du baculovirus recombinant de type PTPA libère significativement plus de phosphate libre que le lysat de cellules d'insectes infectées par du baculovirus de type sauvage (qui présente une activité car il produit des phosphatases d'un autre type). Par contre, le lysat de cellules infectées par du baculovirus recombinant de type PTPM libère autant de phosphate libre que le lysat de cellules d'insectes infectées par du baculovirus de type sauvage. La protéine CcBV PTPA est donc une tyrosine phosphatase fonctionnelle alors que la CcBV PTPM a probablement une autre fonction. Le parasitoïde peut en effet utiliser une PTP dépourvue de fonction phosphatase afin de séquestrer un substrat à déphosphoryler. Si la transduction d'un signal implique le passage d'une tyrosine de la forme phosphorylée (inactive) à la forme déphosphorylée (active) par l'intermédiaire d'une PTP, on peut supposer qu'une des techniques permettant de bloquer la voie de transduction du signal est de fixer en permanence

cette tyrosine. L'élément séquestrateur peut logiquement être une PTP dépourvue d'activité phosphatase.

EXPÉRIENCES COMPLÉMENTAIRES

Dans la partie Matériel et Méthodes de l'article 3, outre les expériences permettant de localiser les gènes CcBV PTP sur l'ensemble du génome viral par Southern blot des sondes spécifiques des gènes sur l'ensemble du génome viral séparé par FIGE, des expériences de cartographie précise, sur les segments viraux du bracovirus de *Cotesia congregata*, des gènes de protéine tyrosine phosphatase virales sont mentionnées, mais non présentées. Les expériences de Southern blot menées sont présentées dans la partie Vérification de l'assemblage du séquençage du génome bracoviral.

FAMILLE DES CYSTATINES

Article 4

A virus required for hymenopteran survival into its
lepidopteran host expresses genes encoding cystatins

E. Espagne, V. Douris, G. Lalmanach, B. Provost, L. Cattolico, K. Iatrou, J.-M.
Drezen et E. Huguet

Soumis à Journal of Biological Chemistry

CONTEXTE DE L'ARTICLE 4

L'existence d'un gène de cystatine appartenant au génome du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV) avait été montrée par des expériences de Northern inversé, et l'analyse des séquences du génome complet de CcBV a mis en évidence la présence, non pas d'un gène, mais de 3 gènes CcBV cyst dans le génome de CcBV.

Les particules virales du bracovirus contiennent 3 gènes appartenant à la même famille multigénique et qui codent pour des protéines de la super-famille des cystatines qui sont des inhibiteurs de cystéines protéases. Ces protéines codées par ces gènes possèdent des domaines protéiques caractéristiques des cystatines recensés dans les banques. Cette famille multigénique est originale puisqu'elle n'a encore jamais été décrite dans un autre génome bracoviral, ni même dans un génome viral. De plus, les cystatines ont déjà été identifiées comme immunomodulateurs utilisés par des nématodes filaires afin de contrôler la population de lymphocytes T de l'hôte. Elles apparaissent donc comme des candidats potentiels pour le rôle de facteurs de virulence capables d'interagir sur la physiologie de l'hôte parasité.

Les questions auxquelles il était important de répondre en premier lieu étaient les suivantes :

- **Quel est le profil d'expression spatio-temporel des gènes cystatines du bracovirus de *Cotesia congregata* dans les tissus de *Manduca sexta* parasité?**
- **Les protéines purifiées de la superfamille des cystatines codées par CcBV possèdent-elles l'activité d'inhibiteur de cystéine protéase?**

Ce travail a été réalisé suite à un travail inclus dans le cadre du projet européen "Bioinsecticides from Insect Parasitoids" auquel il a déjà été fait référence pour l'article précédent. Cette étude fait suite à l'analyse du génome complet du bracovirus de *Cotesia congregata*. Dans cet article, sont présentées les expérimentations de caractérisation de cette famille de gènes ainsi que la mise en évidence de l'activité cystéine protéase de CcBV cyst1. Les expériences de production et les tests d'activité ont été réalisés en collaboration avec une équipe grecque Institute of Biology, National Centre for Scientific Research Demokritos d'Athènes et une équipe tourangelle INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », Faculté de Médecine de Tours.

A VIRUS REQUIRED FOR HYMENOPTERAN PARASITE SURVIVAL INTO ITS LEPIDOPTERAN HOST EXPRESSES GENES ENCODING CYSTATINS

E. Espagne*¹⁺, V. Douris^{#+}, G. Lalmanach**, B. Provost*, L. Cattolico***, K. Iatrou[#], J-M. Drezen* and E. Huguet*[§]

* Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200, Tours, France

[#]Institute of Biology, National Centre for Scientific Research Demokritos, P.O. Box 60228, Aghia Paraskevi 15310 Athens, Greece

** INSERM U 618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », IFR 135 « Imagerie Fonctionnelle », Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 2 bis, Boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France

*** Genoscope, Centre national de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, 91057 Evry, France

¹E. Espagne present address : Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris Sud, Bat. 400, 91405 Orsay cedex, France

⁺ These authors contributed equally to the work described in this manuscript

[§]Corresponding author

Elisabeth Huguet

Telephone : 33 2 47 36 73 65

Fax : 33 2 47 36 69 66

Mail : elisabeth.huguet@univ-tours.fr

Running title

Bracovirus cystatins

Summary

Cotesia congregata is a parasitoid wasp that injects its eggs in the host caterpillar *Manduca sexta*. In this host-parasite interaction, successful parasitism is ensured by a third partner : a bracovirus. The *C. congregata* bracovirus (CcBV) is injected at the same time as the wasp eggs in the host hemolymph. Expression of viral genes alters the caterpillar’s immune defense

responses and blocks its development, resulting in the creation of a favourable environment for the survival and emergence of adult parasitoid wasps. Here, we describe the characterization of a novel CcBV multigene family which is highly expressed during parasitism and which encodes three proteins with homology to members of the cystatin superfamily. Cystatins are reversible inhibitors of cysteine proteases, and this report represents the first documented case for their presence in a viral genome. The expression and purification of a recombinant form of one of the CcBV Cystatins, Cystatin1, revealed that this viral cystatin is a functional cysteine protease inhibitor having potent inhibitory activity towards papain and cathepsins L and B. CcBV Cystatins are, therefore, likely to play a role in host caterpillar physiological deregulation by inhibiting host target proteases in the course of the host-parasite interaction.

Introduction

Parasitoid wasps are insects that parasitize other insects resulting in the death of the host (1). One of the most original strategies developed by these wasps in order to « disarm » their hosts is the injection of polydnviruses (PDVs) during oviposition (2-4). PDVs are divided in two genera, Ichnoviruses and Bracoviruses, that are associated with tens of thousands of species of endoparasitoid wasps belonging to two different families, Ichneumonids and Braconids, respectively (5). The wasp-PDV association is one of the rare examples of mutualism between eukaryotes and viruses (6). Virus DNA is integrated into the genome of the wasp and is transmitted vertically via the wasp chromosomes (7-12). Virus excision and replication occurs in the wasp ovaries, resulting in the production of a segmented genome composed of numerous double stranded DNA circles which are encapsidated singly or in groups (13, 14). Virus particles are injected into the insect host where viral gene expression occurs and in turn ensures parasitism success (13).

Cotesia congregata is a braconid endoparasitoid wasp of the tobacco hornworm caterpillar, *Manduca sexta*. The *C. congregata* Bracovirus (CcBV) is strongly implicated in many of the parasitism-induced effects observed in the parasitized host which include: inhibition of feeding and growth, developmental arrest, induction of pigmentation changes and alteration of host immunity (15). In parallel major qualitative and quantitative changes are observed in the host's hemolymph proteins (15). Multiple novel «early-proteins» (EPs) are detected in the caterpillar's hemolymph a few hours after parasitization and artificial injection of purified

virus mimics this induction of EPs (16, 17). One of these EPs, named EP1, was the only CcBV product to be described until recently (16-18), and the role of this protein in parasitism is still unknown. Recently, a large multigenic family comprising protein tyrosine phosphatases has been described in CcBV (19). Here we present the characterization of a novel CcBV multigene family encoding three proteins, Cystatin1-3, with homology to members of the cystatin superfamily of proteins. Cystatins are natural, tight-binding, reversible inhibitors of cysteine proteases. In recent years, new members of the superfamily have been characterized, including phytocystatins and insect cystatins (20-23).

Here, we present the first report on the presence of genes encoding cystatins in a virus. We show that one of the CcBV cystatins is a functional cysteine protease inhibitor. The putative targets of these viral cysteine protease inhibitors and their possible involvement in host physiological deregulation are discussed.

Experimental Procedures

Insect rearing

The parasitic wasps, *C. congregata* (Hymenoptera, Braconidae, Microgastrinae) were reared on their natural host, the tobacco hornworm, *M. sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) as previously described (16, 24).

DNA and RNA extractions

Virus DNA for plasmid genomic library construction, Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE) and Southern blot analyses was prepared following purification of virus particles by filtration, as previously described (15,17). For sequencing, viral DNA was extracted from 1000 female wasp ovaries and amplified using the rolling circle DNA polymerase TempliPhi (Amersham Biosciences). CcBV dsDNA circles were sequenced using a shotgun strategy (E. Espagne *et al.*, 2004).

Total RNA was extracted from fourth instar *M. sexta* larvae parasitized by *C. congregata*, at different time intervals after parasitoid oviposition (2 ovipositions checked visually), and from synchronous non-parasitized controls. Extractions were performed on fat body or midgut using the Qiagen RNA/DNA maxi or midi kit according to the manufacturer's instructions. Nerve cord and brain (nerve chain) or Malpighian tubules were stored in RNAlater solution

(Qiagen, France) after dissection, and when sufficient material was obtained, extractions were performed using the Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. Haemocytes were collected by centrifugation at 300 x g for 5 minutes and RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit. PolyA⁺ mRNAs were selected using the Qiagen Oligotex mRNA midi kit. Wasp RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit.

FIGE analysis

Two hundred and fifty ng of virus DNA were separated at 4°C by FIGE (Biorad, France) as previously described (19). Separated virus DNA circles were transferred onto nylon membranes (Biotrans ICN, France) in NaOH 0.4 N as described in the manufacturer's protocol. Hybridization was carried out overnight at 65°C using as probe a labelled cystatin1 cDNA fragment. Membranes were washed twice in 2x SSC, 0.1 % SDS and 0.2x SSC, 0.1 % SDS for 20 min at 65° C before autoradiography.

Preparation and screening of CcBV genomic and cDNA libraries

EcoRI, *HindIII* and *EcoRI-HindIII* fragments of the CcBV genome were cloned into the plasmid pBluescriptKS by standard procedures (25). DNA minipreparations of individual clones were screened by a reverse Northern approach, using ³²P-labelled first strand cDNA probes synthesized from polyA⁺ mRNA isolated from *M. sexta*, 24 h after parasitoid oviposition. One µg of polyA⁺ RNA was reverse transcribed into first strand cDNA using the Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase (Life Technologies, France). The single strand cDNA was then labelled using standard procedures (25).

A cDNA library was constructed from total RNA isolated from *M. sexta* fourth instar larvae 24 hours after parasitization, using a SMART cDNA library construction kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. The library was screened using the 6 kb long *EcoRI* fragment from the E6 CcBV genomic DNA clone previously isolated by reverse Northern, using standard methodology (25). Individual positive plaques from the secondary screening were isolated in agar plugs, eluted in SM buffer and then converted to pTriplEx2 in *E. coli* (BM25.8) by *in vivo* excision and circularization to form a complete plasmid from the recombinant phage. DNA sequencing reactions of selected clones were carried out using the ABI PRISM BigDye Terminator V3.0 Sequencing kit (Applied Biosystems, France) according to the manufacturer's instructions on an ABI PRISM 3100 Avant sequencer (Applied Biosystems, France). DNA and protein sequences were subjected to computer Blast analysis (26).

Southern and Northern blot analysis

Two hundred ng of viral DNA was electrophoretically separated on a 0.8% TAE agarose gel. Twenty µg of RNA was electrophoretically separated on a 1.2 % TAE non-denaturing agarose gel (27). Separated DNA or RNA was transferred onto nylon membrane (Biotrans ICN, France) in 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris pH 8, or in 20x SSC, respectively, as described in the manufacturer's protocol. The filters were hybridized overnight at 65°C with labelled cDNA cystatin1 fragment probe. Membranes were washed twice in 2x SSC, 0.1 % SDS and 0.2x SSC, 0.1 % SDS for 20 min at 65° C before autoradiography. The intensities of radioactive signals were measured on membranes using an Instant Imager (Packard, France).

Production of recombinant Cystatin1 protein in insect cells

The expression cassette pIE1/153A (28, 29) was employed for expression of recombinant Cystatin1 in insect cells. Plasmid pIE1/153A.cyst was generated as follows. Primers CystF (5'- TCGAGCGGCCGCAATGGGCAAGGAATATCGAG-3') and CystR (5'- TGGCGCGGCCGCTTAACAATTTTCATATCCCAAC-3') containing the first 19 and last 23 bases of the Cystatin1 gene, respectively, with extensions for *NotI* restriction sites (underlined), were used in a PCR amplification reaction using *Pfu* polymerase (Promega) and the relevant pTripLex2 clone as template. The reaction (35 cycles, denaturation at 94 °C for 40 sec, annealing at 50 °C for 40 sec, extension at 72 °C for 80 sec) yielded a product containing the Cystatin1 open reading frame (ORF) flanked by *Not I* restriction sites. This was digested and cloned in the unique *NotI* site of pBluescript (Stratagene) using standard procedures (25). After sequence verification, the fragment was subcloned into the unique *NotI* site of pIE1/153A, to yield pIE1/153A.cyst.

BTI-TN-5B1-4 cells (HighFiveTM; Invitrogen) adapted to ESF 921 protein-free insect cell culture medium (Expression Systems Inc.) were routinely subcultured weekly at 28 °C. Transfection of insect cells using Lipofectin reagent (Invitrogen) was performed using an optimized procedure previously described (30). In brief, 5 x 10⁵ cells/mL in 2 mL medium were used. The medium was replaced with a transfection solution that contained 30 µg/mL Lipofectin and 5 µg/mL plasmid DNA. After 5 hours, the transfection solution was replaced with fresh medium. For the generation of stably transformed cell lines, HighFiveTM cells were cotransfected with pIE1/153A.cyst and pBmA.PAC, a plasmid conferring resistance to

puromycin in lepidopteran cells (P. Farrell and K. Iatrou, unpublished), at molar ratios of 100:1. Forty-eight hours post-transfection, the culture medium was replaced with fresh medium containing 15 µg/mL puromycin. Then, the cells were subcultured weekly in puromycin-containing medium until stably transformed polyclonal populations were established (approximately four weeks). A stably transformed cell line was maintained in ESF 921 containing 50 µg/mL gentamycin (Invitrogen) and 15 µg/mL puromycin (Applichem). For suspension cultures (typically 100 mL volume in spinner flasks), the medium was also supplemented with Pluronic F-68 (Sigma) to a final concentration of 0.2%. Cell culture supernatants were tested for inhibitory activity using the enzymatic (papain) assay described below, and cells were further amplified in large-scale stationary and suspension cultures for protein purification.

Purification of recombinant Cystatin1

Recombinant Cystatin1 was purified by affinity chromatography using a modification of previously described protocols (31, 32). Briefly, cell culture supernatants (from cultures grown typically for 7-10 days to a cell density of 2×10^6 cells/mL), were concentrated approximately tenfold by ultrafiltration in a Centricon Plus ultrafiltration apparatus (Millipore Biomax-5; MW Cut-Off 5000). After desalting with a PD10 column (AP Biotech) in binding buffer (50 mM Sodium Phosphate, 0.1% Brij 35, 1 mM EDTA, pH 6.5), the protein fraction was mixed with 2 mL immobilized carboxymethylated papain (CM-papain; Calbiochem) pre-equilibrated with binding buffer, and incubated overnight at room temperature. The gel matrix was poured into a column and washed with the same buffer until the A_{280} was zero (typically 5-10 bed volumes). Bound material was eluted with elution buffer (50 mM K_2HPO_4/KOH , 0.1% Brij 35, 1 mM EDTA, pH 11.5) in 1 mL fractions. To each fraction, 0.2 mL of 1 M Tris HCl, pH 7.3 and 0.3 mL of 80% glycerol were added and samples were stored at -20 °C. Protein samples from all purification steps were analyzed on 18% SDS-polyacrylamide gels stained either with Coomassie Blue or with silver. The purity and homogeneity of the purified recombinant Cystatin1 were assessed by N-terminal peptide sequencing using a Procise sequencer (Applied Biosystems, France).

Inhibition of cysteine proteases by cell culture supernatants and recombinant Cystatin1

E-64 was obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin le Fallavier, France), Z-Phe-Arg-AMC and DTT from Bachem (Weil am Rhein, Germany), papain (EC 3.4.22.2) from Boehringer

(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and human cathepsin B (EC 3.4.22.1) and human cathepsin L (EC 3.4.22.15) from Calbiochem (VWR International, Pessac, France). Cathepsins and papain were activated in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0, containing 2 mM DTT and 1 mM EDTA for 5 minutes at 37°C prior to kinetic measurements (spectrofluorimeter Kontron SFM 25), and their active sites were titrated with E-64 (33), using Z-Phe-Arg-AMC as substrate (excitation wavelength: 350 nm; emission wavelength: 460 nm).

Papain (1 nM), cathepsin B (1.8 nM) or cathepsin L (0.6 nM), respectively, were incubated in the presence of increasing amounts of recombinant Cystatin1 (0-100 nM) for 30 minutes at 30 °C in 50 µL of assay buffer, before Z-Phe-Arg-AMC (3,3 µM) was added (to a final volume of 300 µL), and the residual amidolytic activity was measured by monitoring the release of the 7-amino 4-methylcoumarin group. The same protocol was repeated with human tissue kallikrein (Sigma-Aldrich), bovine trypsin and chymotrypsin (Roche Molecular Biochemicals) and pepsin (Sigma-Aldrich) (final concentration : 10 nM) using experimental conditions reported elsewhere (34).

For activity assays of cell culture supernatants, papain (10 nM) was incubated for 10 minutes at room temperature in 450 µL of stock assay buffer (0.1 M NaPhosphate buffer pH 6.0, 2 mM DTT) with 50 µL of cell culture supernatants (10% v/v) before adding Z-Phe-Arg-AMC (Bachem Biochimie, SARL, France) to a final concentration of 100 µM. The relative activity of each supernatant was determined by comparison with a standard curve (without cell culture medium) or with curves obtained from control cell culture supernatants.

Results

Isolation of CcBV cystatin genes expressed in parasitized host *M. sexta*

In order to isolate viral genes expressed in parasitized host caterpillars, a CcBV genomic library was constructed. Clones obtained from this library were subsequently screened by reverse Northern, using as a probe radiolabelled cDNA derived from polyA⁺ mRNA of *M. sexta* larvae, 24 hours post-parasitization. Upon sequencing, one of the hybridising clones, E6 (a 6 kb long *Eco*RI insert) was found to encompass an ORF encoding a putative protein with homology to the cystatin superfamily (see below). Subsequent screening of a cDNA library generated from parasitized *M. sexta* larvae, using as probe the E6 clone, resulted in the

isolation of two cDNA clones, designated cystatin1 and cystatin2. The sequence of cystatin1 was identical to that contained in the E6 genomic fragment, while that of cystatin2 was similar (Figure 1.A).

The viral genome harbours three cystatin genes

We undertook the mapping of the cystatin genes in the viral genome. Field inversion gel electrophoresis of the viral genome, followed by Southern blot analysis, revealed that only one segment of the CcBV genome, a DNA circle of estimated linear size 19 kb (Figure 2), contained sequences related to the cloned cystatin genes. Subsequent sequencing of the entire viral genome (French national sequencing centre, Genoscope, Evry) confirmed that the two cloned cystatin genes are indeed located on a single circle, and further revealed the existence of a third cystatin gene (cystatin3) on the same circle (circle 19, 18768 bp) (Figure 2B). Further hybridization experiments confirmed that no other cystatin-like sequences are present in the CcBV genome besides those identified on circle 19 (data not shown).

Sequence characterization of the CcBV cystatin genes and products

Analysis of the genomic and cDNA sequences of cystatin1 and cystatin2 genes and the genomic sequence of the cystatin3 gene, revealed that no introns are present in these genes. Furthermore, the analysis showed that all three genes are very similar: cystatin1 exhibits 89 % similarity to cystatin2 and cystatin3, and cystatin2 and 3 show 94 % identity (blastn program NCBI) (Figure 1.A).

The cystatin1, 2 and 3 genes encode proteins of 135, 134, and 134 amino acids (theoretical molecular masses of 15,42, 15,45 kDa and 15,47 kDa), respectively, which are related to members of the cystatin superfamily of proteins. They harbour hydrophobic N-terminal domains, putatively signal peptides, with potential cleavage sites at residues 22 (Cystatin1) and 24 (Cystatin2 and 3) (35) (Figure 1.B). Cystatin1 possesses a putative tyrosine phosphorylation site at position 121-127, and cystatins 3 and 2 contain one and two potential Asn-linked glycosylation sites, respectively (Prosite, Expasy: <http://www.expasy.org/prosite/>), in accord with published reports suggesting that at least some cystatins are phosphorylated (36) and glycosylated (37).

Most notable, however, is the existing conservation of the presumed inhibitory domains of the proteins which include a N-terminal Glycine residue, at position 28 (Figure 1.B) corresponding to amino acid 6 of the mature protein (see below) and Glycine 9 of the mature chicken cystatin protein (Figure 3.B), the QX(V)XG consensus motif beginning at position

72, Proline 118 (for cystatin1 only) and a Tryptophane residue at position 119 at the C-terminus (Figure 1.B and 3.B). X-ray crystallographic analysis of the chicken cystatin suggests that these domains form a «wedge» that can interact with the active site of papain (38). Cystatin1 shows the strongest conservation in the consensus QVVAG pentapeptide, whereas Cystatin2 and Cystatin3 harbour a QVLYG sequence (Figure 1.B and 3.B).

Related cystatin proteins

The cystatin superfamily consists of three families, the stefins (or type 1), the cystatins (type 2) and the kininogens (type 3) (21). The CcBV cystatins show most resemblance to the type 2 cystatins particularly type 2 chicken and quail cystatins, human cystatins C and D, mouse cystatin 10 and filarial parasite *Brugia malayi* cystatin Cpi-1 (Figure 3). Strong similarities were also observed with the type 3 cystatin domain of bovine kininogen (Figure 3).

Type2 cystatins are generally secreted proteins consisting of a single domain with 4 cysteine residues potentially forming two disulphide bonds (21). Well-described type 2 cystatins include chicken cystatin and human C, D, S, SA and SN cystatins (21) which contain two conserved disulphide bridges at their C-terminal domains (21, 39). In Cystatin1, however, the first disulphide bridge does not have the same spacing as the avian or mammalian type 2 cystatins (Figure 3.B) while Cystatin2 and 3 contain an extra cysteine between the disulphide bridges (Figure 1.B and 3.B).

Because the CcBV genome is integrated in the parasitoid wasp genome, we compared the sequences of CcBV cystatins to known insect cystatins (Figure 3.A), in an effort to deduce whether the viral cystatin genes may have been acquired from the wasp host genome. Comparisons with four *Drosophila* genes encoding putative cystatins CG15369 (Q9W370-DROME), CG8066 (Q9VF13-DROME), CG31313PA (Q85ZNI-DROME) (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) and Cys (CYTL-DROME) (40) and genes encoding flesh fly Sarcocystatins (*Sarcophaga peregrina* (41) and *S. crassipalpis* (42)) have revealed the existence of similarities between Cystatin1 and SarcocystatinA of *S. peregrina* (Figure 3.A). Comparison with the predicted amino acid sequence for a cystatin superfamily member identified in the mosquito genome database (Anobase) revealed 25 % identity and 44 % similarity with Cystatin1, and similar values with Cystatin2 and 3 (See Figure 3A). Furthermore, a sequence identified in the honeybee genome, which encodes a putative cysteine protease containing a type 2 cystatin domain at its N-terminus showed 29 % identity and 47 % similarity to Cystatin1, and similar values with Cystatin2 and 3. These data suggest that the CcBV cystatins may, in fact, have a cellular origin.

Expression profile of the bracovirus cystatins in the parasitized host

We initially determined the expression profile of all three cystatin genes in the parasitized host by Northern blot analysis using cystatin1 cDNA as a probe. A time-course experiment using RNA extracted from parasitized host fat-body showed that the cystatin genes are expressed throughout parasitism (Figure 4A). Expression could be detected as early as 40 minutes after wasp oviposition and reached a peak at 12 hours post-parasitism. After 3 days, a severe drop in expression was observed (Figure 4A). The level of expression of these viral genes was estimated to reach 50 times the level of host actin, which was used as a control in these experiments (Figure 4A). No hybridization signals were obtained in non-parasitized host tissues.

Analysis of the expression of viral cystatins in other tissues of parasitized host showed that cystatin genes are most abundantly expressed in haemocytes at 24 h post-parasitism (Figure 4B). Strong expression was also observed in the nerve cord and brain at 48 h, as well as in Malpighian tubules at 24 h post-oviposition, while only weak expression was detected in the midgut. No cystatin RNAs could be detected in male wasps, and only a barely detectable signal was observed in female wasps (data not shown) suggesting that the cystatin genes are highly expressed in parasitized caterpillars only.

To determine whether all three cystatin genes are expressed in the host during parasitism, RT-PCR was performed on mRNA obtained from 24 h parasitized caterpillar fat body, using primer couples specific for each gene. The results demonstrated that all three viral cystatins are expressed during parasitism (data not shown).

Recombinant Cystatin1 expression and purification

Expression of recombinant Cystatin1 was achieved using a lepidopteran cell-based expression system. Transient expression in insect cells was performed and three days post-transfection, cell culture supernatants were assayed for inhibition of papain. The supernatants exhibited significant inhibition of papain compared to non-transfected cell supernatants suggesting that the lepidopteran cell system enables both expression and secretion of an active form of Cystatin1 into the culture medium.

High-level expression of Cystatin1 was obtained in a stably transformed cell-line, SF-C100. The recombinant Cystatin1 present in the supernatants of SF-C100 cell cultures was subjected to purification on the basis of its affinity for immobilized inactivated (carboxymethylated) papain. Flow-through, wash and eluate fractions were examined

electrophoretically (Figure 5) and also assayed for papain inhibitory activity. A single band at the expected molecular weight was observed in the eluate fractions (lanes 6-7 of Figure 5), and the same fractions (but not the flow-through or wash fractions) were found to cause significant inhibition in functional assays (see below). N-terminal protein sequencing was performed on this eluate fraction. The N-terminal peptide sequence «SYSIKGGRH» confirmed that the single band observed in the eluate fractions corresponds to Cystatin1 and that the protein is cleaved after position 22 as predicted (see Figure 2.B), yielding the first amino acid of the mature form.

Inhibitory activity of CcBV Cystatin1

Recombinant CcBV Cystatin1 was assayed for protease inhibitory activity with representative cysteine proteases of the C1 family (clan CA). Cystatin1 exhibited a highly potent inhibitory activity towards papain, with approximately 80 % inhibition being achieved at an equimolar ratio of enzyme to inhibitor (Figure 6A). Cathepsin B and L activities towards Z-Phe-Arg-AMC were also dramatically inhibited, but to a lesser extent than papain (Figure 6B). On the other hand, the amidolytic activities of tissue kallikrein hK1, pepsin, trypsin and chymotrypsin were not affected by recombinant Cystatin1 (data not shown), strongly supporting the notion that native CcBV Cystatin1 is a specific cysteine proteinase inhibitor.

Discussion

Cystatin superfamily members have been described in numerous organisms (21, 22). Here, we report for the first time, the isolation and characterization of three cystatin genes associated with a virus, the *C. congregata* bracovirus (CcBV). All three genes encode type 2 cystatin superfamily members, and all are expressed at a high level during *C. congregata* parasitism of its host *M. sexta*. Expression and purification of a recombinant form of CcBV Cystatin1 demonstrated that this viral cystatin is a functional cysteine protease inhibitor, with potent inhibitory activity towards papain and cathepsins B and L.

Braconid wasp species harboring polydnviruses have been shown to form a monophyletic group, “the microgastroid complex”, composed of over 17500 species (43). One of the current hypotheses concerning the origin of these wasp-bracovirus associations is that they originated from the integration of an ancestral bracovirus in the chromosome of an ancestor wasp that lived approximately 70 million years ago (44). Under this hypothesis, all contemporary

bracoviruses should have common genes inherited from the ancestral virus. Indeed, conserved genes have been identified both in closely related wasp species (45, 46) and even in two bracoviruses (*Toxoneuron nigriceps* Bracovirus (TnBV) and CcBV) of two braconid subfamilies (19). However, to date, no cystatin genes have been described in polydnviruses other than CcBV, and we already have evidence that cystatins are not present in the TnBV genome (F. Pennacchio, personal communication). Furthermore, CcBV cystatins are much less divergent than other CcBV protein families (19). Altogether, these data suggest that a cystatin gene was acquired by CcBV relatively recently (since CcBV and Tn BV diversification) and was subsequently duplicated in the viral genome.

The fact that the CcBV cystatins show significant homology to insect cystatins and that they have the conserved structure of cellular type 2 cystatins suggests that CcBV acquired these gene(s) from the wasp genome. Moreover, because cystatin genes have not been described in other bracovirus families or, in fact, in any other virus, it is unlikely that these gene(s) were present in the genome of the ancestral bracovirus. Accordingly, the most plausible scenario is that an ancestral CcBV cystatin gene was acquired by the integrated form of the virus genome from the host wasp genome by recombination or transposition, and further duplicated during evolution. Lastly, because many PDV genes described contain intronic sequences (47) and all reported cellular cystatin genes also contain introns of characteristic size and location (22), the absence of introns from CcBV cystatin genes suggests that the virus acquired the ancestral gene(s) via integration of cDNA. A similar suggestion has been made for the case of the vinnexin genes of the polydnvirus of the parasitoid wasp *Campoletis sonorensis* (47).

Multigene families, of frequent occurrence in polydnviruses (13, 48), are thought to arise from gene duplication events (49). It is likely that a high selection pressure is exerted on PDV genes resulting in efficient evasion of host defence systems or expansion of the wasp's host-range. Closely related genes may provide a redundancy in function, or allow synergistic effects on different host targets. Alternatively, different gene variants may be required for wasp development in different host species. The presence of multiple genes may also enable abundant expression of important functional genes in the parasitized host, particularly in the absence of viral replication in the host caterpillar.

Several lines of evidence suggest that cystatins are likely to play important roles in alteration of host caterpillar physiology. Recombinant CcBV Cystatin1 is a functional and specific cysteine protease inhibitor. In addition, cystatin genes are rapidly and highly expressed in the host caterpillar after wasp oviposition and expression is maintained throughout parasitism.

This early and prolonged expression could be indicative of a role of cystatins in the early steps of host physiological disruption, as well as in the maintenance of this perturbed state. Relevant to this is the fact that injection of purified virus in *M. sexta* larvae reproduces many of the parasitism-induced effects, including partial arrest of host larval development and induction of host immunosuppression (15, 50). Furthermore, cellular cystatins have been reported to act as potential regulators of development and as immunomodulatory proteins (see below). Accordingly, we now need to understand the precise role of viral cystatins in the modulation of the host physiology.

Programmed destruction of tissues that are no longer needed, or that need to be renewed (i.e. during moulting or metamorphosis), is an essential developmental process in which cysteine proteases have been reported to be involved (51-56). In the filarial nematode, *Onchocerca volvulus* and the flesh fly, *S. peregrina*, successful development relies on the production of cysteine proteases (51-53, 57). Interestingly, in both systems endogenous cystatins have been described, Onchocystatin and SarcocystatinA, respectively, which are believed to act as modulators of cysteine protease activity during development, thereby protecting newly developing larval or adult tissues (41, 58-60). In *M. sexta*, however, little is known on the proteolytic enzymes involved in larval-pupal molts. Host caterpillar developmental arrest during parasitism is, in general, attributed to endocrine deregulation, which is in part due to the wasp itself, but also to the virus (61). However, the direct action of CcBV on host endocrine targets has yet to be demonstrated. Therefore, it will be interesting to test whether viral cystatins target host cysteine proteases involved in larval-pupal molts, thereby interfering at a level downstream of viral/parasitoid endocrine deregulating factors.

Cystatins have also been described as immunomodulatory molecules (62, 63). In filarial nematodes, for example, cystatins appear to account for a major portion of the immunosuppressive activity of secreted filarial proteins, and are, therefore, considered as major pathogenicity factors of filariae (64-66). Filarial cystatins induce $\square\square\square\text{-}\alpha$, followed by a strong production of the immunosuppressively acting IL10 cytokine, and interfere with specific and non-specific proliferation of host T cells (63, 64). Interestingly, Schierack and collaborators (2003) suggest that the induction of TNF- α by nematode cystatins could involve the binding of cystatin proteins to Toll-like receptors (64). In *Drosophila*, the Toll pathway is implicated in the antimicrobial response (67). Although little is known about insect anti-viral defense mechanisms, there is data suggesting that CcBV reduces the efficiency of *M. sexta* anti-viral immunity (68). It would, therefore, be interesting to

investigate whether CcBV cystatins could be involved in the modulation Toll-like pathways involved in anti-viral immunity.

In conclusion, in addition to the recently characterized CcBV protein tyrosine phosphatases (19), CcBV cystatins represent a new family of CcBV proteins for which a functional activity (specific protease inhibitor) has been established. Our attention will now be directed towards the identification of the targets of the viral cystatins in the host caterpillar. The characterization of such targets will help us to deduce the host physiological processes affected by viral cystatins, and may help us to establish parallels between the different virulence strategies used by very different types of parasites in the host take-over process.

References

1. Quicke, D. L. J. (1997) *Parasitic wasps*, Chapman & Hall, London
2. Stoltz, D. B., Krell, P. J., Summers, M. D., and Vinson, S. B. (1984) *Intervirology* **21**, 1-4
3. Beckage, N. E. (1998) *Parasitology* **116**, 57-64
4. Beckage, N. E., Gelman, D. B., Chappell, M. A., and Alleyne, M. (1997) *J. Insect Physio.* **43**, 143-154
5. Fleming, J. A. G. W., and Krell, P. J. (1993) in *Parasites and pathogens of insects* Vol. 1, pp. 189-225, Academic Press, New York
6. Whitfield, J. B. (1990) *Parasitology Today* **6**, 381-384
7. Belle, E., Beckage, N. E., Rousselet, J., Poirié, M., Lemeunier, F., and Drezen, J-M. (2002) *Journal of Virology* **76**, 5793-5796
8. Cui, L., and Webb, B. A. (1996) *J. Gen. Virol.* **77**, 797-809
9. Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Schumperli, D., and Lanzrein, B. (1996) *J. Gen. Virol.* **77**, 2873-2879
10. Fleming, J. A. G. W., and Summers, M. D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9770-9774
11. Savary, S., Beckage, N. E., Tan, F., Periquet, G., and Drezen, J. M. (1997) *J. Gen. Virol.* **78**, 3125-3134
12. Xu, D., and Stoltz, D. B. (1991) *J. Virol.* **65**, 6693-6704
13. Webb, B. A. (1998) in *The insect viruses*, pp. 105-139, Plenum publishing corporation, New York
14. Albrecht, U., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R., Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Kurt, F., Schümperli, D., and Lanzrein, B. (1994) *J. Gen. Virol.* **75**, 3353-3363
15. Beckage, N. E., Tan, F. F., Schleifer, K. W., Lane, R. D., and Cherubin, L. L. (1994) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **26**, 165-195
16. Harwood, S. H., and Beckage, N. E. (1994) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**, 685-698
17. Harwood, S. H., Grosovsky, A. J., Cowles, E. A., Davis, J. W., and Beckage, N. E. (1994) *Virology* **205**, 381-392
18. Harwood, S. H., McElfresh, J. S., Nguyen, A., Conlan, C. A., and Beckage, N. E. (1998) *J. Invertebr. Pathol.* **71**, 271-279

19. Provost, B., Varricchio, P., Arana, E., Espagne, E., Falabella, P., Huguet, E., La Scaleia, R., Cattolico, L., Poirié, M., Malva, C., Olszewski, J. A., Pennacchio, F., and Drezen, J.-M. (in press) *J. of Virology*
20. Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, K., and Arai, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 16793-16797
21. Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., and Nathanson, C. M. (2003) *Biochem. Soc. Symp.* 179-199
22. Brown, W. M., and Dziegielewska, K. M. (1997) *Protein Sci.* **6**, 5-12
23. Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1990) *J. Mol. Evol.* **30**, 60-71
24. Pasquier-Barre, F., Dupuy, C., Huguet, E., Monteiro, F., Moreau, A., Poirie, M., and Drezen, J. M. (2002) *J. Gen. Virol.* **83**, 2035-2045.
25. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manuel*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
26. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
27. Volkoff, A. N., Cerutti, P., Rocher, J., Ohresser, M. C., Devauchelle, G., and Duonor-Cerutti, M. (1999) *Virology* **263**, 349-363
28. Farrell, P. J., Lu, M., Prevost, J., Brown, C., Behie, L., and Iatrou, K. (1998) *Biotechnol. Bioeng.* **60**, 656-663
29. Lu, M., Farrell, P. J., Johnson, R., and Iatrou, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30724-30728
30. Keith, M. B., Farrell, P. J., Iatrou, K., and Behie, L. A. (2000) *Biotechniques* **28**, 148-154
31. Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J., Sayers, C. A., Sunter, D. C., and Barrett, A. J. (1983) *Biochem. J.* **211**, 129-138
32. Brillard-Bourdet, M., Nguyen, V., Ferrer-di Martino, M., Gauthier, F., and Moreau, T. (1998) *Biochem. J.* **331 (Pt 1)**, 239-244
33. Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M., Hanada, K.L. (1982) *Biochem. J.* **201**, 189-198.
34. Lecaille, F., Weidauer, E., Juliano, M. A., Bromme, D., and Lalmanach, G. (2003) *Biochem. J.* **375**, 307-312
35. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) *Protein Eng.* **10**, 1-6
36. Laber, B., Krieglstein, K., Henschen, A., Kos, J., Turk, V., Huber, R., and Bode, W. (1989) *FEBS Lett.* **248**, 162-168
37. Esnard, A., Esnard, F., Guillou, F., and Gauthier, F. (1992) *FEBS Lett.* **300**, 131-135
38. Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., and Turk, V. (1988) *Embo J.* **7**, 2593-2599
39. Sali, A., and Turk, V. (1987) *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **368**, 493-499
40. Delbridge, M. L., and Kelly, L. E. (1990) *FEBS Lett.* **274**, 141-145
41. Saito, H., Suzuki, T., Ueno, K., Kubo, T., and Natori, S. (1989) *Biochemistry* **28**, 1749-1755
42. Goto, S. G., and Denlinger, D. L. (2002) *Gene* **292**, 121-127
43. Whitfield, J. B., and Asgari, S. (2003) *J. Insect Physiol.* **49**, 397-405
44. Whitfield, J. B. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 7508-7513
45. Le, N. T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F. F., and Beckage, N. E. (2003) *J. Insect Physiol.* **49**, 533-543
46. Whitfield, J. B. (1998) *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 129-151
47. Turnbull, M., and Webb, B. (2002) *Adv. Virus Res.* **58**, 203-254

48. Kroemer, J. A., and Webb, B. A. (2004) *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 431-456
49. Beliveau, C., Laforge, M., Cusson, M., and Bellemare, G. (2000) *J. Gen. Virol.* **81**, 1871-1880
50. Beckage, N. E., and Gelman, D. B. (2004) *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 299-330
51. Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 911-914
52. Homma, K., Kurata, S., and Natori, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15258-15264
53. Lustigman, S., McKerrow, J. H., Shah, K., Lui, J., Huima, T., Hough, M., and Brotman, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30181-30189
54. Shiba, H., Uchida, D., Kobayashi, H., and Natori, M. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **390**, 28-34
55. Takahashi, N., Kurata, S., and Natori, S. (1993) *FEBS Lett.* **334**, 153-157
56. Xu, Y., and Kawasaki, H. (2001) *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **130**, 393-399
57. Kurata, S., Saito, H., and Natori, S. (1992) *Dev. Biol.* **153**, 115-121
58. Suzuki, T., and Natori, S. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 5115-5120
59. Suzuki, T., and Natori, S. (1986) *Insect Biochem.* **16**, 589-595
60. Lustigman, S., Brotman, B., Huima, T., Prince, A. M., and McKerrow, J. H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 17339-17346
61. Dushay, M. S., and Beckage, N. E. (1993) *J. Insect Physiol.* **39**, 1029-1040
62. Verdot, L., Lalmanach, G., Vercruysse, V., Hoebeke, J., Gauthier, F., and Vray, B. (1999) *Eur. J. Biochem.* **266**, 1111-1117
63. Vray, B., Hartmann, S., and Hoebeke, J. (2002) *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 1503-1512
64. Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K., and Hartmann, S. (2003) *Infect. Immun.* **71**, 2422-2429
65. Maizels, R. M., Blaxter, M. L., and Scott, A. L. (2001) *Parasite Immunol.* **23**, 327-344
66. Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B., and Lucius, R. (1997) *Eur. J. Immunol.* **27**, 2253-2260
67. Hoffmann, J. A. (2003) *Nature* **426**, 33-38
68. Wasburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. T., Beckage, N. E., and Volkman, L. E. (2000) *J. Insect Physiol.* **46**, 179-190

Acknowledgements

We are very grateful to M. Brillard-Bourdet (INSERM U618, Tours, France) for N-terminal peptide sequencing. Cindy Ménoret is gratefully acknowledged for taking care of the insects. This work was funded by an EC grant (QLK3-CT-2001-01586 "Bioinsecticides from insect parasitoids"). BP was supported by a grant from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de la Technologie, VD was a recipient of a NCSR « Demokritos » post-doctoral fellowship.

Footnote

Cystatin nucleotide and protein sequences have been deposited in the EMBL database under Circle19 Accession #: AJ632321 .

Figure Legends

Figure 1:

Nucleotide and amino acid sequence alignment of the CcBV cystatins

A. Nucleotide sequence alignment of the three CcBV cystatins. Differences in nucleotide sequences are boxed.

B. Amino acid sequence alignment of the three CcBV preprotein Cystatins. The potential cleavage site for Cystatin 2 and Cystatin 3 (same site) and Cystatin 1 are indicated by white triangles. The three active sites which are the hallmarks of cystatins are indicated by stars : G (residue 28), Qx(V)xG (starting residue 72) and W (residue 119). The four cysteine residues, potentially forming two disulphide bonds, are indicated by black lozenges.

Figure 2:

Mapping of *Cotesia congregata* bracovirus cystatins in the viral genome.

A. Field Inversion Gel Electrophoresis of 250 ng of viral DNA followed by hybridization using cystatin1 cDNA as a probe. The unique hybridization signal observed corresponds to the circle (indicated by a white asterisk) of estimated linear size 19 kb. The 2.5 kb ladder from Biorad was used as linear molecular weight marker in this experiment.

B. Restriction map of CcBV circle19, harbouring the three cystatin genes.

Figure 3:

Pairwise blast and multiple sequence alignment of CcBV cystatins with « insect » and « non-insect » cystatins

A. Pairwise blast of CcBV cystatins with « insect » and « non-insect » cystatins. Numbers indicate percentage identity / percentage similarity. Preprotein sequences were compared.

B. Multiple sequence alignment of CcBV cystatins with related cystatins using the Clustalw program (<http://clustalw.genome.ad.jp/>) combined with the BoxShade Server

(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Preprotein sequences were compared in this alignment. The numbering refers to CcBV Cystatins with number one being the first amino acid of the signal peptides. The three conserved active sites of cystatins are indicated by stars beneath the consensus sequence : G residue , Qx(V)xG motif and (P)W residues. The cysteine residues in conserved positions are indicated by black lozenges.

Agam : *Anopheles gambiae* (mosquito, Diptera ; EST AJ284933), Amel : *Apis mellifera* (honeybee, Hymenoptera ; Amel_1.1contig2738), Bm : *Brugia malayi* (filarial nematode ; Accession number AAC47623), Bt : *Bos taurus* (bovine, Accession number P01045), Gg : *Gallus gallus* (chicken ; Accession number NP_990831), Hs : *Homo sapiens* (Accession number NP_000090), Mm : *Mus musculus* (mouse ; Accession number NP_067380), Sp : *Sarcophaga peregrina* (flesh fly, Diptera ; Accession number P31727).

Figure 4:

Expression profile of CcBV cystatin genes in parasitized *Manduca sexta*.

A. Time-course experiment using RNA extracted from non-parasitized or parasitized *Manduca sexta* fat body.

B. Tissue-specific expression using RNA extracted from non-parasitized or parasitized *Manduca sexta*.

20 µg of RNA were loaded in each lane. Cystatin1 cDNA was used as probe. As a control, blots were hybridized with *Manduca sexta* actin and levels of expression were measured using an Instant Imager (Packard).

Figure 5:

Silver-stained SDS-PAGE (18 %) gel of 20 µL samples from several steps of the Cystatin1 protein purification procedure.

1: Concentrated-desalted cell culture supernatant before application to CM-papain matrix, 2: Post-binding flow-through fraction, 3-4: Wash fractions (5 bed volumes each), 5-8: Eluate fractions (1 bed volume each), 9: CM-papain matrix beads after elution, 10: Molecular weight standard. The arrow points at the prominent protein band that migrates at the expected MW for Cystatin1 (see text).

Figure 6:

Cysteine protease inhibitory activity of CcBV Cystatin1

Various concentrations of Cystatin1 were incubated with (A) papain (1 nM) (B) cathepsin B (1.8 nM) or cathepsin L (0.6 nM). The relative activity of each cysteine protease was determined in presence of the recombinant Cystatin1. Incubation of each protease with the substrate and without addition of Cystatin1 corresponds to 100 % activity of the enzymes.

A.

cystatin2	1	ATGGGCAAGGAATATCGAGTGGCATTTC	TACTTTTCCTTGGTCTGGCACTACTAATAGCA
cystatin3	1	ATGGGCAAGGAATATCGAGTGGCATTTC	TACTTTTCCTTGGTCTGGCACTACTAATAGCA
cystatin1	1	ATGGGCAAGGAATATCGAGTGGCATTTC	TACTTTTCCTTGGTCTGGCACTACTAATAGCA
cystatin2	61	GAAGCCAGATCCAGTTTCCTGGGAAAAAGACAGCCGATTTCCGTT	AACGATTACAGGGGTC
cystatin3	61	GAAGCCAGATCCAGTTTCCTGGGAAAAATAGAGCCGATTTCCGTT	GACGATTACAGGGGTC
cystatin1	61	GAAGCCAGATCCAGTATCAAGGGAAGACATCCGATTTCCGTT	GACGATTACAGGGGTC
cystatin2	121	ATAAAGCTGCTGAAATCATCATGAAGAAGATAAACCAAGAACATCATGGTAAAAAGAGCA	
cystatin3	121	ATAAAGCTGCTGAAATCATCATGAAGAAGATAAACCGAGAACATCATGGTAAAAAGAGCG	
cystatin1	121	ATAAAGCTGCTGAAATCATCATGAAGAAGATAAACCGAGAACATCATGGTAAAAAGAGCG	
cystatin2	181	TTAATGCTGGTCAAAATTGAAAAGCAGAGTCCCAAGTTT	TATACCGAATCAAGTATTTT
cystatin3	181	TTAATGCTGGTCGAAATTGAAAAGCAGAGTACCAAGTTT	TATACCGAATCAATATTTT
cystatin1	181	TTAATGCTGGTCGAAATTGAAAAGCAGAGTCCCAAGTTG	TAGCCGGAATCAAGTATTTT
cystatin2	241	CTTGATTTGAAAGTGGTGAGAGACATTTGTTGCAACAGAATCTCAGTCG	AACTGCAAG
cystatin3	241	CTTGATTTGAAAGTGGTGAGAGACATTTGTTGCAACAGAATCTCAGTCG	AACTGCAAG
cystatin1	241	CTTAATTTGAAAGTGGTGAGAGACATTTGTTGCTACAGAACTCAATCG	AACTGCAAG
cystatin2	301	CTAGATAAAAACCTGCTTACAAATCTTGTATGTGCTTTTGT	TATTCGGGATTATGGCGG
cystatin3	301	CTAGATAAAAACCTGCTTACAAATCTTGTATGTGCTTTTGT	TATTCGGGATTATGGGAG
cystatin1	301	CTAGATAAAAACCTGCTTACAAATCTTGTATGTGCTTTTGT	TATTCGGGACCATGTTG
cystatin2	361	AGTATAAAGGAATCCCATTTATAATTGTAGGAATATGAAAATTGA---	
cystatin3	361	ACTATAAAGGATCCCATTTATAATTGTAGGAATATGAAAATTGATA	
cystatin1	361	AGATAAAGCTGGAATCAAAATTATAATTGTAGGAATATGAAAATTGATA	

B.

cystatin2	1	MGKEYRVAFVFLFLGLALLIAEARSSFLGKROPISVND	SGVIEAAEIIIMKRINDEHHGKRA
cystatin3	1	MGKEYRVAFLLFLGLALLIAEARSSFLGKLEPISVDD	SGVIKAAEIIIMKKINREHHGKRA
cystatin1	1	MGKEYRVAFLLFLGLALQIAEASYSIKGRHPISVDD	SGVIKAAEIIIMKKINREHHGKRA
cystatin2	61	LMLVQIERAESQVLYGIKYFLDLKVGGERHCLQNLSR	KCKLDKNCYPKSCIAFVYSGLWG
cystatin3	61	LMLVEIEKAEYQVLYGINYFLDLKVGGERHCLRONLSR	KCKLDKNCYKSCIAFVYSGLWE
cystatin1	61	LMLVEIEKAESQVVAQGIKYFLNLKVGGERHCLLQNLNR	SKLDKNCYPKSCSAFVYSAPWL
		*****	◆ ◆ ◆ *
cystatin2	121	SIKESHYNCREYEN-	
cystatin3	121	TIKESHYNCREYEN-	
cystatin1	121	RKLEFNYNCREYENC	◆

Figure 1.

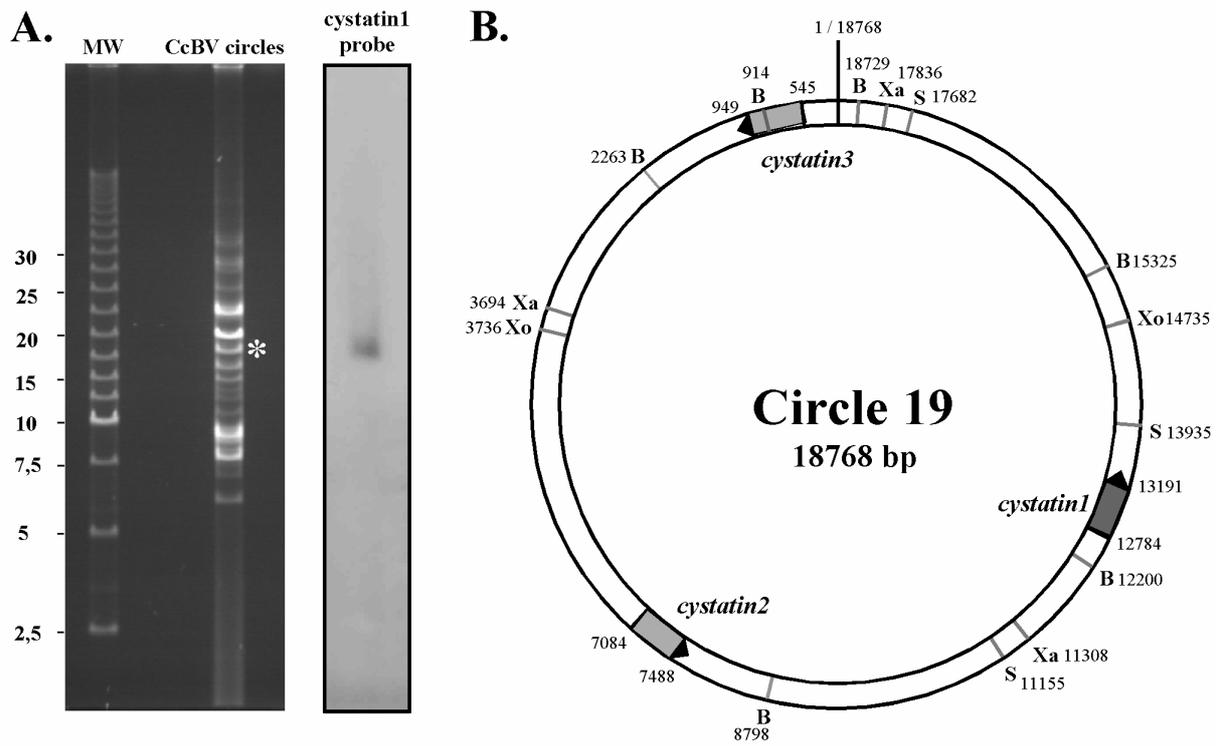


Figure 2.

A.

	CcBV Cys1	CcBV Cys2	CcBV Cys3	Sp SarcocysA	Amel	Agam	Gg Cys	Bm Cpi-1	Hs CysC	Mm Cys10	Bt Kininogen
CcBVCys1	100	76/85	78/83	30/46	29/47	25/44	28/51	28/50	28/48	26/41	29/44
CcBVCys2		100	77/84	NS	27/48	23/46	28/50	26/48	23/42	25/44	26/46
CcBVCys3			100	NS	27/46	26/50	28/50	26/46	25/52	27/46	27/46

B.

```

CcBVCys      1 MGKEYRVAFLVFLGLALLIAEARS-----SFLGKRQPISVNDSGVIEAAEIIIMK
CcBVCys3     1 MGKEYRVAFLVFLGLALLIAEARS-----SFLGKIEPISVDDSGVIKAAEIIIMK
CcBVCys1     1 MGKEYRVAFLVFLGLALQIAEASY-----STKGRHPISVDDSGVIKAAEIIIMK
Agam         1 MASPLR--SLLFLLAVLAVAWAATPKQG-----PRMLGAPEEADANEEGVRRALDFAVS
HsCysC       1 MAGPLR--APLLLLLAVLAVLAVSPAGSSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVRRALDFAVG
GgCys        1 MAGARG--CVVLLAAALMLVGAVLGSSEDR-----SRLLGAPVPVDENDEGLQRALQFAMA
MmCys10      1 MASLLSPSPVLAVALTLTLAVIPEASTNAEAKQVVLGGVEPADPKDKEVQKVVKFAVR
Amel         1 -----GASSYIDINNPTVQELANKGLK
BmCpi-1      1 -----MFFPIVWLSVLLIISKSFAR-----EIRLSRATYNEDDEEIQEVAEKAME
BtKininogen  1 -----PPMVCVGCCKPPIPVDSPDLNLEALNHSIA
SpSarcocysA  1 ----MKYVLLILCVITLATVAYAQP-----QCVGCPSEVK-GDKLQSEETLNKS
consensus    1 mg r vl l l ia a ilgg pi v d gv ka e am

CcBVCys2     50 RINQEHHGKRALMLVIERAESQVLYGIKYFLDLKVGGERHCLQN---LSRKCKLNKN--
CcBVCys3     50 KINREHHGKRALMLVEIEKAEYQVLYGINVFLDLKVGGERHCLRN---LSRKCKLDKN--
CcBVCys1     50 KINREHHGKRALMLVEIEKAEQVAVAGIKYFLNLKVGGERHCLLN---LNRKSKLDKN--
Agam         53 EYNKGSNDAYHSRAIQVVRARKQLVAGVNYFLDVEMGRITCTKSQT--NLTDCPFHDQPH
HsCysC       59 EYNKASNDMYHSRALQVVRARKQIVAGVNYFLDVDELGRITCTKTQTP--NLDNCPFHDQPH
GgCys        54 EYNRASNDKYSSRVVRVISAKRQLVSGIKYILQVEIGRITCPKSSG--DLQSCFHDPEPE
MmCys10      61 TYNDMDNDLYLSKPIRLMSASQVAVAGKNYLKIQLGRITCTKTES--NLVDCPFNEQPD
Amel         23 KFSENSEGSNEPMIVEIVDASRQVVSQYLYKIRVKLGTSNCPKGT---KEKCOLKEG--
BmCpi-1      46 QVNDQTRYRNLYKLVVISAQTQVAVGKIKYLLTILAAPPTCRKGAVMNPMKCTIDSS--
BtKininogen  29 KLNAEHDGTFYFKIDTVKKATVQVVGGLKYSIVFIARETTCSKGSNEELTKSCEINIHG-
SpSarcocysA  45 LSKLAAGDGPTYKLVKINSATTQVVSQSKDVINADLKDEND-----
consensus    61 n rlv ivrA QvvaGikyfl l vg ttc k c l n
          ****
          ◆ ◆

CcBVCys2     105 -CPYKSCIAFVYSGLWG-SIKESHYNCREYEN-----
CcBVCys3     105 -CLYKSCIAFVYSGLWE-TIKGSHYNCREYKN-----
CcBVCys1     105 -CPYKSCSAFVYSAPWL-RKLETNYNQWEYENC-----
Agam         111 LMRKALCSFQIYSVPWKGTHSLTKFS-----
HsCysC       117 LKRKAFCSFQIYAVPWQGTMTLSKSTQDA-----
GgCys        112 MAKYTTCTFVYSIPWLNQIKLLESKQO-----
MmCys10      119 QQKRVIQNFQINVAPWLNKMSMTNFNQYNF-----
Amel         77 -TEIKELFSIWSQPWIDKGSFKITINCDLNRRKR---
BmCpi-1      104 -KPTKQFKIEVWSAPWQNTFKVTLT-----
BtKininogen  88 --QILHCDANVYVVPWEEKVYPTVNCQPLGQTSLM----
SpSarcocysA  86 --KTKTCDITISQPWLENGIEVTFNCPGEPKVVKKHSA
consensus    121 k c vvs pW i s y c
          ◆ ** ◆

```

Figure 3.

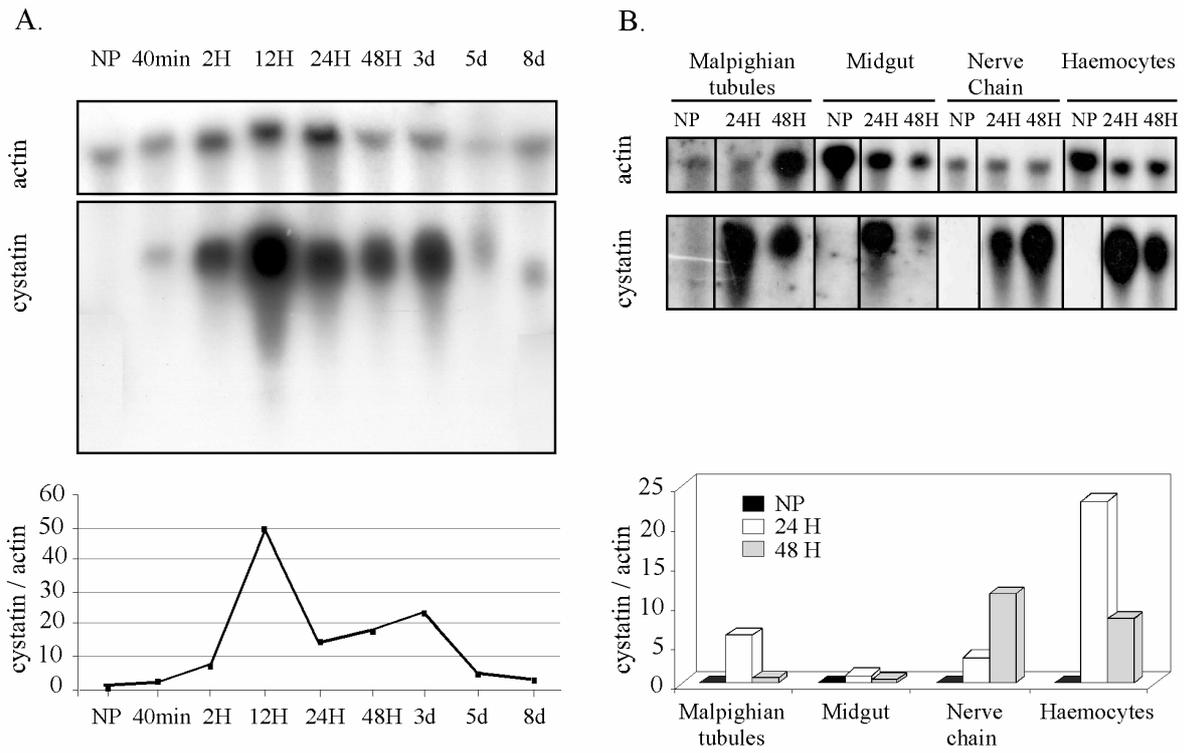


Figure 4

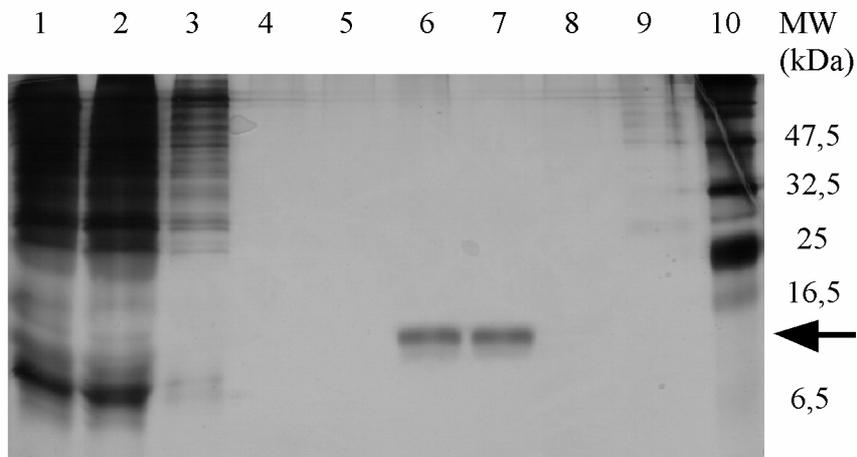


Figure 5.

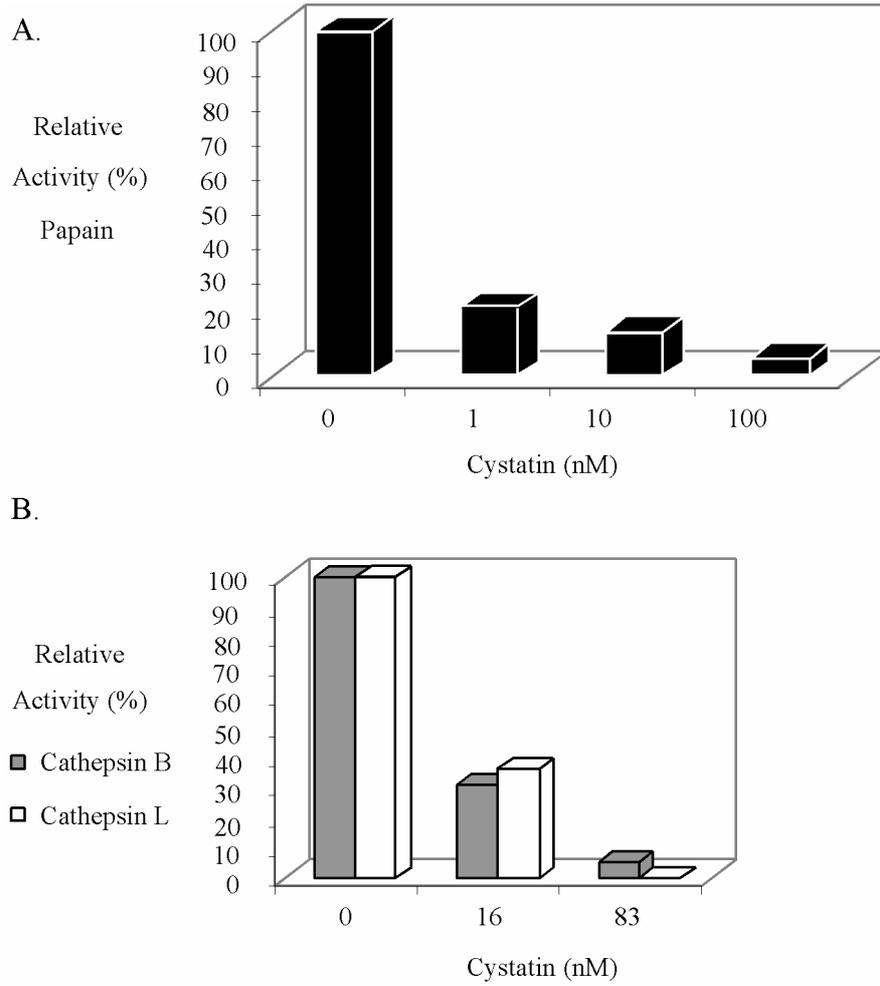


Figure 6.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ARTICLE 4

Isolement des gènes CcBV cyst exprimés dans l'hôte *Manduca sexta* parasité

Une banque d'ADN purifié de CcBV a été réalisée afin d'identifier les gènes viraux exprimés au cours du parasitisme dans l'hôte *Manduca sexta* par *Cotesia congregata*. Par Northern inversé, les clones viraux de la banque ont été systématiquement hybridés avec une sonde radiomarquée correspondant à l'ADNc des ARN polyadénylés de *Manduca sexta* 24 h post-parasitisme. Un des clones identifiés, E6, a été séquencé, il correspond à une protéine de la famille des cystatines. Ensuite le criblage d'une banque d'ADNc de *Manduca sexta* parasité a permis d'isoler 2 clones d'ADNc, l'un, nommé CcBV cystatin1, contenant une séquence identique au fragment d'ADN viral E6, et l'autre contenant une séquence similaire au fragment d'ADN viral E6, nommé CcBV cystatin2.

Localisation des 3 gènes CcBV cyst dans le génome viral

La cartographie de ces gènes CcBV cystatin est réalisée par analyse en Southern blot d'ADN viral purifié séparé par gel d'électrophorèse en champs inversés. De façon surprenante, un seul signal d'hybridation sur l'ADN viral est obtenu avec la sonde radiomarquée des gènes CcBV cystatin. Le séquençage de l'intégralité du génome viral a révélé que, non seulement, les 2 gènes CcBV cystatin sont situés sur le même cercle (cercle 19 de 18768 pb), mais que ce cercle contient un troisième gène codant une protéine de la famille des cystatines, CcBV cystatin3.

Organisation nucléotidique et peptidique des gènes CcBV cyst

Les 3 gènes CcBV cyst partagent de fort taux de similarité : CcBV cyst1 partage 89% de similarité avec CcBV cyst 2 et CcBV cyst3, et CcBV cyst2 et CcBV cyst3 partage un taux de 94% de similarité. Ces 3 gènes sont dépourvus d'intron. Ils codent pour 3 protéines de la famille des cystatines. Leurs séquences révèlent la présence de domaines hydrophobes N-terminaux, de peptides signaux ainsi que de sites de clivage. Et surtout, les 3 CcBV cyst ont conservé le domaine inhibiteur de cystéine protéase, la CcBV cyst1 possédant la séquence la

plus proche du consensus ; consensus qui confère aux cystatines de poulet la capacité d'interagir avec le site actif de la papaine (une cystéine protéase).

Les autres familles de cystatines

La superfamille des cystatines est divisée en 3 familles : les stefins (type I), les cystatines (type II) et les kininogènes (type III). Les CcBV cystatines ressemblent aux cystatines de type II, notamment de vertébrés (poulet, homme, souris...) ou d'invertébrés. Le génome du CcBV étant intégré au génome du parasitoïde, les séquences de CcBV ont été comparées à des séquences de cystatines d'insectes, afin de tester l'hypothèse de l'acquisition à partir du génome du parasitoïde. Les comparaisons des séquences nucléotidiques de gènes cystatines de la drosophile et de la mouche de la viande (*Sarcophaga peregrina*) avec les gènes CcBV cyst présentent un taux de similarité de 30% entre CcBV cyst1 et la sarcocystatine. La comparaison des séquences peptidiques des 3 CcBV cyst avec celles de cystatines de l'abeille et de l'anophèle révèle des taux d'identité compris respectivement entre 27 et 29% et 23 et 26% d'identité, et des taux de 28% avec une cystatine de poulet. Ces chiffres suggèrent une acquisition des gènes viraux d'origine cellulaire. L'absence d'intron dans les gènes CcBV cyst suggère que ces gènes bracoviraux ont pour origine un événement de duplication d'un ADNc et non d'un ADN génomique (les cystatines de type II déjà identifiées possédant un intron), mais les taux d'identité partagés par les séquences ne permettent pas de déterminer si l'organisme source était invertébré ou vertébré.

Profil d'expression des CcBV cyst dans l'hôte parasité

Le profil d'expression au cours du temps des 3 gènes CcBV cyst dans le corps gras de l'hôte *Manduca sexta* parasité a été déterminé par analyse en Northern blot par l'hybridation d'une sonde commune aux 3 gènes. Une expression est détectée dès 40 min après le parasitisme, atteint un pic à 12 h (d'une intensité 50 fois supérieure à l'expression de l'actine utilisée comme contrôle) et subit une forte chute au bout de 3 jours. Dans les autres tissus testés, l'expression des gènes CcBV cyst est très fortement exprimée dans les hémocytes, fortement dans les tubes de Malpighi 24 h après le parasitisme, et dans le système nerveux 48h après le parasitisme, par contre seule une faible expression a été détectée dans le tube digestif. Des expériences de RT-PCR ont permis la vérification de l'expression de chacune

des cystatines virales au cours du parasitisme ; les cystatines sont exprimées très faiblement dans les femelles de parasitoïde, mais aucune expression n'est détectée chez les mâles.

Expression et purification de CcBV cyst1 recombinant

La protéine CcBV cystatin1 a été exprimée dans un système de cellules de lépidoptère. Les surnageants des cultures cellulaires possèdent une capacité significative d'inhibition de la papaïne. Ces résultats révèlent que les cellules de lépidoptère utilisées pour mener la culture permettent non seulement l'expression mais aussi la sécrétion d'une protéine active. La protéine produite a été purifiée par affinité sur une colonne de papaïne. L'analyse de la séquence N-terminale de la protéine purifiée a montré que la protéine est bien tronquée au site niveau du site prédit.

Activité inhibitrice de CcBV cyst1

Des tests permettant d'évaluer le pouvoir inhibiteur de la cystatine produite ont été menés sur la papaïne, les cathepsine de types B et L, ainsi que des expériences permettant de tester son activité inhibitrice sur les activités amydolytiques de plusieurs protéines. Il s'avère que la CcBV cyst1 inhibe très fortement la papaïne et les cathepsines. Par contre, les activités amydolytiques des autres substrats ne sont pas inhibées. Ces données montrent que la protéine CcBV cyst1 est un inhibiteur de cystéine protéase fonctionnel donc une cystatine.

FAMILLE DES ANKYRINES

ANALYSES PRELIMINAIRES DE LA FAMILLE DE GENES ANKYRINE DU BRACOVIRUS DE CCBV

La dernière famille multigénique étudiée est la famille des ankyrines. Le séquençage a révélé la présence de 6 gènes ankyrine au sein du génome du bracovirus de *Cotesia congregata*. Les protéines ankyrines présentent une similarité significative avec des protéines cactus de drosophile qui sont des inhibiteurs de facteurs de transcription (Rel et Dif) impliqués dans la voie Toll de l'immunité innée de la drosophile. Les gènes CcBV ank sont par contre tous tronqués, et présentent une forte ressemblance avec un gène de poxvirus utilisé pour réprimer la réponse immunitaire du vecteur viral. Compte tenu de ces données, on pense que ces gènes sont susceptibles d'être impliqués dans des mécanismes d'immunosuppression de l'hôte parasité par *Cotesia congregata*.

La caractérisation de ces gènes et de leur expression au cours du parasitisme est une première étape avant d'aborder l'étude de leur fonction. L'objectif de cette étude était de répondre aux questions suivantes :

- **Les 6 gènes ankyrines du génome du bracovirus de *C. congregata* sont-ils exprimés dans l'hôte parasité ?**

- **Si expression il y a, est-elle tissu-spécifique ?**

Les expériences décrites dans la partie suivante feront l'objet d'un article en collaboration avec l'équipe italienne, dans le cadre du projet européen « Bioinsecticides from insect parasitoids ».

Cette partie décrit les protocoles des expériences qui ont été menées sur les 6 gènes ankyrines du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV Ank), ressemblant au gène *cactus* de la drosophile, impliqué dans la voie Toll. La localisation de ces gènes au sein du génome viral a été réalisée par hybridation de sondes radiomarquées spécifiques des gènes CcBV Ank sur de l'ADN de CcBV séparé par FIGE. L'analyse de l'expression de ces 6 gènes a été effectuée par la technique de transcription inverse de ARNm de l'hôte parasité, suivie de PCR multiplex. Les expériences ont été menées en utilisant différents tissus de l'hôte *Manduca sexta* parasité, tube digestif, corps gras, chaîne nerveuse, glandes prothoraciques et tubes de Malpighi, 3, 24 et 48 h après le parasitisme par *Cotesia congregata*.

CARACTERISATION DE LA FAMILLE DES GENES *ANKYRINE* DU BRACOVIRUS DE *COTESIA CONGREGATA*

RESUME

Cotesia congregata est un hyménoptère endoparasitoïde qui pond ses oeufs dans un hôte, la chenille du lépidoptère *Manduca sexta*. Les parasitoïdes effectuent ensuite leur développement larvaire à l'intérieur de l'hôte. Ce parasitisme ne peut avoir lieu que suite à une immunosuppression de l'hôte. Pour cela, l'endoparasitoïde supprime les réactions immunitaires de son hôte en utilisant un virus du genre polydnavirus. Des particules virales sont injectées dans l'hôte au cours du parasitisme et les gènes viraux sont exprimés dans différents tissus de la chenille parasitée et suppriment ses réactions immunitaires (encapsulement), modifient sa croissance, son développement et son comportement.

Dans le cadre de cette étude, la famille multigénique CcBV *ankyrine* composée de 6 gènes a été caractérisée. Les gènes *ankyrine* (CcBV *ank*) présents dans le Bracovirus de *C. congregata* ont été cartographiés. La vérification de la localisation des gènes d'intérêts sur leur cercle respectif a été effectuée à l'aide de la technique de migration FIGE et de la technique de Southern blot. L'expression des gènes CcBV *ank* a été mise en évidence par la technique de PCR Multiplex dans différents tissus des chenilles parasitées.

INTRODUCTION

Cotesia congregata est un hyménoptère endoparasitoïde qui, grâce à son ovipositeur, pond ses œufs à l'intérieur de son hôte, la chenille du sphinx du tabac, *Manduca sexta*. Le développement larvaire des parasitoïdes s'effectue aux dépens de cet hôte, ses larves consomment l'hémolymphe de l'hôte de l'intérieur, contrairement aux ectoparasitoïdes qui se fixent sur leur hôte et s'en nourrissent de l'extérieur. Une dizaine de jours après le parasitisme, les larves transpercent l'épiderme cuticulaire de l'hôte parasité puis tissent leur cocon afin d'achever leur développement. Cinq à six jours plus tard, des guêpes adultes émergent (Fig. 1).

Au cours de l'évolution, les insectes ont développé une réponse immunitaire innée complexe, humorale ou cellulaire (cf partie I). Cette réponse a pour but d'éliminer tout microorganisme ou corps étranger par des mécanismes d'encapsulement ou de phagocytose déclenchés par la réponse cellulaire et par des mécanismes de mélanisation et de coagulation

de l'hémolymphe, d'intoxication de l'intrus déclenchés par la réponse humorale (Lemaitre 1999).

La larve de *C. congregata* se développe dans le milieu intérieur de son hôte *M. sexta* qui comme les autres insectes est pourvu d'un système immunitaire (Nardi *et al* 2003, Kanost *et al* 2004). La réussite parasitaire ne peut avoir lieu que si l'œuf, puis la larve échappent à la reconnaissance du système immunitaire ou contournent l'immunité de l'hôte. Dans le cadre de l'interaction *M. sexta/C. congregata*, des recherches ont montré que la réussite parasitaire était liée à un processus d'immunosuppression dû à la présence d'un virus (Beckage *et al* 1994). Le virus associé à ce modèle est un polydnavirus (un virus à ADN multiples) appartenant au genre des Bracovirus propre aux guêpes de la famille des Braconidés (Drezen *et al* 2003). Ce virus est intégré au génome de la guêpe depuis environ 73 millions d'années (Whitfield 2002). Il est présent au sein des ovaires des guêpes femelles sous forme de particules virales (Webb 1998) contenant 30 cercles d'ADN double brin (Espagne *et al* 2004). Son caractère indispensable au succès parasitaire a été démontré (Beckage *et al* 1994). Après la ponte du parasitoïde, les gènes viraux sont exprimés dans les différents tissus de l'hôte. Les protéines virales produites participent à l'altération des défenses immunitaires ainsi qu'à l'inhibition du développement de l'hôte parasité.

Afin de mieux comprendre l'implication de ce virus dans le succès parasitaire de *C. congregata*, l'ensemble de son génome (30 cercles d'ADN double brin) a été séquencé. Neuf familles de gènes ont été identifiées à l'issue de l'analyse du génome (Espagne *et al* 2004, Provost *et al* 2004, Espagne *et al* soumis). L'une d'entre-elles code pour des protéines comportant des répétitions de motifs ankyrine.

Au cours de cette étude, la famille des gènes *ankyrine* dont les produits codent pour des protéines présentant de fortes similarités avec les motifs à répétitions ankyrines des protéines ankyrine telles que la protéine Vankyrine du virus d'*Hyposoter fugitivus* (49 à 60%) et la protéine Cactus de la drosophile (49 à 57%) a été caractérisée. Chez la drosophile, la protéine Cactus a une action inhibitrice dans la réaction immunitaire des insectes (Anderson 2000, Wright 1999, Nappi *et al* 2004). La protéine Cactus joue un rôle dans une voie de signalisation nommée voie Toll (Fig. 3 et partie IA3), équivalent fonctionnel de la voie TNF des mammifères (Lemaitre 1999). Cette voie est connue à l'heure actuelle pour son implication dans la régulation de facteurs de transcription impliqués dans l'expression de plusieurs gènes antimicrobiens (Fehlbaum *et al* 1994, Reichhart & Imler 2000).

Cette étude présente la caractérisation moléculaire, de la famille multigénique du Bracovirus de *C. congregata* (CcBV) composée de six gènes *ankyrine* (CcBV *ank*). La localisation expérimentale des différents gènes sur l'ensemble du génome de CcBV a été menée par des analyses en Southern blot par l'hybridation de sondes radiomarquées spécifiques de gènes CcBV *ank* sur l'ensemble du génome CcBV séparé par gel d'électrophorèse en champs inversés. L'expression de ces gènes a été montrée dans différents tissus de l'hôte *M. sexta* au cours du parasitisme.

La similarité des gènes CcBV *ank* avec le gène *cactus* de la drosophile couplée aux résultats des analyses d'expression constituent les premières indications que ces gènes pourraient jouer un rôle dans l'immunosuppression de l'hôte au cours du parasitisme. Des études fonctionnelles destinées à mettre en évidence leur rôle supposé d'immunomodulateurs seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

MATERIEL ET METHODES

Modèle biologique étudié

Cotesia congregata (Braconidae, Microgastrinae) et *Manduca sexta* (Sphingidae) sont élevés en conditions artificielles (Harwood *et al* 1994) à 27°C. Les chenilles sont parasitées après la mue permettant de passer du quatrième au cinquième stade larvaire

Procédures de dissection

Dissection des ovaires de Cotesia congregata

La dissection des ovaires de *C. congregata* est réalisée sous loupe binoculaire. Les paires d'ovaires extraites sont placées dans du TAE x1 (Annexe 3), et déposées sur glace. La dissection peut être conservée quelques heures à 4°C jusqu'à extraction de l'ADN viral.

Dissection des tissus de Manduca sexta

La dissection des chenilles *M. sexta* est réalisée 3, 24 ou 48 h après le parasitisme par *C. congregata*. Le prélèvement du corps gras, de la chaîne nerveuse, des tubes de Malpighi, des glandes prothoraciques et d'une partie du tube digestif se fait sous loupe binoculaire, dans

une solution de Ringer (Annexe 3). Ces tissus sont ensuite conservés dans 1 mL de TriReagent (Sigma) à -80°C, pour éviter la dégradation des ARN.

Préparation du matériel génétique

Extraction de l'ADN viral

L'ADN viral est extrait des ovaires de guêpes selon le protocole décrit en Annexe 4. La concentration des ADN viraux est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % et à l'aide d'un spectrophotomètre (Biomate3, Thermo-Spectronic).

Extraction d'ARN totaux de tissus de *Manduca sexta*

L'extraction des ARN totaux, à partir des tissus de *M. sexta* parasitée, est effectuée selon un protocole classique d'extraction des ARN au trizol (TriReagent, Sigma), décrit en Annexe 4. La qualité des échantillons est vérifiée sur gel d'agarose 0,8 %.

Analyse des séquences

Chacune des séquences nucléotidiques obtenues au laboratoire a été analysée par comparaison de séquences dans les banques d'ADN (BlastN) et de protéines (BlastX) (Altschul *et al* 1997) auprès du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD). Une comparaison des séquences protéiques déduites par CD-Search (Marchler-Bauer *et al* 2003) et Blast2 (Tatusova et Madden 1999) auprès du NCBI permet respectivement, de localiser la position des domaines ankyrine et de comparer les séquences entre elles.

Les séquences des gènes *CcBVank1* à *CcBVank5* ont été déposées dans la banque de données GenBank sous les numéros d'accèsion AJ583542 à AJ583546 (EMBL, GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>). La séquence du gène *CcBVank6* n'a pas encore été déposée, cependant elle est accessible via le numéro d'accèsion du cercle auquel ce gène appartient (numéro d'accèsion : AJ632327).

Elaboration des amorces spécifiques des gènes d'intérêt

Des amorces spécifiques des gènes *ankyrine* ont été élaborées afin d'étudier leur profil d'expression dans les différents tissus de *M. sexta*, au cours du parasitisme par *C. congregata*. Ces amorces ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer3 (WI, Whitehead Institute/MIT, US), à partir des séquences de chaque gène ou de chaque ADN complémentaire (ADNc) de façon à générer par amplification PCR des fragments de taille comprise entre 241 et 547 pb. Les couples d'amorces sont choisis de sorte que leurs températures d'hybridation soient identiques et qu'ils permettent d'amplifier des amplicons de tailles suffisamment différentes pour que ces amorces puissent être utilisées au sein d'une même réaction de PCR multiplex.

Les gènes *CcBVank5* et *CcBVank6* possèdent un intron. De ce fait, les amorces choisies sont placées d'un côté ou de l'autre de l'intron afin que les tailles des fragments d'amplification ne varient pas selon la matrice utilisée, ARN (ADNc) ou ADN.

Chaque couple d'amorces a été testé par PCR classique sur 20 ng d'ADN viral, afin de vérifier qu'un fragment unique de taille attendue est amplifié.

Amorces pour l'étude de l'expression des gènes d'intérêt

Pour étudier l'expression des gènes d'intérêt, les techniques de transcription inverse suivie d'une PCR Multiplex déjà décrites dans Provost *et al* 2004 sont utilisées. Les couples d'amorces utilisés sont décrits dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés dans la PCR Multiplex1. Température d'hybridation de ces amorces : 55°C.

PCR Multiplex1 (55°C)	Noms	Séquence des amorces 5' → 3'	Taille des amplicons
<i>CcBVAnk1</i> Multiplex1	5' Ank1	GTGGCCATCGGAAAACCTTA	452 pb
	3' Ank1	GTTGTGCTGCGTTTTCTTG	
<i>CcBVAnk3</i> Multiplex1	5' Ank3	TCGAGTTTCATGGAAATCCGTA	334 pb
	3' Ank3	TCCATCATTTCTTTGGTCACG	
<i>CcBVAnk6</i> Multiplex1	3' Ank5	CACCGGCCTTTCTCAGTATC	547 pb
	5' Ank6	CGGGTATTAATATCGCTCTGTCC	

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des couples d'amorces utilisés dans la PCR Multiplex2. Température d'hybridation de ces amorces : 57°C.

PCR Multiplex2 (57°C)	Noms	Séquence des amorces 5' → 3'	Taille des amplicons
CcBVank2 Multiplex2	5' Ank2	GTCCGGCAACTTCGTGTTT	450 pb
	3' Ank2	GACACTTCACATTGAGCACCA	
CcBVank4 Multiplex2	5' Ank4	ACATTGCCGGACAAATGAGT	241 pb
	3' Ank4	TCAAATGGCGAAAGGTTTTT	
CcBVank5 Multiplex2	Ank 5 R bis	AACAGTGCACTCATTTTCATCG	344 pb
	Ank 5 F bis	TTCAGAACATTTTCGCTTAGCA	

Amorces pour la cartographie

Les couples d'amorces utilisés pour réaliser les sondes pour la cartographie par FIGE (localisation des gènes sur les cercles d'ADN viral) sont identiques à ceux utilisés pour les PCR Multiplex (Tab. 4 et 5).

Localisation des gènes sur l'ensemble du génome viral par migration par FIGE puis Southern blot

L'ADN viral de *CcBV* (250 ng par puits) est séparé par FIGE (Gel d'électrophorèse en champ inversés) (Provost *et al* 2004). L'ADN est transféré sur membrane de nylon (Biotrans Nylon Membrane ; 0,45 µm) selon le protocole recommandé par le fabricant. L'hybridation de l'ADN viral avec une sonde spécifique du gène étudié s'effectue à 65°C, toute une nuit. La membrane est lavée à 65°C 2 fois dans des solutions de SSC x2 SDS 0,1%, SSC x0,2 SDS 0,1% et une fois en SSC x0,1 SDS 0,1% puis autoradiographiée.

Etude de l'expression des gènes d'intérêt par transcription inverse et PCR multiplex

La réaction de transcription inverse est réalisée grâce au kit Omniscript (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. L'expression des gènes *CcBVank* est étudiée par la technique de PCR Multiplex (kit QIAGEN Multiplex PCR, QIAGEN) qui permet d'amplifier plusieurs fragments dans un même volume réactionnel. Les amorces décrites précédemment sont utilisées. Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer). Le programme utilisé est le suivant : 15 min de dénaturation initiale à 92°C,

puis 35 cycles de 30 s de dénaturation à 95°C, 90 s d'hybridation à la température requise par les amorces (55 ou 57°C) et 90 s d'élongation à 72°C, et une élongation finale de 10 min à 72°C.

RESULTATS

Caractérisation des gènes CcBVank identifiés

Analyse des séquences

Neuf familles multigéniques ont été identifiées suite au séquençage et à l'annotation du génome du Bracovirus de *C. congregata*. Six gènes codant pour des protéines potentielles contenant des domaines formés de répétitions de motifs ankyrine ont été mis en évidence. Ils ont été désignés : gènes *CcBVank1* à *6* pour gènes *ankyrine-like* (ou *cactus-like*) du Bracovirus de *C. congregata*. Leurs différentes caractéristiques, taille du gène, présence ou non d'intron, taille du cadre ouvert de lecture (ORF), taille de la protéine déduite, sont décrites dans le tableau 6.

Tableau 6 : Tableau présentant les différentes caractéristiques des 6 gènes *CcBVank*. La taille des gènes, la présence ou non d'intron, la taille du cadre ouvert de lecture (ORF) et la taille de la protéine déduite sont précisées.

Gènes	taille (pb)	intron	ORF (pb)	protéine (aa)
<i>CcBVank1</i>	464	non	464	154
<i>CcBVank2</i>	486	non	486	161
<i>CcBVank3</i>	501	non	501	166
<i>CcBVank4</i>	489	non	489	162
<i>CcBVank5</i>	470	oui	447	148
<i>CcBVank6</i>	1490	oui	702	233

Ces 6 gènes présentent des tailles variables allant de 464 pb (*CcBVank1*) à 1490 pb (*CcBVank6*) et codent pour des protéines potentielles dont la taille varie de 148 acides aminés (*CcBVank5*) à 233 acides aminés (*CcBVank6*). Seuls les gènes *CcBVank5* et *CcBVank6*

possèdent un intron, respectivement de 23 et 788 pb. La position des domaines formés de motifs à répétitions ankyrine pour chacune des protéines déduites est présentée Figure 16.

A l'échelle de la séquence génomique, aucune identité significative n'est rencontrée lors de la comparaison des séquences de ces 6 gènes sauf en ce qui concerne *CcBVank5* et *CcBVank6* qui présentent 70% d'identité sur la séquence totale (78% sur une portion de séquence plus réduite). A l'échelle de la séquence protéique, par contre, les protéines déduites partagent des similarités allant de 43% pour *CcBVank2* et *CcBVank5*, à 69% pour *CcBVank5* et *CcBVank6*. Pour plus de détails, les pourcentages de similarité rencontrés lors de la comparaison des séquences protéiques déduites des différents gènes *CcBVank* sont présentés dans le Tableau 7.

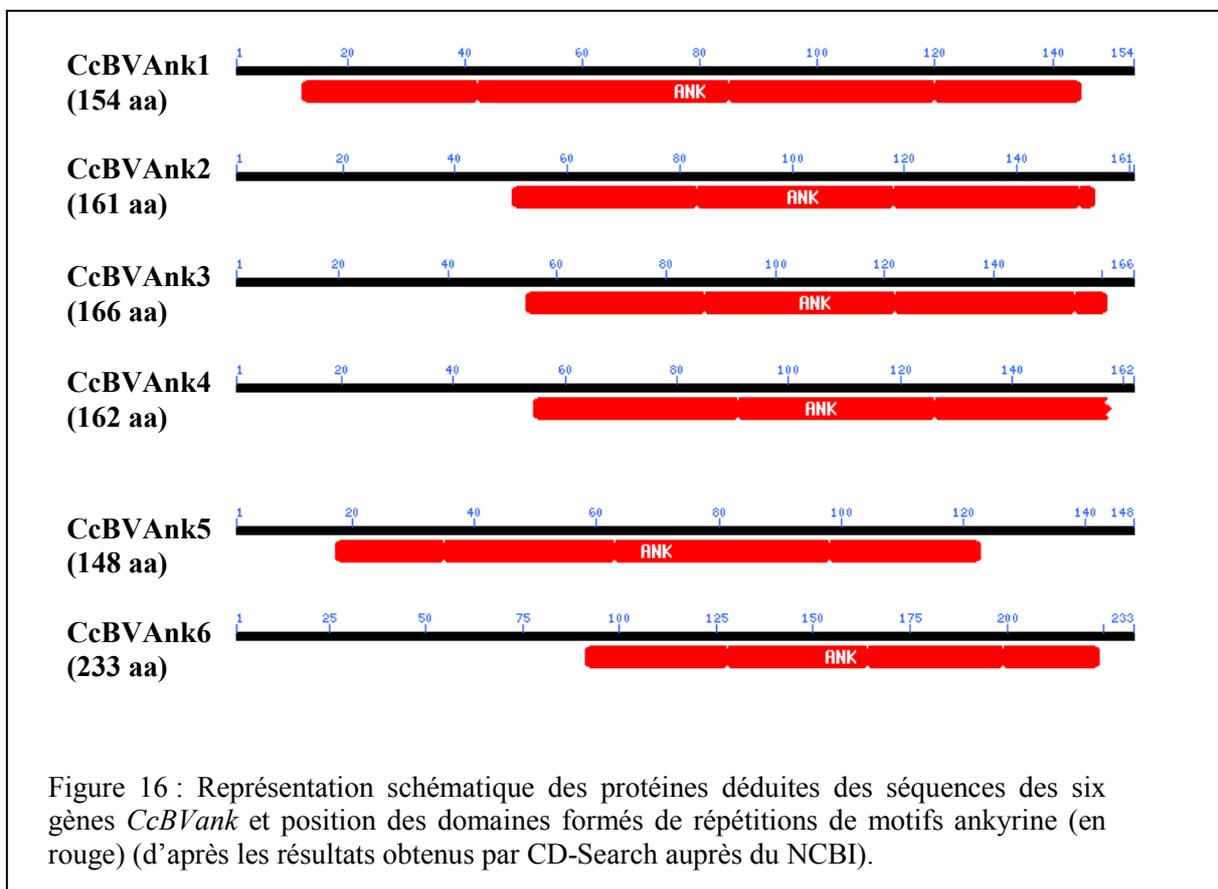


Tableau 7 : Tableau des similarités de séquence rencontrées lors de la comparaison des séquences protéiques déduites des différents gènes *CcBVank*. Les comparaisons ont été effectuées en utilisant le logiciel Blast2 (alignements locaux entre une séquence et une banque personnelle à INFOBIOGEN). Le nombre d'acides aminés similaires sur le total des acides aminés communs est précisé entre parenthèses.

Similarité	CcBVAnk1	CcBVAnk2	CcBVAnk3	CcBVAnk4	CcBVAnk5	CcBVAnk6
CcBVAnk1	100	56% (84/148)	61% (83/135)	52% (72/138)	61% (72/117)	57% (80/138)
CcBVAnk2		100	51% (71/138)	47% (64/135)	43% (61/140)	49% (67/135)
CcBVAnk3			100	55% (74/133)	60% (63/104)	56% (76/135)
CcBVAnk4				100	47% (67/141)	62% (89/142)
CcBVAnk5					100	69% (106/152)
CcBVAnk6						100

Comparaison dans les banques de données

Les protéines ankyrines de CcBV varient entre 154 et 233 aa. Elles sont formées de 2 ou 3 motifs à répétitions ankyrines. Ces protéines sont plus courtes que les protéines cactus de drosophile (500 aa) et elles sont dépourvues des motifs IKK N-terminal contenant des résidus sérines, et le domaine PEST C-terminal, responsables de la dégradation de la protéine cactus par le protéasome et par conséquent de la dissociation du complexe cactus/Dif dans la voie Toll (cf partie IA3). La comparaison de ces séquences dans les banques de données par TBlastX (comparaison d'une séquence nucléotidique traduite à une séquence protéique) révèle une identité de 31 à 37% (53 à 60% de similarité) avec les motifs ankyrines d'une protéine hypothétique identifiée chez l'ichnovirus d'*Hyposoter didymator* (numéro d'accèsion AAR99844) et de l'ordre de 25 à 36% (49 à 60% de similarité) avec les motifs ankyrines de la protéine vankyrin-b22 identifiée chez l'ichnovirus d'*Hyposoter fugitivus* (numéro d'accèsion AAS90270). Les séquences de CcBV ank présentent de 49 à 57% de similarité avec la séquence des motifs ankyrines des différentes protéines cactus identifiées chez la drosophile.

Localisation des gènes CcBV ank 5 et 6 sur l'ensemble du génome par la technique de FIGE suivie d'un Southern blot

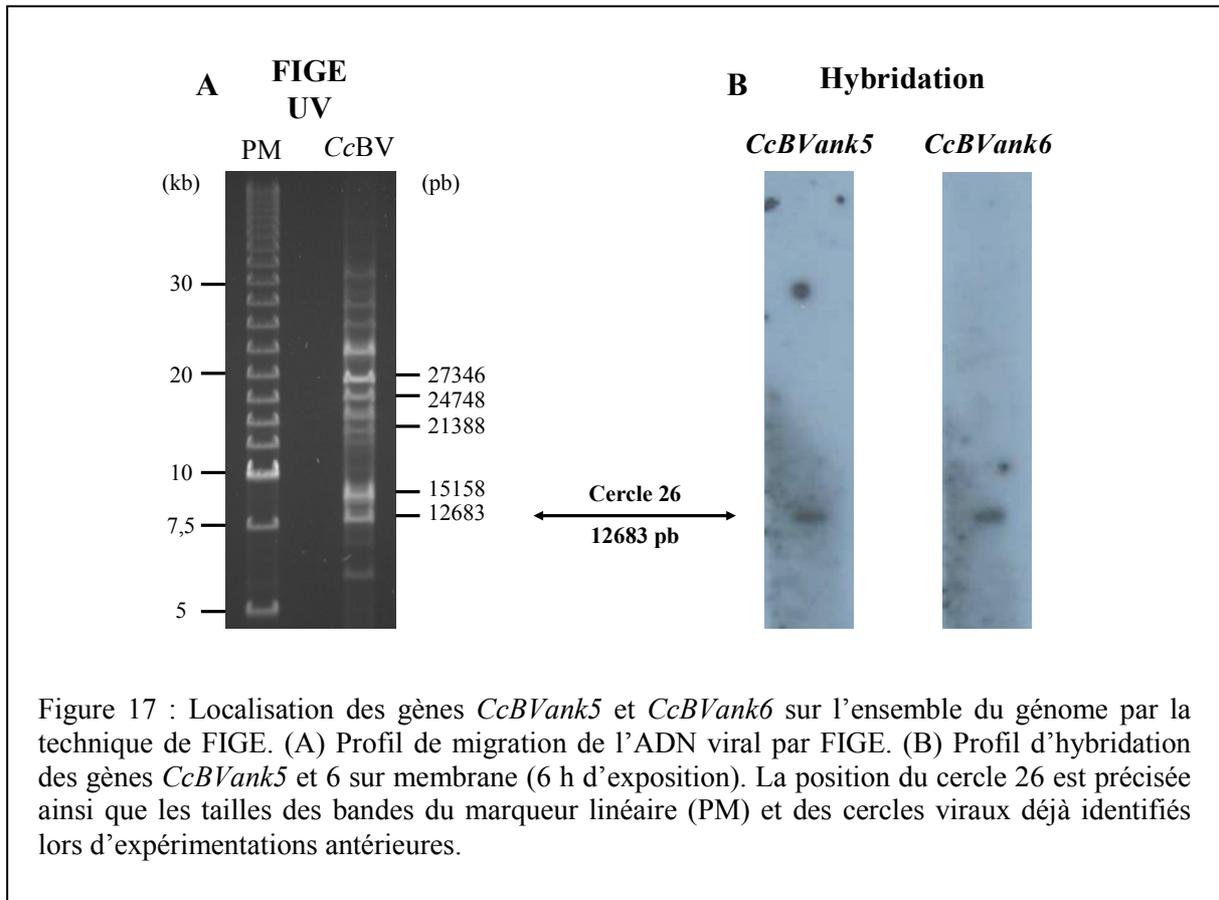
Visualisation des cercles d'ADN viral

La localisation des gènes *ankyrine* sur l'ensemble du génome viral circulaire a été effectuée. Les cercles d'ADN viraux, dont la taille varie de 5 à 41 kb, ont été séparés par FIGE (Fig. 17A). Grâce à une visualisation sous lumière UV, une corrélation peut être faite entre les tailles des cercles et les tailles linéaires données par le marqueur linéaire utilisé. D'après des résultats obtenus antérieurement au laboratoire, et portant sur la localisation d'un gène (gène *CcBVPTPA*) (Provost *et al* 2004) appartenant au cercle 26, une corrélation a pu être faite entre la taille réelle de ce cercle, déterminée par le séquençage (12682 pb) et sa distance de migration sur le gel relativement au marqueur de taille linéaire (environ 8 kb).

Hybridation des sondes spécifiques des gènes CcBVank5 et CcBVank6 sur l'ensemble du génome viral

Après avoir été transféré sur membrane de nylon, l'ADN viral a été hybridé avec des sondes spécifiques des gènes d'intérêt radiomarquées par de l' $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$.

Les signaux d'hybridation (Fig. 17B) obtenus pour les gènes *CcBVank5* et *CcBVank6*, se situant théoriquement tous les deux sur le cercle 26, se trouvent tous les deux à la hauteur d'un fragment linéaire de 8000 pb correspondant à la hauteur théorique attendue d'un fragment de 12683 pb. Ce résultat est cohérent car les deux signaux ont une intensité équivalente. De ce fait, la position des gènes *CcBVank5* et *CcBVank6* sur le cercle 26 est vérifiée.

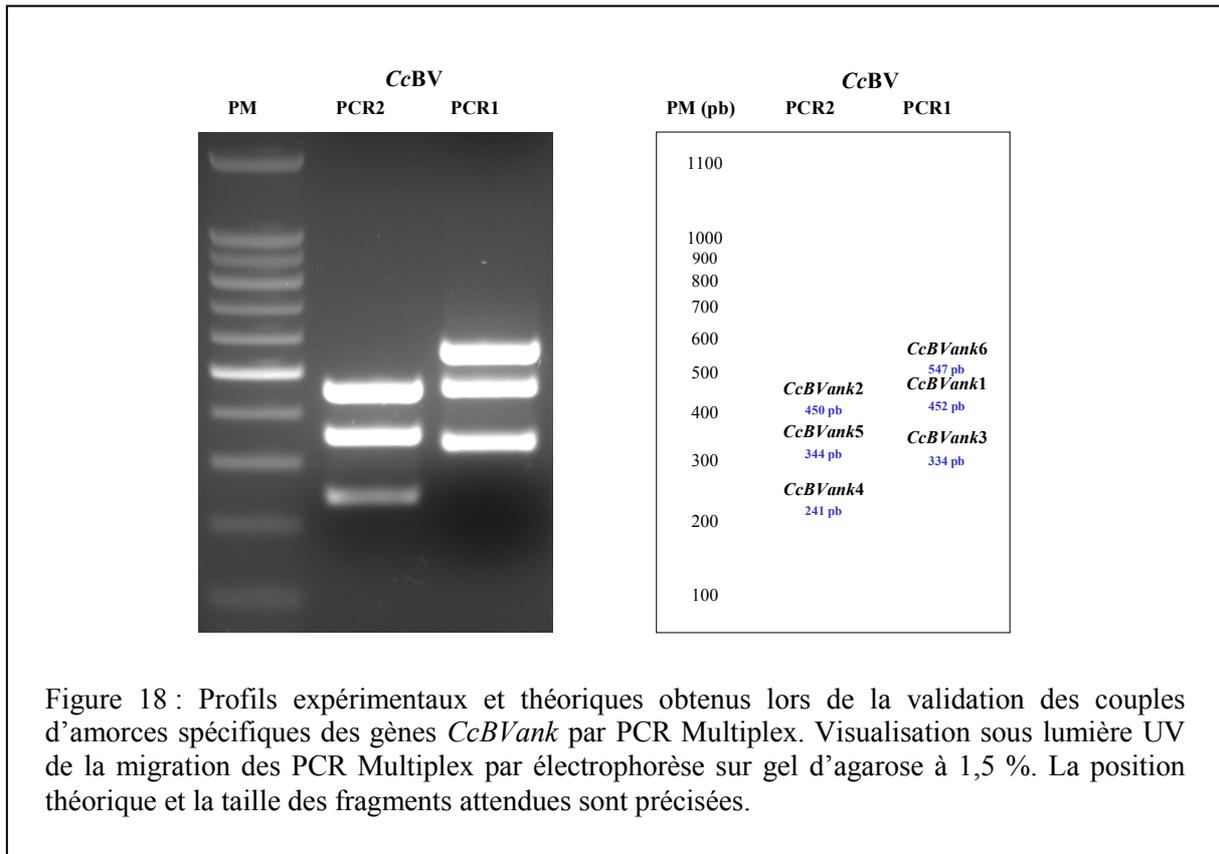


Etude de l'expression des gènes ankyrine-like dans la chenille parasitée

Validation des couples d'amorces utilisées sur de l'ADN de CcBV

L'efficacité des amorces et les tailles des fragments obtenus ont été validées sur de l'ADN viral purifié. Pour chaque gène, la position des couples d'amorces étant connue, il est possible de vérifier que le résultat expérimental obtenu après migration des produits de PCR est en accord avec la taille théorique calculée pour l'amplicon. Ce test a conduit aux résultats présentés Figure 18.

Trois fragments ont été amplifiés dans la réaction de PCR Multiplex1 : un fragment de 550 pb, un de 450 pb et un d'environ 350 pb, correspondant respectivement aux gènes *CcBV ank2*, *CCBV ank5* et *CcBV ank4*. Pour la PCR Multiplex2, les trois fragments présentent une taille de 450 pb, 350 pb et de 250pb, correspondant respectivement aux gènes *CcBV ank6*, *CCBV ank1* et *CcBV ank3*. Ce qui est en accord avec les tailles théoriques attendues.



Etude de l'expression des gènes ankyrine-like dans différents tissus de chenilles parasitées

Les études *sexta* sont effectuées à partir d'une transcription inverse réalisée à partir d'1 µg d'ARN de système nerveux, de corps gras, de tube digestif, de tubes de Malpighi ou de glandes prothoraciques. d'expression menées pour les six gènes *ankyrine* dans les différents tissus de *M.* La technique utilisée est la technique de PCR Multiplex car elle permet d'amplifier plusieurs fragments d'ADN dans un même volume réactionnel. Cette technique permet uniquement une mesure qualitative de l'expression des gènes et non quantitative.

Afin de s'assurer que les fragments des gènes amplifiés sont spécifiquement exprimés lors du parasitisme, un test de PCR Multiplex a été effectué sur une matrice d'ADN complémentaire de *M. sexta* non parasitée (résultat non présenté). Aucun fragment d'amplification n'a été obtenu, ce qui assure que les amorces utilisées sont bien spécifiques de gènes exprimés au cours du parasitisme.

Aucune amplification n'est obtenue sur de l'ARN n'ayant pas subi de transcription inverse, ce qui confirme qu'il n'y a pas de contamination des échantillons par de l'ADN viral, condition indispensable à une étude ultérieure de l'expression génique.

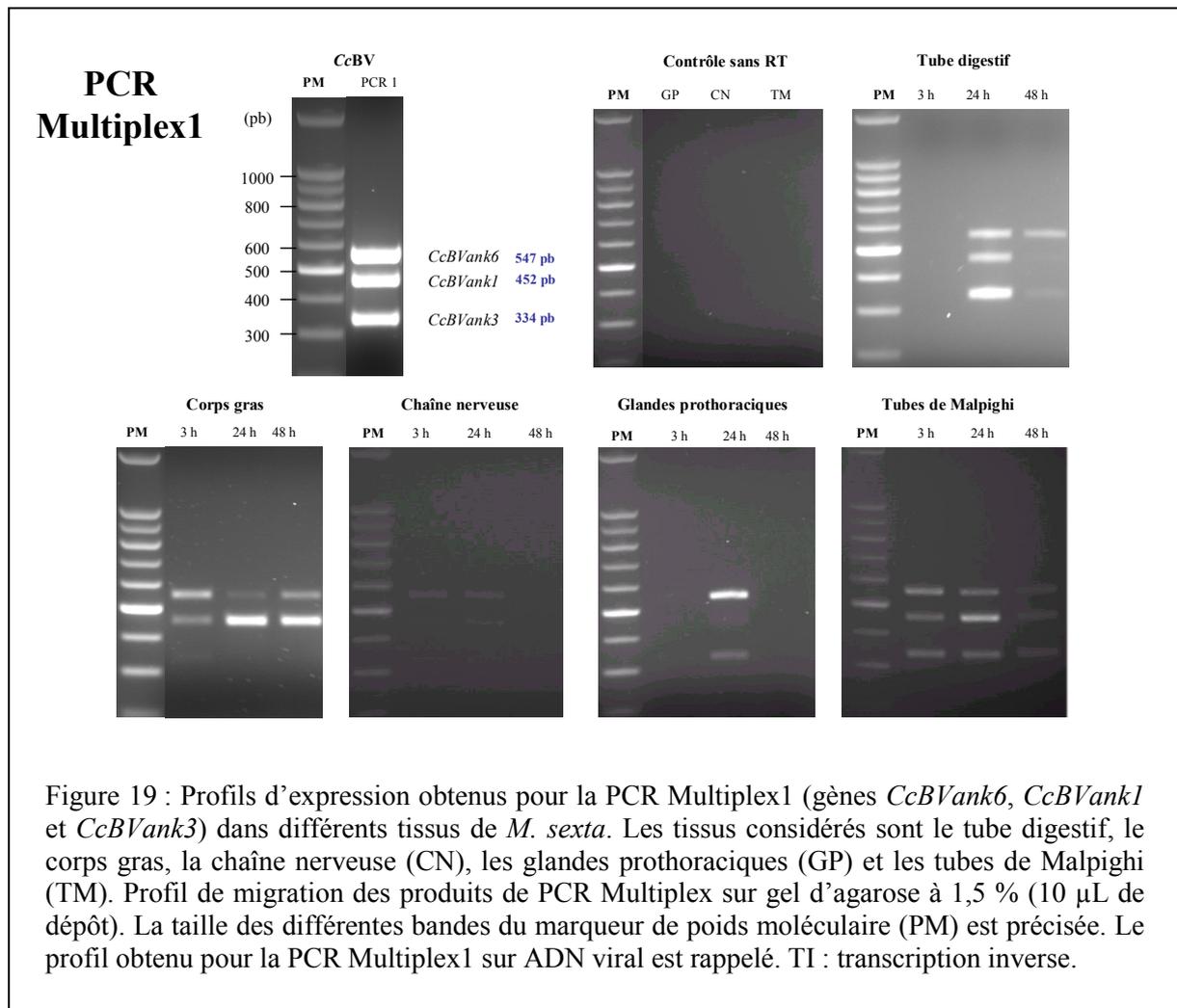
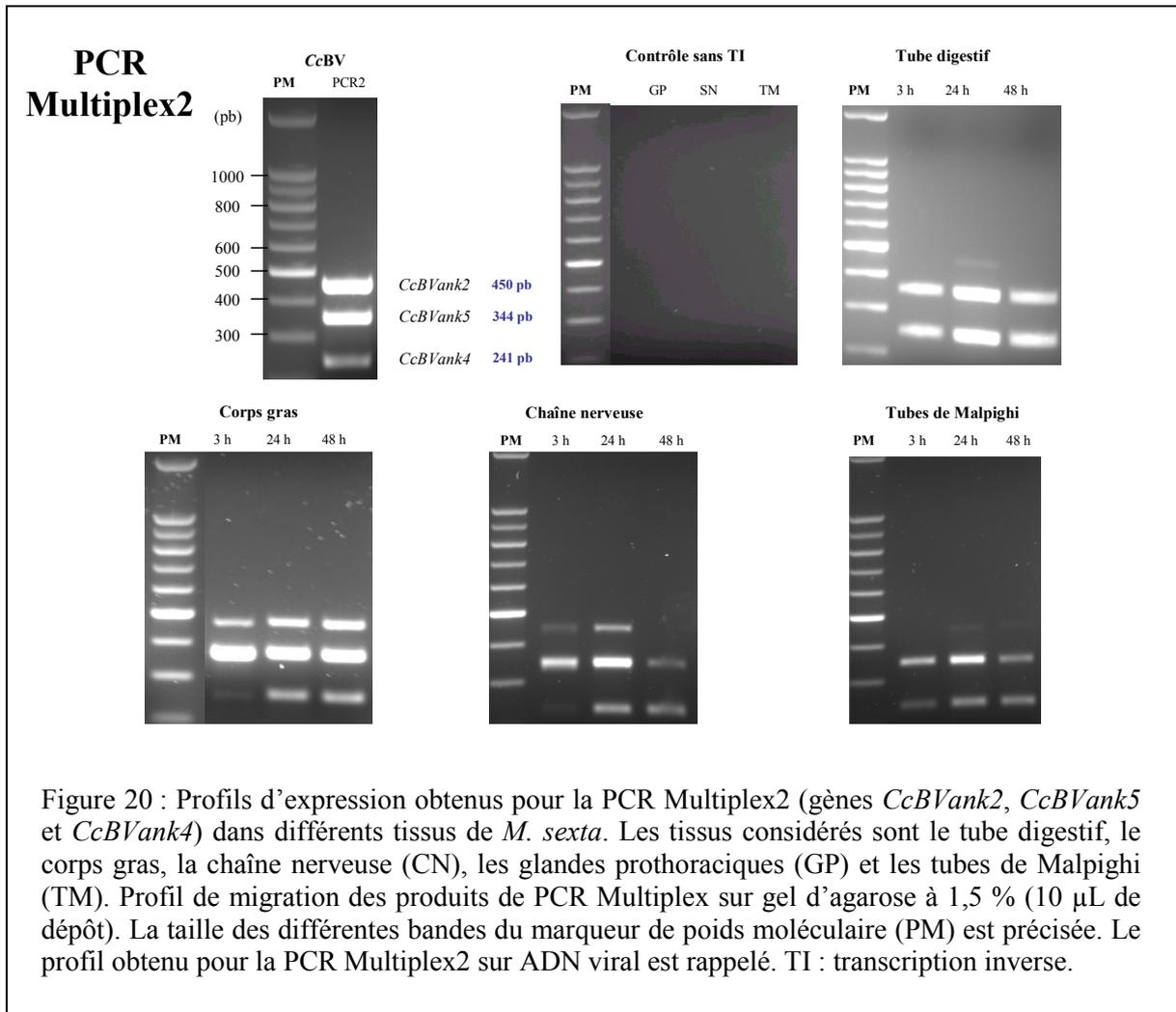


Figure 19 : Profils d'expression obtenus pour la PCR Multiplex1 (gènes *CcBVank6*, *CcBVank1* et *CcBVank3*) dans différents tissus de *M. sexta*. Les tissus considérés sont le tube digestif, le corps gras, la chaîne nerveuse (CN), les glandes prothoraciques (GP) et les tubes de Malpighi (TM). Profil de migration des produits de PCR Multiplex1 sur gel d'agarose à 1,5 % (10 μ L de dépôt). La taille des différentes bandes du marqueur de poids moléculaire (PM) est précisée. Le profil obtenu pour la PCR Multiplex1 sur ADN viral est rappelé. TI : transcription inverse.

Pour chaque gène étudié, un produit d'amplification à la taille attendue (Fig. 18) a été obtenu dans plusieurs tissus (Fig. 19 et 20). Pour les glandes prothoraciques, les résultats négatifs ne sont pas interprétables car la quantité d'ARN qui a pu être extraite était très faible. Mais le fait d'obtenir des produits d'amplification à 24 h post-oviposition indique que les gènes *CcBVank* sont exprimés dans les glandes prothoraciques. Globalement, le profil d'expression des gènes est ubiquitaire, même si dans le détail tous les gènes *CcBVank* ne sont pas exprimés à un temps donné ou dans un tissu particulier.



DISCUSSION

Techniques de cartographie

Les expérimentations effectuées afin d'étudier la position des gènes *CcBVank* par les techniques de FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) et de Southern blot ont permis de confirmer la localisation des gènes *CcBVank5* et *CcBVank6* prédite suite au séquençage des cercles du bracovirus de *C. congregata*, sur le cercle 26.

Etude de l'expression des gènes *CcBVank*

L'étude de l'expression de gènes peut s'effectuer à l'aide de plusieurs méthodes. Classiquement, la technique de Northern blot est la plus communément utilisée. Dans le cadre

de cette étude, la technique utilisée afin d'étudier l'expression des gènes est la technique de PCR Multiplex. Elle permet d'amplifier plusieurs fragments dans un même volume réactionnel. Cette technique présente d'autres avantages tels que son extrême sensibilité et son faible "coût" en ARN (moins d'un microgramme suffit à tester l'expression des 6 gènes). La technique de Northern blot, quant à elle, est une technique longue et contraignante car l'utilisation de sondes radiomarquées est indispensable et une quantité d'ARN importante est nécessaire, contrairement à la PCR Multiplex (les analyses équivalentes par Northern blot des 6 gènes *CcBVank*, sur 5 tissus, à 3 temps différents, à raison d'un dépôt de 5 à 10 µg par puits, auraient nécessité 60 µg d'ARN de chaque tissu à chaque temps). Cependant, seule la technique de Northern permet de connaître la taille du transcrit de chaque gène. Il est d'autre part important de souligner, à propos de la PCR Multiplex, que cette méthode d'analyse n'est pas quantitative, mais uniquement qualitative. De ce fait, les intensités des signaux obtenus ne peuvent être comparées entre elles, donc la PCR Multiplex ne permet en aucun cas de tirer des conclusions quant au niveau d'expression de tel ou tel gène. Pour cela, il faudrait mener des analyses par Northern blot ou PCR quantitative en temps réel.

Rôle potentiel des protéines CcBVAnk au cours du parasitisme

La mise en évidence de l'expression des gènes *CcBVank* dans les différents tissus de *M. sexta* parasité suggère qu'ils ont probablement une fonction dans la stratégie parasitaire du modèle hôte/parasitoïde *M. sexta/C. congregata*.

Ces six gènes codent pour des protéines potentielles présentant des domaines formés de motifs à répétitions ankyrine. Or les protéines contenant de tels domaines sont connues pour être impliquées dans des interactions protéine-protéine entre de nombreuses familles protéiques. Les protéines Ankyrine sont notamment impliquées dans des interactions entre des protéines membranaires et des protéines associées au cytosquelette (Rubtsov & Lopina 2000). Le nombre de motifs à répétitions ankyrine varie entre 2 et 20. Ces répétitions sont disposées en tandem et sont souvent associées à des domaines de natures différentes au sein des protéines.

Chez les poxvirus, des protéines riches en répétitions de motifs ankyrine (entre 2 et 51) ont été identifiées à plusieurs reprises dans les génomes séquencés (Cameron *et al* 1999, Alfonso *et al* 2002, Delhon *et al* 2004, Tulman *et al* 2004). L'ensemble de ces données montrant la présence récurrente des protéines Ankyrine dans les génomes viraux suggère que

les protéines codées par les gènes contenant des motifs à répétitions multiples d'ankyrine pourraient jouer un rôle au cours des mécanismes impliqués dans le succès du parasitisme.

Plus précisément, des études effectuées chez la drosophile ont mis en évidence qu'une protéine Cactus jouait un rôle dans une voie de transmission du signal appelée la voie Toll, impliquée dans l'immunité, aboutissant à l'activation de la transcription d'un gène codant pour un peptide antimicrobien : la drosomycine (Lemaitre *et al* 1996). La protéine Cactus de la drosophile forme un complexe protéique avec des facteurs de transcription (protéines Dif ou Rel) dans le cytoplasme des cellules. Lorsque la voie Toll est activée une cascade de réaction (cf partie IA3) aboutit à la dégradation du complexe décrit précédemment. Ces recherches sont intéressantes puisque cette voie est impliquée dans un mécanisme de la réponse immunitaire innée chez les insectes. Une homologie de séquence significative a été trouvée entre la protéine Cactus de la drosophile et les six protéines ankyrine du bracovirus de *C. congregata*. De ce fait, une hypothèse émerge pouvant aboutir à une réponse partielle à la question : comment le polydnavirus est-il impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire chez *M. sexta* ?

L'hypothèse émise serait que les protéines Cactus tronquées codées par ces six gènes *CcBVank* pourraient séquestrer le facteur de transcription Dif. Le poxvirus, *Myxoma virus* et l'African swine fever virus utilisent un mécanisme de virulence semblable qui interfère avec NF- κ B en le séquestrant dans le cytosol, et inhibe la réponse inflammatoire (Camus-Bouclainville *et al* 2004, Revilla *et al* 1998). Il inhiberait donc la voie Toll contrôlant l'expression des gènes antimicrobiens (notamment la drosomycine). Cependant il n'y a aucun avantage pour le parasite à inhiber la réponse immunitaire antimicrobienne. Mais l'immunité cellulaire, mal caractérisée chez les insectes, pourrait également être sous le contrôle de la voie Toll, la voie homologue des vertébrés contrôlant l'immunité cellulaire. Il y aurait donc inhibition globale de la réponse immunitaire, permettant aux larves du parasitoïde de se développer sans encombre et d'échapper aux mécanismes d'encapsulation qui consistent à former une gangue de cellules immunitaires autour d'un corps étranger. A l'appui de cette hypothèse il faut noter qu'il a été montré qu'un virus de vertébré (African swine fever virus) utilise une forme tronquée de l'homologue de cactus (I κ B) dont l'organisation est très similaire à celle des gènes *ankyrine* de bracovirus pour contrôler l'immunité cellulaire (Revilla *et al* 1998). Chez les hyménoptères parasitoïdes, le rôle des protéines codées par ces gènes est probablement important puisque de tels gènes ont été identifiés dans de nombreux polydnavirus associés à des guêpes de familles différentes (Ichneumonidae et Braconidae).

Ces hypothèses ne peuvent être confirmées que par de longues études moléculaires, biochimiques et physiologiques qui n'ont pas encore été effectuées à ce jour. Pour l'instant, un trop petit nombre d'études a été mené dans les différents modèles étudiés pour que l'on puisse conclure sur le sujet. Cependant, cette étude montre bien que les gènes *CcBVank* étudiés sont présents dans le génome du Bracovirus de *C. congregata* et exprimés dans les tissus de la chenille parasitée, *M. sexta*. De ce fait, ces gènes ont potentiellement un rôle dans le succès parasitaire. D'autres types d'études sont donc nécessaires avant de connaître précisément le rôle de ces gènes polydnaviraux et de répondre à la question : comment le parasitoïde contrôle-t-il la physiologie de son hôte ?

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le séquençage et l'analyse des différents gènes du bracovirus de *Cotesia congregata* (CcBV) ont permis de faire un grand pas dans la connaissance des polydnavirus, puisqu'auparavant la communauté scientifique ne disposait que d'un ensemble de données morcelées concernant de nombreux modèles distincts (Kroemer & Webb 2004). Aujourd'hui, on connaît l'intégralité des gènes composant le génome de CcBV, le projet européen nous donne accès aux séquences du génome du bracovirus de *Toxoneuron nigriceps* et un certain nombre de séquences d'autres bracovirus (de *Glyptapanteles indiensis*, *Cotesia kariyai*...) sont recensées dans les banques. Ces données nous ont permis de faire un certain nombre de liens entre ce virus et d'autres polydnavirus. Notamment, il est apparu que plusieurs familles multigéniques, codant pour des protéines dont la fonction biochimique est connue, sont présentes chez plusieurs polydnavirus, telles que la famille PTP, la famille ankyrine, la famille des protéines riches en cystéines ; sont aussi présentes des familles de protéines à fonction inconnue, communes aux bracovirus d'espèces du genre *Cotesia* (Espagne *et al* 2004). L'étude de certaines familles multigéniques a montré que plusieurs de ces gènes codent pour des protéines qui possèdent des activités biochimiques prédites par l'analyse de leurs séquences, et des hypothèses sont proposées en ce qui concerne leur rôle au cours du parasitisme. Les données fournies par le séquençage ont aussi permis d'infirmer l'hypothèse jusqu'alors admise qui stipulait que le virus ancêtre à l'origine des associations actuelles entre braconidae et polydnavirus était un virus de type baculovirus. En revanche, la connaissance des séquences du bracovirus de *C. congregata* a fourni peu de données supplémentaires permettant de répondre à la question du mode de réplication du virus au sein des ovaires du parasitoïde.

ORIGINE EVOLUTIVE DES POLYDNAVIRUS

Le séquençage de l'intégralité du génome du polydnavirus de *Cotesia congregata* n'a pas permis de répondre de façon tranchée à l'interrogation relative à l'origine évolutive des bracovirus. L'hypothèse qu'un ancêtre du bracovirus a été capturé il y a 73,7 millions d'années (Whitfield 2002) par l'hyménoptère ancêtre du groupe monophylétique formant le complexe microgastroïde (cf partie Présentation du modèle d'étude) n'est pas remise en question. Cependant, l'hypothèse émise, basée sur la morphologie des particules virales, supposant que les bracovirus ont pour origine l'intégration d'un baculovirus (Krell & Stoltz 1979) dans le génome d'un hyménoptère ancêtre est fortement remise en question

suite à l'analyse de la séquence du génome de CcBV. En effet, de façon assez inattendue, l'annotation des séquences du génome de CcBV a montré qu'une très faible proportion des séquences d'ADN codantes (9 sur 156 CDS) codent pour des peptides qui présentent des similarités avec des protéines appartenant à des génomes viraux déjà identifiés (Espagne *et al* 2004) ; 6 CDS codent pour des protéines qui partagent des taux de similarité importants avec des domaines protéiques de retro-éléments (domaines d'intégrase, de transcriptase inverse), seules 2 protéines potentielles partagent 48% de similarité avec une protéine de baculovirus (*Autographa californica* M nuclear polyhedrovirus gp94) (Clem *et al* 1994), et une autre, 39,9 % de similarité avec une protéine potentielle de l'ascovirus du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* (SfAV1) (Stasiak *et al* 2000). Deux CDS présentent des domaines qui pourront se révéler intéressants pour la nature du virus ancestral un domaine DNA polymérase de type B2 et un domaine pox A32 présents dans des protéines de capsides virales de poxvirus. Cependant, plusieurs arrêts de cadre de lecture ont été détectés dans ces gènes et il n'est pas clair qu'ils puissent être impliqués dans la réplication des particules virales chez le parasitoïde. Leur présence a été décrite dans un transposon de Paramécie et il pourrait s'agir simplement de gènes d'un transposon intégré dans le bracovirus.

L'analyse des génomes de 13 baculovirus a montré la conservation, parmi tous ces génomes, de 30 gènes appelés « coeur de génome » (« core genes »), codant pour des protéines caractéristiques impliquées dans les mécanismes de traduction, réplication, et dans la construction des structures virales infectieuses (Herniou *et al* 2003). Or dans le génome de CcBV, il n'y a pas de gène qui partage de similarité avec des protéines codées par les « gènes de coeur » des baculovirus. Ce dénuement remet en question l'intégration d'un virus à génome complexe, de type baculovirus, comme origine du groupe monophylétique des hyménoptères porteurs de bracovirus et plus généralement l'intégration d'un virus comportant un grand nombre de gènes.

De plus, la réplication du bracovirus et la production des nucléocapsides ayant lieu uniquement dans les cellules du calice des ovaires de parasitoïde, les gènes impliqués dans ces mécanismes ne sont pas soumis à des pressions de sélection maintenant leur présence au sein des nucléocapsides transférées dans l'hôte. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que le gène p44 de l'ichnovirus de *Campoletis sonorensis* codant pour une protéine de structure ne soit pas contenu dans les nucléocapsides injectées dans l'hôte lors de la ponte (Deng *et al* 2000). Dans le cadre de l'hypothèse de l'acquisition d'un virus à grand génome, de type baculovirus, il faudrait faire le postulat que tous les gènes viraux

impliqués dans la réplication de l'ADN bracoviral, ainsi que dans la production des nucléocapsides et des particules virales, ont été transférés dans le génome de l'hyménoptère et ne font plus partie du panel de gènes portés par les séquences circularisées puis injectées dans l'hôte lors du parasitisme. Cette hypothèse, très peu parcimonieuse, quant à l'origine des bracovirus, peut être détrônée au profit d'une autre hypothèse plus « économique ».

Intégration d'un génome simple

Un système relativement simple a pu s'intégrer au génome de l'hyménoptère ancêtre et une complexification progressive de ce système a abouti au modèle actuel. Si l'on s'autorise à émettre des hypothèses très spéculatives, le système ancêtre intégré par l'hyménoptère ancêtre peut être de 2 types.

i/ Il pourrait s'agir d'un virus à faible contenu génique possédant par exemple, au moins un gène de capsid lui procurant une capacité infectieuse et quelques gènes indispensables à la réplication dans l'hôte. Ce virus simple contenait probablement aussi un gène conférant un avantage sélectif à l'hyménoptère au cours du parasitisme, tel qu'un facteur apoptotique (susceptible d'altérer la structure des hémocytes donc la réponse immunitaire cellulaire de l'hôte), qui lui a permis d'être maintenu au sein du génome de l'hyménoptère ancêtre.

ii/ La seconde hypothèse relative à la nature du système intégré par l'hyménoptère ancêtre, correspond à l'intégration précoce d'un élément transposable ou d'un plasmide codant pour une protéine de virulence (comme un plasmide « Yeast killer ») qui aurait pu être sécrétée dans les ovaires par la guêpe et injectée dans l'hôte (Magliani *et al* 1997). Un ou des gènes codant pour des protéines permettant de générer les particules virales et les nucléocapsides ont pu être intégrés ultérieurement au génome de l'hyménoptère, conférant la capacité à l'élément transposable de s'encapsider et d'infecter le lépidoptère pour délivrer le message (gène de virulence) au lieu du produit (protéine ou facteur de virulence). La possibilité d'un tel scénario est suggérée par le fait qu'il a été décrit que le rétroélément Gypsy a acquis une protéine d'enveloppe de baculovirus lui permettant de devenir un retrovirus infectieux.

La présence de tels gènes a pu conférer un avantage sélectif à l'hyménoptère lors du parasitisme, ils ont alors pu être conservés au sein du génome de l'hyménoptère.

Complexification progressive

Si cette hypothèse est exacte, la composition actuelle du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* suggère que, quelle que soit la nature, virale ou élément transposable, du système intégré, à l'origine du complexe microgastroïde, une complexification a dû se dérouler par la suite afin de conduire à sa composition actuelle. Le transfert et l'intégration de nombreuses séquences ont pu avoir lieu à plusieurs reprises au sein des séquences circularisables. Ces gènes ont été conservés dans le cas où ils ont apporté un avantage sélectif à l'hyménoptère. Un certain nombre de facteurs de virulence permettant aux oeufs d'hyménoptères de contourner les mécanismes immunitaires de l'hôte ou d'adapter le développement de l'hôte à celui de la guêpe, ont pu ainsi être transférés et sélectionnés et continuent d'être inclus dans les particules virales injectées dans l'hôte parasité. L'exemple des gènes riches en cystéines présents à la fois dans le génome de l'hyménoptère (TSP 14 codant pour une protéine sécrétée par les tératocytes) et dans le bracovirus (CcBV) valide ce scénario.

Capture indépendante de gènes

L'analyse des séquences de CcBV révèle que les gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels partagent de fortes similarités avec des gènes d'origine cellulaire. Selon les gènes considérés, leur fréquence au sein des génomes polydnaviraux ainsi que leur organisation interne, suggèrent plusieurs solutions pour expliquer l'origine de leur présence au sein du génome de CcBV.

Certains gènes de virulence, présents de façon récurrente dans le génome de plusieurs bracovirus portés par des espèces hyménoptères plus ou moins éloignées phylogénétiquement, ont pu être apportés par le virus ancêtre. Cet ancêtre les possédait dans son propre génome, du fait de leur capture à partir de génomes cellulaires, avant son intégration au sein du génome de l'hyménoptère ancêtre. Les virus contiennent généralement de nombreux gènes cellulaires. C'est peut-être le cas de certaines PTP puisque des gènes de PTP sont présents couramment dans les génomes viraux (baculovirus et poxvirus), même si ces PTP sont d'un autre type (à « double spécificité » pour thréonines et tyrosines phosphorylées) que celles du bracovirus (« classiques » agissant uniquement sur les phosphotyrosines). Cette hypothèse pourrait expliquer la présence des familles multigéniques des protéines tyrosines phosphatases au sein de plusieurs espèces

Braconidae, *G. indiensis*, *T. nigriceps* et *C. congregata* (Chen *et al* 2003, Provost *et al* 2004) et des ankyrines dans les génomes de bracovirus d'espèces hyménoptères relativement éloignées telles que *C. congregata* et *T. nigriceps* (Malva *et al* 2003).

Si l'origine des bracovirus est monophylétique, on s'attend à retrouver les mêmes familles de gènes de façon continue au sein de tous les génomes dérivés de l'ancêtre. Or la présence discontinue ou sporadique d'un certain nombre d'autres gènes n'est pas explicable par cette hypothèse, il faut donc envisager des origines différentes pour ces gènes. Certains gènes présents uniquement dans certains génomes bracoviraux ont pu être acquis, après l'intégration du génome ancêtre par le génome de l'hyménoptère ancêtre, à partir de différents organismes « donneurs ». En effet, si on considère la taille actuelle du génome de CcBV et que l'ancêtre intégré au sein du génome de l'hyménoptère ancêtre à l'origine de la lignée microgastroïde était un organisme génétiquement simple, il est indispensable de formuler cette hypothèse de complexification progressive du génome des bracovirus à la suite de l'intégration de l'ancêtre.

Le génome du bracovirus de *Toxoneuron nigriceps* (TnBV) est dépourvu de gènes de cystatine alors qu'elles ont été identifiées chez *Cotesia congregata* et *Glyptapanteles indiensis* (Gundersen-Rindal communication personnelle). On suppose que l'acquisition des cystatines par le bracovirus a eu lieu après la spéciation des ancêtres ayant conduit respectivement à la super-famille des Microgastrinae (comprenant les espèces *Cotesia congregata* et *Glyptapanteles indiensis*) et à celle des Cardiochilinae (comprenant *Toxoneuron nigriceps*). De manière similaire, le génome de TnBV contient un gène codant pour une aspartyl protéase (Falabella *et al* 2003) qui n'a pas d'homologue dans CcBV. Ce qui suggère aussi une acquisition secondaire de ce gène par le génome viral dans la lignée de *Toxoneuron nigriceps*.

Les séquences des PTP codées par les gènes de CcBV PTP présentent de fortes similarités avec des PTP cellulaires de type « classique » et des taux de similarités plus forts avec des séquences de PTP d'eucaryotes, qu'avec des PTP virales et qu'entre elles-mêmes. Bien qu'un certain nombre de ces gènes de PTP puissent avoir pour origine l'ancêtre des bracovirus, on ne peut pas exclure, compte tenu de leur diversité, que certaines aient été acquises secondairement. Ces PTP étant très fréquentes dans les génomes d'insectes, elles ont pu être capturées par le bracovirus dans le génome de l'hyménoptère.

Les organisations respectives des gènes cellulaires probablement capturés secondairement par rapport à la capture originelle de l'ancêtre des bracovirus suggèrent que différents mécanismes d'acquisition ont eu lieu. Les acquisitions de ces nouveaux gènes peuvent provenir de différents événements de recombinaison anormaux (non-spécifique entre séquences non-homologues ou présentant des homologies ponctuelles), ou bien la transposition d'un élément mobile (élément transposable). Toutefois, l'acquisition par l'intermédiaire d'un élément transposable n'est pas une hypothèse privilégiée dans la mesure où une très faible proportion de séquences bracovirales correspond à des reliques (de séquences typiques) d'éléments transposables fonctionnels.

Le séquençage a fourni des informations permettant de déterminer la nature et la structure des gènes capturés. En effet, en ce qui concerne les gènes de bracovirus (BV) codant pour des protéines riches en cystéines (crp), l'origine cellulaire par acquisition d'un ADN génomique est fortement soupçonnée car les gènes bracoviraux de crp possèdent un intron à l'emplacement habituel décrit pour le gène crp cellulaire Tsp14 (Cui & Webb 1996, Dahlman *et al* 2003). Contrairement à cela, les gènes CcBV cyst sont dépourvus d'intron tandis que les gènes de cystatines cellulaires en possèdent un (Espagne *et al* soumis), la même observation a été faite à propos des gènes vinnexin de *Campoletis sonorensis* (Turnbull & Webb 2002). La perte de l'intron suggère que les gènes CcBV cyst ont été acquis par intégration d'un ADNc dans le bracovirus. L'intégration d'ADNc dans les génomes est un phénomène connu et expliqué comme une anomalie de retrotransposition de retroéléments endogènes. Le fait qu'on n'ait jamais rencontré de gène de cystatine dans des génomes viraux et que les séquences protéiques des CcBV cyst partagent de fortes similarités avec des cystatines cellulaires permet de supposer que ces gènes n'ont pas été acquis à partir d'un organisme viral.

Duplication des gènes

Le phénomène de capture de gènes ne suffit pas à expliquer le nombre important de gènes appartenant à une même famille au sein des génomes polydnaviraux (27 gènes CcBV PTP (Provost *et al* 204) et 28 gènes à répétition *rep* chez *Campoletis sonorensis* (Kroemer & Webb 2004)). Les forts taux de similarité que partagent certains produits de gènes d'un même polydnavirus appartenant à une même famille multigénique (69% entre CcBV ank5 et CcBV ank6, 85% entre CcBV cyst1 et CcBV cyst2 (Espagne *et al* soumis), 96% entre CcBV PTPC et CcBV PTP α (Provost *et al* 2004)) suggèrent que ces gènes ont

probablement pour origine des événements de duplication à l'intérieur du génome lui-même. Ces événements auraient donc abouti à la « multiplication » des gènes et à la création d'une famille multigénique.

La multiplicité de gènes appartenant à une même famille présente au sein du génome d'un même polydnavirus a pu permettre l'adaptation des parasitoïdes à différents hôtes. Dans le cadre de notre modèle d'étude, l'expression des gènes du bracovirus de *Cotesia congregata* est étudiée dans l'hôte *Manduca sexta* parasité, mais *Cotesia congregata* étant capable de parasiter des larves de lépidoptère appartenant à des espèces différentes (Harwood *et al* 1998, Beckage & Tan 2002), il serait intéressant de comparer l'expression des gènes d'une même famille multigénique dans des chenilles parasitées d'espèces différentes, afin de vérifier si certains de ces gènes ne sont pas préférentiellement exprimés dans des espèces-hôtes différentes. Une telle observation révélerait une adaptation extrême des parasitoïdes à chacun de leurs hôtes, ainsi qu'un mécanisme évolutif très efficace afin de pouvoir faire face à la raréfaction éventuelle de tel ou tel hôte.

Comment une telle complexification est-elle possible ?

Dans tous les cas précédemment mentionnés, si des gènes ont été capturés par le génome du bracovirus et qu'ils sont toujours présents à l'heure actuelle dans ce génome, cela signifie qu'ils ont apporté un avantage sélectif qui a entraîné leur conservation. Sinon, les mécanismes évolutifs auraient probablement conduit à la disparition totale de ces gènes. La présence commune des gènes codant pour des protéines ankyrines et de protéines riches en cystéines au sein de génomes de polydnavirus appartenant à des genres différents : les Bracoviridae (bracovirus de *Cotesia congregata*, *Microplitis demolitor* et *Toxoneuron nigriceps*) et les Ichnoviridae (ichnovirus de *Campoletis sonorensis* et *Hyposoter fugitivus*) (Blissard *et al* 1987, Espagne *et al* 2004, Malva *et al* 2004, Kroemer & Webb 2004)), qui n'ont pas d'origine évolutive commune, est étonnante. Elle peut être expliquée soit par des points communs partagés par les ancêtres viraux des deux genres, ou par plusieurs événements de captures indépendants au sein des différents génomes polydnaviraux.

Les produits des gènes ankyrine apportant un tel avantage sélectif au parasitisme, ils ont été conservés dans toutes les lignées polydnavirales dans lesquelles ils ont été intégrés (c'est peut-être aussi le cas des gènes crp, riches en cystéines). Il est peut-être

essentiel pour les hyménoptères que leurs polydnavirus possèdent un certain nombre de gènes pour mener à bien le parasitisme de leur hôte. Les protéines codées par ces gènes peuvent interagir avec certaines voies de régulation qu'il est impératif que le parasitoïde inhibe afin de maîtriser la physiologie de son hôte. Par exemple, les protéines ankyrine peuvent inhiber l'immunité de l'hôte laissant libre cours au développement des parasitoïdes. On assiste alors à des mécanismes d'évolution convergente pour l'acquisition de ces gènes précis indispensables au succès parasitaire.

Il est intéressant de noter que le génome du bracovirus de *Chelonus inanitus* ne contient pas de gènes communs avec les autres génomes de bracovirus. Le parasitoïde *C. inanitus*, hyménoptère braconidae, est un parasitoïde ovo-larvaire (Stettler *et al* 1998), contrairement aux parasitoïdes mentionnés précédemment qui sont des parasitoïdes larvaires. L'espèce *C. inanitus* appartient au complexe monophylétique formé par les super-familles de Braconidae suivantes : Cardiochilinae (*T. nigriceps*), Cheloninae, Microgastrinae (*C. congregata*, *M. demolitor* et *G. indiensis*...) et Miracinae. Or, les gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels dans le génome du bracovirus de *C. inanitus* ne présentent aucune similarité avec aucun autre gène bracoviral hébergé par une autre espèce braconidae. Cette absence de similarité peut s'expliquer par les conditions environnementales (oeuf versus larve) auxquelles sont confrontées les différentes espèces de parasitoïdes ; différences qui conduisent à des pressions de sélection différentes donc à la conservation de gènes de natures différentes. Ces données suggèrent que les pressions évolutives exercées sur le maintien de tel ou tel gène sont extrêmement puissantes et que la présence ou l'absence des gènes répond principalement à la nécessité d'adaptation des parasitoïdes aux contraintes exercées par leurs hôtes.

FACTEURS DE VIRULENCE DE POLYDNAVIRUS

Les études menées sur les séquences du génome du bracovirus de *C. congregata* ont permis d'élargir les connaissances disponibles en matière de protéines de virulence potentielles impliquées dans le parasitisme. On sait maintenant que le bracovirus de *C. congregata* contient de nombreux gènes probablement d'origine cellulaire dont les séquences sont exprimées dans l'hôte au cours du parasitisme.

Les produits de l'expression d'au moins 2 d'entre eux (CcBV PTPA et CcBV cyst1) possèdent des activités fonctionnelles conformes aux prédictions déterminées par les

comparaisons avec les protéines recensées dans les banques de données, ces 2 protéines possèdent respectivement une activité phosphatase et une activité d'inhibiteur de cystéine protéase.

Mais, les expérimentations ont aussi permis de mettre en évidence que certains produits de gènes sont dépourvus de l'activité prédite, ou bien ont une structure tronquée laissant supposer qu'ils sont dépourvus de cette fonction active. Cette perte d'activité a été montrée pour la CcBV PTPM qui est dépourvue d'activité phosphatase. En ce qui concerne les gènes *CcBV ank*, les peptides générés sont aussi tronqués. Cet ensemble de données laisse prédire que ces protéines pourraient avoir des actions sur la séquestration de protéines en constituant l'équivalent de mutants dominants négatifs. Dans le cas de certaines CcBV PTP, il pourrait s'agir de séquestration de protéines phosphorylées, impliquées dans des voies de transduction de signaux. Ou bien dans le cas des CcBV ank, elles pourraient séquestrer des facteurs de transcription Dif de la voie Toll, de façon à former un complexe protéique permanent indissociable, inhibant la libération des facteurs de transcription dans le cytoplasme, et du même coup empêchant la translocation des facteurs de transcription dans le noyau et la synthèse des peptides impliqués dans l'immunité.

Les principales altérations de la physiologie de *Manduca sexta* induites suite au parasitisme ont pour effet d'interrompre le développement de la chenille au stade prépupal, et de permettre aux oeufs puis aux larves de parasitoïdes de contourner l'immunité de la chenille. Parmi les familles de gènes étudiées, plusieurs hypothèses ont été émises quant à leurs rôles potentiels au cours du parasitisme.

Altération du développement et de la croissance de l'hôte

Plusieurs candidats ont été isolés comme potentiellement impliqués dans l'inhibition du développement de l'hôte. Les CcBV PTP possédant une action phosphatase peuvent être responsables de l'inhibition du développement de l'hôte au stade prépupal. En effet, chez *Heliothis virescens*, le parasitisme par *Toxoneuron nigriceps* induit, comme dans de nombreux autres modèles, une interruption du développement de l'hôte. Cette altération s'accompagne d'une diminution de la synthèse d'ecdysone (hormone synthétisée par les glandes prothoraciques de l'hôte responsable du passage au stade prépupal), en

association avec une diminution du niveau de phosphorylation d'une protéine régulatrice-clé de la voie de transduction du signal de l'hormone prothoracotrope (PTTH) (Pennacchio *et al* 1998). Chez *Manduca sexta*, il a été montré que la sécrétion d'ecdysone induite par la PTTH est dépendante du niveau de phosphorylation d'une protéine à tyrosine (Smith *et al* 2003). Par conséquent, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la métamorphose de *Manduca sexta* au cours du parasitisme par *C. congregata* est peut-être due à une diminution de la sécrétion d'ecdysone et qu'une protéine tyrosine phosphatase de CcBV pourrait être responsable du défaut de phosphorylation d'une tyrosine impliquée dans la régulation de la voie PTTH régulant la synthèse d'ecdystéroïde.

Contrôle de l'immunité de l'hôte

D'autres hypothèses sont formulées en ce qui concerne les mécanismes mis en oeuvre par le bracovirus de *C. congregata* afin de maîtriser l'immunité de son hôte. En effet, certaines CcBV PTP pourraient aussi être des facteurs permettant de supprimer certains mécanismes de l'immunité de l'hôte. L'agent de la peste bubonique, *Yersinia pestis*, utilise des facteurs de virulence, YopH de la famille des protéines tyrosines phosphatases (Bleves & Cornelis 2000, DeVinney *et al* 2000). Ces PTP ont pour effet d'induire une altération de l'organisation du cytosquelette d'actine des macrophages humains, conduisant donc à l'inhibition de la phagocytose par ces macrophages. Ceci nous amène à supposer que les CcBV PTP actives peuvent exercer une action similaire sur la structure des hémocytes de *M. sexta*, aboutissant à l'inhibition de leurs propriétés d'adhésion, d'étalement nécessaires pour un déroulement normal du processus d'encapsulation.

Les cystatines, quant à elles, sont utilisées comme facteur de virulence par les nématodes filaires (Maizels *et al* 2001). Les cystatines de ces parasites parviennent à inhiber la prolifération des lymphocytes T de l'hôte vertébré, elles sont donc impliquées directement dans les mécanismes d'immunosuppression de leur hôte. Dans le cas du système hôte / parasitoïde, les gènes CcBV cyst pourraient influencer la prolifération des populations hémocytaires de l'hôte parasité.

Enfin, un troisième type de candidat est envisagé pour inhiber l'immunité de l'hôte, il s'agit des produits des gènes CcBV ank qui présentent une homologie significative avec les motifs à répétitions ankyrines de la protéine cactus de la drosophile. Des protéines

ankyrines sont des acteurs de la voie Toll de la drosophile, elles forment un complexe protéique cytoplasmique avec un facteur de transcription de type Rel impliqué dans la voie. Lorsque la voie Toll est activée par une attaque pathogène, le complexe protéique est dissocié, le facteur de transcription libéré active la transcription des gènes de peptides immunitaires. Les gènes ankyrine contenus dans le génome viral présentent tous la particularité de coder pour des protéines tronquées et dépourvues de l'élément régulateur qui permet la dégradation de cactus lors de l'induction de la voie Toll. L'asfvirus, African swine fever virus, et le poxvirus *Myxoma virus* utilisent une forme tronquée d'une protéine ankyrine (Revilla *et al* 1998, Camus-Bouclainville *et al* 2004) et bloque ainsi l'activation du facteur de transcription NF- κ B (protéine Rel des mammifères). Ce mécanisme original inhibe la réponse inflammatoire de l'hôte au cours de l'infection virale. Un mécanisme similaire pourrait être utilisé par le CcBV afin de bloquer les réactions immunitaires de l'hôte lors du parasitisme, et ainsi, laisser libre cours au développement des oeufs puis des larves de parasitoïde *C. congregata* dans l'hémolymphe de *M. sexta*.

PERSPECTIVES

Les hypothèses relatives au rôle potentiel des protéines d'origine virale restent limitées puisqu'elles sont corrélées aux connaissances dont on dispose concernant les voies de transduction de signaux et les cascades protéiques aboutissant à tel ou tel mécanisme, ou bien, elles sont basées sur la comparaison des protéines bracovirales avec des protéines similaires d'organismes infectants ou parasites, impliquées dans des mécanismes de modulation de la physiologie de l'organisme agressé. Les PTP étant impliquées dans de nombreuses voies de transduction de signaux, on peut supposer que les CcBV PTP peuvent intervenir dans l'altération de nombreuses voies de régulation de leur hôte et il s'agit à terme de déterminer la cible précise de chacune de ces protéines au cours du parasitisme.

Afin de répondre à ces questions, des études complémentaires devront être effectuées. La localisation de l'expression des protéines pourra être étudiée grâce à des expériences d'hybridation *in situ*, les tissus-cibles, voire les cellules-cibles pourront être repérés. Des anticorps polyclonaux anti-CcBv PTPA et anti-CcBV PTPM sont actuellement disponibles au laboratoire qui permettront d'identifier les tissus dans lesquels ces protéines sont exprimées. Des hybridations avec des glandes prothoraciques et les différentes populations hémocytaires d'hôtes parasités permettront peut-être d'indiquer si

les CcBV PTP sont exprimées en quantité importante et donc potentiellement impliquées dans l'inhibition des voies endocrines se déroulant dans les glandes prothoraciques.

Des expériences de double-hybride avec certaines CcBV PTP ont déjà été menées au laboratoire. Ces expériences ont pour objectif d'identifier les interactions des protéines virales avec telle ou telle protéine de l'hôte. L'identification des partenaires des protéines de CcBV PTP indiquera les voies de transduction du signal dans lesquelles les protéines virales interviennent.

Des purifications, sur résine fixant spécifiquement les tyrosines phosphorylées, des protéines de *Manduca sexta* parasitées, injectées par du virus purifié et non-parasitées, permettrait de déterminer, après séparation de ces protéines en gel bidimensionnel, quelle sont les protéines tyrosines phosphorylées absentes du profil protéique de *Manduca sexta* parasitées et injectées. Une fois ces protéines identifiées, on saurait avec quelle cascade de régulation les CcBV interagissent.

Des études par la technique de RNAi permettraient d'inhiber spécifiquement la traduction de tel ou tel ARN messenger, donc de visualiser l'effet spécifique de la protéine qui aurait dû être exprimée. Il est nécessaire que les effets induits par la protéine dont la traduction est inhibée, soient visibles ou aient un effet quantifiable. Par exemple, on pourrait vérifier sur des cellules High Five, des cellules S2 de drosophile et des hémocytes de *Manduca sexta* explantés si l'inhibition de la traduction des protéines CcBV PTP ou CcBV ankyrine induit des propriétés des cellules différentes de celles observées sans inactivation de la traduction de ces ARN (attachement et étalement sur lame).

Enfin, afin de répondre à la question posée initialement à propos des mécanismes de réplication et d'excision du génome viral contenu dans les particules virales injectées dans l'hôte, il est nécessaire de séquencer la forme intégrée sur les chromosomes. De telles données nous permettraient non seulement de répondre aux questions relatives aux mécanismes responsables de la réplication et de l'excision des cercles viraux, mais aussi de mettre en évidence l'existence des gènes de structure codant pour les nucléocapsides, et aussi peut-être les séquences de gènes absents des nucléocapsides codant pour des facteurs de virulences synthétisés uniquement dans le parasitoïde et actifs dès leur injection dans l'hôte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Suzuki, K. & Arai, S. (1987) Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *Journal of Biological Chemistry* 262:16793-16797.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. & Nathanson, C. M. (2003) Cystatins. *Biochemical Society Symposium* 70:179-199.
- 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* 5:441-450.
- Albrecht, U., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R., Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Kurt, F., Schümperli, D. & Lanzrein, B. (1994). Polydnavirus of the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): characterization, genome organization and time point of replication. *Journal of General Virology* 75:3353-3363.
- Alfonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Osorio, F.A., Balinsky, C., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2002) The genome of swinepox virus. *Journal of Virology* 76:793-790.
- Alleyne, M., Beckage, N. E. (1997) Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology*. 43:407-424.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:389-402.
- Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J., Sayers, C. A., Sunter, D. C. & Barrett, A. J. (1983) Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochemical Journal* 211:129-138.
- Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., Jansen, P. G., Andersen, H. S., Tonks, N. K. & Moller, N. P. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Molecular and Cellular Biology* 21:7117-36.
- Anderson, K. V. (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Current Opinion in Immunology* 12:13-19.
- Anggraeni, T. & Ratcliffe, N. A. (1991) Studies on cell-cell co-operation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* 37:453-460.
- Asgari, S., Hellers, M. & Schmidt, O. (1996) Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of General Virology* 77:2653-2662.
- Asgari, S & Schmidt, O. (2001) Promoter studies of a polydnavirus gene from *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae). *Archives of Virology* 146:1979-1989.
- Asgari, S. & Schmidt, O. (2002) A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:497-504.
- Asgari, S., Schmidt, O. & Theopold, U. (1997) A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. *Journal of General Virology* 78:3061-3070.
- Asgari, S., Theopold, U., Wellby, C. & Schmidt, O. (1998) A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:3690-3695.
- Asgari, S., Zhang, G., Zareie, R. & Schmidt, O. (2003) A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:1017-1024.
- Asling, B., Dushay, M. S. & Hultmark, D. (1995) Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:511-518.

- Balgopal, M. M., Dover, B. A., Goodman, W. G. & Strand, M. R. (1996) Parasitism by *Microplitis demolitor* induces alterations in the juvenile hormone titers and juvenile hormone esterase activity of its host, *Pseudaletia includens*. *Journal of Insect Physiology* 42:337-345.
- Barford, D., Flint, A. J. & Tonks, N. K. (1994) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* 263:1397-404.
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K.L. (1982) L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal* 201:189-198.
- Beck, B. & Strand, M. R. (2003) RNA interference silences *Microplitis demolitor* bracovirus genes and implicates *gcl1.8* in disruption of adhesion in infected host cells *Virology* 314:521-535
- Beckage, N. E. (1998) Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. *Parasitology* 116:57-64.
- Beckage, N. E. & De Buron, I. (1993). Lack of prothoracic gland degeneration in developmentally arrested host larvae of *Manduca sexta* parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:103-106.
- Beckage, N. E. & De Buron, I. (1994) Extraembryonic membranes of the endoparasitic wasp *Cotesia congregata*: presence of a separate amnion and serosa. *Journal of Parasitology* 80:389-396.
- Beckage, N. E. & Gelman, D. B. (2001) Parasitism of *Manduca sexta* by *Cotesia congregata*: a multitude of disruptive effects. In: Endocrine interactions of parasites and pathogens. Edwards, J. P. & Weaver, R. J. (eds) BIOS, Oxford, p. 59-81.
- Beckage N. E. & Kanost M. R. (1993) Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on host hemolymph proteins of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 23:643-653.
- Beckage, N. E. & Riddiford, L. M. (1982) Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *General and Comparative Endocrinology* 47:308-322.
- Beckage, N. E. & De Buron, I. (1993). Lack of prothoracic gland degeneration in developmentally arrested host larvae of *Manduca sexta* parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 61:103-106.
- Beckage, N. E., Foreman, R. C., Palmatier, C. M. & Tan, F. F. (2002) Inhibition of the larval ecdysis and emergence behavior of the parasitoid *Cotesia congregata* by methoprene. *Journal of Insect Physiology* 48:725-732.
- Beckage, N. E. & Gelman, D. B. (2004) Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology* 49:299-330.
- Beckage, N. E., Gelman, D. B., Chappell, M. A., & Alleyne, M. (1997) Effects of parasitism by the braconid wasp *Cotesia congregata* on metabolic rate in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 43:143-154.
- Beckage, N. E., Reed, D. A., Gelman, D. B. & Kelly, T. J. (1998) Effects of parasitization by *Cotesia congregata* on the brain-prothoracic gland axis of its host, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 44:323-332.
- Beckage, N. E., Tan, F., Schleifer, K. W., Lane, R. D. & Cherubin, L. L. (1994) Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 26:165-195.
- Beliveau, C., Laforge, M., Cusson, M. & Bellemare, G. (2000) Expression of a *Tranosema rostrale* polydnavirus gene in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Journal of General Virology* 81:1871-1880.
- Beliveau, C., Levasseur, A., Stoltz, D. & Cusson, M. (2003) Three related TrIV genes: comparative sequence analysis and expression in host larvae and Cf-124T cells. *Journal of Insect Physiology* 49:501-511.
- Belle, E., Beckage, N.E., Rousselet, J., Poirié, M., Lemeunier, F. & Drezen, J.-M. (2002). Visualization of polydnavirus sequences in a parasitoid wasp chromosome. *Journal of Virology* 76:5793-5796.

- Belshaw, R., Fitton, M., Herniou, E., Gimeno, C. & Quicke, D.L.J. (1998) A phylogenetic reconstruction of the Ichneumonoidea (Hymenoptera) based on the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. *Systematic Entomology* 23:109–123.
- Bettencourt, R., Assefaw-Redda, Y. & Faye, I. (2000) The insect immune protein hemolin is expressed during oogenesis and embryogenesis. *Mechanisms of Development* 95:301-304.
- Bettencourt, R., Lanz-Mendoza, H., Lindquist, K. R. & Faye, I. (1997) Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. *European Journal of Biochemistry* 15:630-637.
- Blevess, S. & Cornelis, G. R. (2000) How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes and Infection* 2:1451-1460.
- Blissard, G. W., Smith, O. P. & Summers, M. D. (1987) Two related viral genes are located on a single superhelical DNA segment of the multipartite *Campoletis sonorensis* virus genome. *Virology* 160:120-134.
- Blissard, G. W., Theilmann, D. A. & Summers, M. D. (1989) Segment W of *Campoletis sonorensis* virus: Expression, gene products, and organization. *Virology* 169:78-89.
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J. & Turk, V. (1988) The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO Journal* 7:2593-2599.
- Brillard-Bourdet, M., Nguyen, V., Ferrer-Di Martino, M., Gauthier, F. & Moreau, T. (1998) Purification and characterization of a new cystatin inhibitor from Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Biochemical Journal* 331:239-244.
- Brown, W. M. & Dziegielewska, K. M. (1997). Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. *Protein Science* 6:5-12.
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorselaer, A. & Hoffmann, J. A. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *Journal of Biological Chemistry* 15:14893-14897.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. & Hoffmann, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* 23:329-344.
- Burge, C. & Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology* 268, 78–94.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. & McFadden, G. (1999) The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* 264:298-318.
- Camus-Bouclainville, C., Fiette, L., Bouchiha, S., Pignolet, B., Counor, D., Filipe, C., Gelfi, J. & Messud-Petit, F. (2004) A virulence factor of myxoma virus colocalizes with NF-kappaB in the nucleus and interferes with inflammation. *Journal of Virology* 78:2510-2516.
- Chen, Y. P. & Gundersen-Rindal, D. E. (2003) Morphological and genomic characterization of the polydnavirus associated with the parasitoid wasp *Glyptapanteles indiensis* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of General Virology* 84:2051-2060.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. & Gundersen-Rindal, D. E. (2003) Quantitation of a *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus gene expressed in parasitized host, *Lymantria dispar*, by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 114:125-33.
- Chen, Y. P., Taylor, P. B., Shapiro, M. & Gundersen-Rindal, D. E. (2003) Quantitative expression analysis of a *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus protein tyrosine phosphatase gene in its natural lepidopteran host, *Lymantria dispar*. *Insect Molecular Biology* 12:271-80.
- Clark, K. D., Pech, L. L. & Strand, M. R. (1997) Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *Journal of Biological Chemistry* 272:23440-23447.
- Clark, K. D., Witherell, A. & Strand, M. R. (1998) Commun Plasmatocyte spreading peptide is encoded by an mRNA differentially expressed in tissues of the moth *Pseudoplusia includens*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 250:479-485.

- Clem, R. J., Robson, M. & Miller, L. K. (1994) Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene *p35* and the adjacent gene *p94*. *Journal of Virology* 68:6759-6762.
- Cole, T. J., Beckage, N. E., Tan, F. F., Srinivasan, A. & Ramaswamy, S. B. (2002) Parasitoid-host endocrine relations: self-reliance or co-optation? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1673-1679.
- Cui, L. & Webb, B. A. (1996) Isolation and characterization of a member of the cysteine-rich gene family from *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *Journal of General Virology* 77:797-809
- Cui, L. & Webb, B.A. (1997) Homologous sequences in the *Campoletis sonorensis* polydnavirus genome are implicated in replication and nesting of the W segment family. *Journal of Virology* 71:8504–8513.
- Cui, L., Soldevila, A. & Webb, B. A. (1997) Expression and hemocyte-targeting of a *Campoletis sonorensis* polydnavirus cysteine-rich gene in *Heliothis virescens* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 36:251-271.
- Cui, L., Soldevila, A. I. & Webb, B. A. (2000) Relationships between polydnavirus gene expression and host range of the parasitoid wasp *Campoletis sonorensis*. *Journal of Insect Physiology*. 46:1397-1407.
- Daffre, S. & Faye, I. (1997) Lipopolysaccharide interaction with hemolin, an insect member of the Ig-superfamily. *FEBS Letters* 408:127-130.
- Dahlman, D. L., Rana, R. L., Schepers, E. J., Schepers, T., DiLuna, F. A. & Webb, B. A. (2003) A teratocyte gene from a parasitic wasp that is associated with inhibition of insect growth and development inhibits host protein synthesis. *Insect Molecular Biology* 12:527-534.
- De Buron, I. & Beckage, N. E. (1992) Characterization of a polydnavirus (PDV) and virus-like filamentous particle (VLFP) in the braconid wasp *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 59:315–327.
- De Buron, I. & Beckage, N. E. (1997) Developmental changes in teratocytes of the braconid wasp *Cotesia congregata* in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 43:915-930.
- Delbridge, M. L. & Kelly, L. E. (1990) Sequence analysis, and chromosomal localization of a gene encoding a cystatin-like protein from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters* 274:141-145.
- Deleuil, F., Mogemark, L., Francis, M. S., Wolf-Watz, H. & Fallman, M. (2003) Interaction between the *Yersinia* protein tyrosine phosphatase YopH and eukaryotic Cas/Fyb is an important virulence mechanism. *Cellular Microbiology* 5:53-64.
- Delhon, G., Tulman, E. R., Afonso, C. L., De La Concha-Bermejillo, A., Lehmkuhl, H. D., Piccone, M. E., Kustish, G. F. & Rock, D. L. (2004) Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus. *Journal of Virology* 78:168-177.
- Deng, L., Stoltz, D. B. & Webb, B. A. (2000) A gene encoding a polydnavirus structural polypeptide is not encapsidated. *Virology* 269:440–450.
- DeVinney, I., Steele-Mortimer, I. & Finlay, B. B. (2000) Phosphatases and kinases delivered to the host cell by bacterial pathogens. *Trends in Microbiology* 8:29-33.
- Dib-Hajj, S. D., Webb, B. A. & Summers, M. D. (1993) Structure and evolutionary implications of a "cysteine-rich" *Campoletis sonorensis* polydnavirus gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90:3765-3769.
- Dimarcq, J. L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *European Journal of Biochemistry* 221:201-209.
- Doucet, D. & Cusson, M. (1996) Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 114:311-317.
- Dowton, M. & Austin, A. D. (1998) Phylogenetic relationships among the microgastroid (Hymenoptera: Braconidae): combined analysis of 16S and 28S rDNA genes, and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10:354–366.

- Dowton, M., Austin, A. D. & Antolin, M. F. (1998). Evolutionary relationships among the braconidae (Hymenoptera: Ichneumoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. *Insect Molecular Biology* 7, 129–150.
- Drezen, J. M., Huguet, E., Dupuy, C. & Poirié, M. (2000) Polydnnaviruses: how viruses evolve after domestication. *Research Advances in Virology* 1:45-77.
- Drezen, J. M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirié, M., Periquet, G. & Huguet, E. (2003) Polydnnavirus genome: integrated vs. free virus. *Journal of Insect Physiology* 49:407-417.
- Dunn, P. E., Dai, W., Kanost, M. R. & Geng, C. X. (1985) Soluble peptidoglycan fragments stimulate antibacterial protein synthesis by fat body from larvae of *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology* 9:559-568.
- Dupas, S., Turnbull, M. W. & Webb, B. A. (2003) Diversifying selection in a parasitoid's symbiotic virus among genes involved in inhibiting host immunity. *Immunogenetics* 55:351-361.
- Dushay, M. S., Asling, B. & Hultmark, D. (1996) Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 93:10343-10347.
- Dushay, M. S. & Beckage, N. E. (1993) Dose-dependent separation of *Cotesia congregata*-associated polydnnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. *Journal of Insect Physiology* 39:1029-1040.
- Dyall, D., Brown, M. T. & Johnson, P. T. (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304:253-257.
- Dziarski, R. (2004) Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology* 40:877-886.
- Edson K. M., Stoltz D. B., Vinson B. S. & Summers, M. D. (1981) Virus in a parasitoid wasp: suppression of cellular immune response in the parasitoid's host. *Science* 211:582-583.
- Einerwold J., Jaseja, M., Hapner, K., Webb, B. A. & Copie, V. (2001) Solution structure of the carboxyl-terminal cysteine-rich domain of the VHv1.1 polydnnaviral gene product: comparison with other cystine knot structural folds. *Biochemistry* 40:14404-14412.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S. & Schneider, D. Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Current Biology* 10:781-784.
- Ernst, J. D. (2000) Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cellular Microbiology* 2:379-86.
- Esnard, A., Esnard, F., Guillou, F. & Gauthier, F. (1992) Production of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C by rat Sertoli cells. *FEBS Letters* 300:131-135.
- Espagne, E., Douris, V., Lalmanach, G., Provost, B., Cattolico, L., Iatrou, K., Drezen, J. M. & Huguet, E. (2004) A virus for hymenopteran parasite survival into its lepidopteran host expresses genes encoding cystatins. *Journal of Biological Chemistry*, Soumis.
- Espagne, E., Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., Provost, B., Martins, N., Poirié, M., Periquet, G. & Drezen, J.-M. (2004). Genome sequence of a polydnnavirus : Insights into symbiotic virus evolution. *Science* 306:286-289.
- Falabella, P., Varricchio, P., Gigliotti, S., Tranfaglia, A., Pennacchio, F. & Malva, C. (2003) Toxoneuron nigriceps polydnnavirus encodes a putative aspartyl protease highly expressed in parasitized host larvae. *Insect Molecular Biology* 12:9-17.
- Farrell, P. J., Lu, M., Prevost, J., Brown, C., Behie, L. & Iatrou, K. (1998) High-level expression of secreted glycoproteins in transformed lepidopteran insect cells using a novel expression vector. *Biotechnology and Bioengineering* 60:656-663
- Fehlbaum, P., Bulet P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1994) Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry* 269:33159-33163.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- Ferrandon, D., Jung, A. C., Criqui, M., Lemaitre, B., Uttenweiler-Joseph, S., Michaut, L., Reichhart, J. & Hoffmann, J. A. (1998) A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in *Drosophila* that is not dependent on the Toll pathway. *EMBO Journal* 17:1217-1227.
- Ferry E. Rôle du gène MHR1 dans l'expression du pouvoir pathogène du virus myxomateux. Thèse doctorale de l'université de Toulouse III. (Numéro national des thèses : 1999 TOU 34014).
- Fleming, J. A. G. W. & Krell, P. J. (1993) Polydnavirus genome organization. In: Parasites and pathogens of insects Vol. 1, Academic, San Diego, p. 189-225.
- Fleming, J.A.G.W. & Summers, M. D. (1986) *Campoletis sonorensis* endoparasitic wasps contain forms of *C. sonorensis* virus DNA suggestive of integrated and extrachromosomal polydnavirus DNAs. *Journal of Virology* 57:552-562.
- Fleming, J.A.G.W. & Summers, M.D. (1991) Polydnavirus DNA is integrated in the DNA of its parasitoid wasp host. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:9770-9774.
- Flint, A. J., Tiganis, T., Barford, D. & Tonks, N. K. (1997) Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94:1680-1685.
- Foukas, L. C., Katsoulas, H. L., Paraskevopoulou, N., Metheniti, A., Lambropoulou, M. & Marmaras, V. J. (1998) Phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes requires both activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and beta3 integrin for internalization. *Journal of Biological Chemistry* 273:14813-14818.
- Galibert, L., Rocher, J., Ravallec, M., Duonor-Cerutti, M., Webb, B. A. & Volkoff, A. N. (2003) Two *Hyposoter didymator* ichnovirus genes expressed in the lepidopteran host encode secreted or membrane-associated serine and threonine rich proteins in segments that may be nested. *Journal of Insect Physiology* 49:441-51.
- Gardiner, E. M. & Strand, M. R. (2000) Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 43:147-164.
- Ghosh S., May M. J. & Kopp, E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 16:225-260.
- Gilbert, L. I., Rybczynski, R. & Warren, J. T. (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology*. 47:883-916.
- Glatz, R., Schmidt, O. & Asgari, S. (2003) Characterization of a novel protein with homology to C-type lectins expressed by the *Cotesia rubecula* bracovirus in larvae of the lepidopteran host, *Pieris rapae*. *Journal of Biological Chemistry* 278:19743-19750.
- Glatz, R., Schmidt, O., Asgari, S. (2004) Isolation and characterization of a *Cotesia rubecula* bracovirus gene expressed in the lepidopteran *Pieris rapae*. *Journal of General Virology* 85:2873-2882.
- Goto, S. G. & Denlinger, D. L. (2002) Genes encoding two cystatins in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis* and their distinct expression patterns in relation to pupal diapause. *Gene* 292:121-127.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J. A., Ferrandon, D. & Royet, J. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 416:640-644.
- Gruber, A., Stettler, P., Heiniger, P., Schumperli, D. & Lanzrein, B. (1996). Polydnavirus DNA of the braconid wasp *Chelonus inanitus* is integrated in the wasp genome and excised only in later pupal and adult stages of the female. *Journal of General Virology* 77:2873-2879.
- Gundersen-Rindal, D. & Dougherty, E.M., 2000. Evidence for integration of *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus DNA into the chromosome of *Lymantria dispar* *in vitro*. *Virus Research* 66:27-37.
- Gundersen-Rindal, D., Lynn, D. E. & Dougherty, E. M. (1999) Transformation of lepidopteran and coleopteran insect cell lines by *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus DNA. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal* 35:111-114.
- Hakes, D. J., Martell, K. J., Zhao, W. G., Massung, R. F., Esposito, J. J. & Dixon, J. E. (1993) A protein phosphatase related to the vaccinia virus VH1 is encoded in the genomes of several orthopoxviruses and a baculovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:4017-4021.

- Hall, M., Wang, R., Van Antwerpen, R., Sottrup-Jensen, L. & Soderhall, K. (1999) The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:1965-1970.
- Hamm, J., Styer, E. L. & Lewis, W. J. (1990) Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 55:357-374.
- Hartmann, S., Kyewski, B., Sonnenburg, B. & Lucius, R. (1997) A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *European Journal of Immunology* 27:2253-2260.
- Harwood, S. H. & Beckage, N. E. (1994) Purification and characterization of an early-expressed polydnavirus-induced protein from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24:685-698.
- Harwood, S. H., Grosovsky, A. J., Cowles, E. A., Davis, J. W. & Beckage, N. E. (1994) An abundantly expressed hemolymph glycoprotein isolated from newly parasitized *Manduca sexta* larvae is a polydnavirus gene product. *Virology* 205:381-392.
- Harwood, S. H., McElfresh, J. S., Nguyen, A., Conlan, C. A. & Beckage, N. E. (1998) Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:271-279.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., Cory, J. S. & O'Reilly, D. R. (2003) The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology* 48:211-234.
- Hilgarth, R. S. & Webb, B. A. (2002) Characterization of *Campoletis sonorensis* ichnovirus segment I genes as members of the repeat element gene family. *Journal of General Virology* 83:2393-2402.
- Hoffmann, J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426:33-38.
- Hoffman, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. Jr. & Ezekowitz, R. A. B. (1999) Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* 284:1313-1318.
- Hoffmann, J. A. & Reichhart, J.-M. (1997) *Drosophila* immunity. *Trends in Cell Biology* 7 309-316.
- Homma, K., Kurata, S. & Natori, S. (1994) Purification, characterization, and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly), and its involvement in the differentiation of imaginal discs. *Journal of Biological Chemistry* 269:15258-15264.
- Hotta, M., Okuda, T. & Tanaka, T. (2001) *Cotesia kariyai* teratocytes: growth and development. *Journal of Insect Physiology* 47:31-41
- Huang, X., Adams, M. D., Zhou, H. & Kerlavage, A. R. (1997) A tool for analyzing and annotating genomic sequences. *Genomics* 268:78-94.
- Hynes, R. O. & Zhao, Q. (2000) The evolution of cell adhesion. *Journal of Cell Biology* 150:89-96.
- Iketani, M. & Morishima, I. (1993) Induction of antibacterial protein synthesis by soluble peptidoglycan in isolated fat body from larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 23:913-917.
- Imler, J. L. & Hoffmann, J. A. (2000) Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology* 3:16-22.
- Imler, J. L. & Zheng, L. (2004) Biology of Toll receptors: lessons from insects and mammals. *Journal of Leukocyte Biology* 75:18-26.
- Imler, J. L. & Reichhart, J. M. (2001) Immunité innée : deux récepteurs pour détecter l'ADN bactérien. *Médecine/Sciences*.17:510-512
- Iyer L. M., Aravind, L. & Koonin, E. V. (2001) Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *Journal of Virology* 75:11720-11734.
- Janeway, C. A. Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54:1-13.

- Janeway, C. A. Jr. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20:197-216.
- Je, Y. H., Chang, J. H., Choi, J. Y., Roh, J. Y., Jin, B. R., O'Reilly, A. M. & Kang, S. K. (2001) A defective viral genome maintained in *Escherichia coli* for generation of baculovirus expression vectors. *Biotechnology Letters* 23:575-582.
- Jiang, H., Ma, C., Lu, Z. Q. & Kanost, M. R. (2004) Beta-1,3-glucan recognition protein-2 (betaGRP-2) from *Manduca sexta*; an acute-phase protein that binds beta-1,3-glucan and lipoteichoic acid to aggregate fungi and bacteria and stimulate prophenoloxidase activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:89-100.
- Jiang, H., Wang, Y., Yu, X.-Q. & Kanost, M. R. (2003) Prophenoloxidase-activating Proteinase-2 from Hemolymph of *Manduca sexta*. A bacteria-inducible serine proteinase containing two clip domains *Journal of Biological Chemistry* 278:3552-3561.
- Johansson, M. W. (1999) Cell adhesion molecules in invertebrate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 23:303-315.
- Johner, A., & Lanzrein, B. (2002) Characterization of two genes of the polydnavirus of *Chelonus inanitus* and their stage-specific expression in the host *Spodoptera littoralis*. *Journal of General Virology* 83:1075-1085.
- Johner, A., Stettler, P., Gruber, A. & Lanzrein, B. (1999) Presence of polydnavirus transcripts in an egg-larval parasitoid and its lepidopterous host. *Journal of General Virology* 80:1847-1854.
- Kadono-Okuda, K., Weyda, F. & Okuda, T. (1998) *Dinocampus (=Perilitus) coccinellae* teratocyte-specific polypeptide: its accumulative property, localization and characterization. *Journal of Insect Physiology* 44:1073-1080.
- Kang, D., Liu, G., Lundstrom, A., Gelius, E. & Steiner, H. (1998) A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:10078-10082.
- Kanost, M. R., Jiang, H. & Yu, X.-Q. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* 198:97-105.
- Kanost, M. R., Zepp, M. K., Ladendorff, N. E. & Andersson, L. A. (1994) Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 27:123-136.
- Kashio, N., Matsumoto, W., Parker, S. & Rothstein, D. M. (1998) The second domain of the CD45 protein tyrosine phosphatase is critical for interleukin-2 secretion and substrate recruitment of TCR ζ *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 273:33856-33863.
- Keith, M. B., Farrell, P. J., Iatrou, K. & Behie, L. A. (2000) Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells. *Biotechniques* 28:148-154.
- Kelly, T. J., Gelman, D. B., Reed D. A. & Beckage, N. E. (1998) Effects of parasitization by *Cotesia congregata* on the brain-prothoracic gland axis of its host, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 44:323-332.
- Kidwell, M. G. & Lynch, D. R. (2000) Transposable elements and host genome evolution. *Tree* 15:95-99.
- Kim, D. & Weaver, R. F. (1993) Transcription mapping and functional analysis of the protein tyrosine/serine phosphatase (PTPase) gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 195:587-595.
- Kim, K. H., Rumenapf, T., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (2004) Regulation of Semliki Forest virus RNA replication: a model for the control of alphavirus pathogenesis in invertebrate hosts. *Virology* 323:153-163.
- Kim, M. K., Sisson, G. & Stoltz, D. (1996) Ichnovirus infection of an established gypsy moth cell line. *Journal of General Virology* 77:2321-2328.
- Kitano, H., Wago, H. & Arakawa, T. (1990) Possible role of teratocyte of the gregarious parasitoid, *Cotesia (=Apanteles) glomerata* in the suppression of phenoloxidase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 13:177-185.

- Koizumi, N., Imamura, M., Kadotani, T., Yaoi, K., Iwahana, H. & Sato, R. (1999) The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silkworm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate-recognition domains. *FEBS Letters* 443:139-143.
- Kopacek, P., Weise, C. & Gotz, P. (1995) The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25:1081-1091.
- Kordis, D. & Gubensek, F. (2000) Adaptive evolution of animal toxin multigene families. *Gene* 261:43-52.
- Krell, P. J. & Stoltz, D. B. (1979) Unusual baculovirus of the parasitic wasp *Apanteles melanoscelus*: isolation and primary characterization. *Journal of Virology* 29:1118-1130.
- Krell, P. J., Summers, M. D. & Vinson, S.B. (1982) Virus with a multipartite superhelical DNA genome from the ichneumonid parasitoid *Campoletis sonorensis*. *Journal of Virology* 43:859-870.
- Krieg, A. M. (2000) The role of CpG motifs in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 12:35-43.
- Kroemer, J. A. & Webb, B. A. (2004) Polydnavirus genes and genomes: Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. *Annual Review of Entomology* 49:431-456.
- Kurata, S., Saito, H. & Natori, S. (1992) Purification of a 29-kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina*. *European Journal of Biochemistry* 204:911-914.
- Kurata, S., Saito, H. & Natori, S. (1992) The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Developmental Biology* 153:115-121.
- Kylsten, P., Samakovlis, C. & Hultmark, D. (1990) The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO Journal* 9:217-224.
- Laber, B., Krieglstein, K., Henschen, A., Kos, J., Turk, V., Huber, R. & Bode, W. (1989) The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. *FEBS Letters* 248:162-168.
- Ladendorff, N. E. & Kanost, M. R. (1990) Isolation and characterization of bacteria-induced protein P4 from hemolymph of *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 15:33-41.
- Ladendorff, N. E. & Kanost, M. R. (1991) Bacteria-induced protein P4 (hemolin) from *Manduca sexta*: a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18:285-300.
- Lai-Fook, J. (1966) The repair of wounds in the integument of insects. *Journal of Insect Physiology* 12: 195-198.
- Lanz-Mendoza, H., Bettencourt, R., Fabbri, M. & Faye, I. (1996) Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. *Cellular Immunology* 169:47-54.
- Lanz-Mendoza, H. & Faye, I. (1999) Physiological aspects of the immunoglobulin superfamily in invertebrates. *Developmental & Comparative Immunology* 23:359-374.
- Lanzrein, B., Pfister-Wilhelm, R., Wyler, T., Trenczek, T. & Stettler, P. (1998) Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology* 44:817-831.
- Lanzrein, B., Treiblmayr, K., Meyer, V., Pfister-Wilhelm, R. & Grossniklaus-Burgin, C. (1998) Physiological and endocrine changes associated with polydnavirus/venom in the parasitoid-host system *Chelonus inanitus*-*Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology* 44:305-321.
- Lavine, M. D. & Beckage, N. E. (1996) Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology* 42:41-51
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2001) Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 47:965-974.
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1295-309.
- Lavine, M. D. & Strand, M. R. (2003) Haemocytes from *Pseudoplusia includens* express multiple alpha and beta integrin subunits. *Insect Molecular Biology* 12:441-452.

- Le, N. T., Asgari, S., Amaya, K., Tan, F. F. & Beckage, N. E. (2003) Persistence and expression of *Cotesia congregata* polydnavirus in host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 49:533-543.
- Lecaille, F., Weidauer, E., Juliano, M. A., Bromme, D. & Lalmanach, G. (2003) Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochemical Journal* 375:307-312.
- Lee, K. Y., Horodyski, F. M., Valaitis, A. P. & Denlinger, D. L. (2002) Molecular characterization of the insect immune protein hemolin and its high induction during embryonic diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1457-1467.
- Lemaitre, B. (1999) La drosophile : un modèle pour l'étude de la réponse immunitaire innée. *Médecine/Sciences* 15:15-22.
- Lemaitre, B. (2004) The road to Toll. *Nature Reviews Immunology* 4:521-527.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Leonard, C., Ratcliffe, N. A. & Rowley, A. F. (1985) The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *Journal of Insect Physiology* 31:789-799
- 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* 285:1917-1919.
- Levashina, E. A., Ohresser, S., Bulet, P., Reichhart, J. M., Hetru, C. & Hoffmann, J. A. (1995) Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties. *European Journal of Biochemistry* 233:694-700.
- Li, S., Falabella, P., Kuriachan, I., Vinson, S. B., Borst, D. W., Malva, C. & Pennacchio, F. Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titre in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*. *Journal of Insect Physiology* 49:1021-1030.
- Li, X., Webb, B. A. (1994) Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. *Journal of Virology* 68:7482-7489.
- Liu, C. T., Hou, R. F. & Chen, C. C. (1998) Formation of basement membrane-like structure terminates the cellular encapsulation of microfilariae in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *Parasitology* 116:511-518.
- Loret, S. M. & Strand, M. R. (1998) Follow-up of protein release from *Pseudoplusia includens* hemocytes: a first step toward identification of factors mediating encapsulation in insects. *European Journal of Cell Biology* 76:146-155.
- Lovallo, N. & Cox-Foster, D. L. (1999) Alteration in FAD-glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *Journal of Insect Physiology*. 45:1037-1048.
- Lu, M., Farrell, P. J., Johnson, R. & Iatrou, K. (1997) A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *Journal of Biological Chemistry* 272:30724-30728.
- Luckhart, S. & Webb, B. A. (1996) Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Developmental and Comparative Immunology* 20:1-21.
- Luo, C. & Zheng, L. (2000) Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics* 51:92-98.
- Lustigman, S., Brotman, B., Huima, T., Prince, A. M. & McKerrow, J. H. (1992) Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*. *Journal of Biological Chemistry* 267:17339-17346.
- Lustigman, S., McKerrow, J. H., Shah, K., Lui, J., Huima, T., Hough, M. & Brotman, B. (1996) Cloning of a cysteine protease required for the molting of *Onchocerca volvulus* third stage larvae. *Journal of Biological Chemistry* 271:30181-30189.

- Maiti, I. B., Dey, N., Pattanaik, S., Dahlman, D. L., Rana, R. L. & Webb, B. A. (2003) Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*). *Plant Biotechnology* 1:209-219.
- Maizels, R. M., Blaxter, M. L. & Scott, A. L. (2001) Immunological genomics of *Brugia malayi*: filarial genes implicated in immune evasion and protective immunity. *Parasite Immunology* 23:327-344.
- Malva, C., Varricchio, P., Falabella, P., La Scaleia, R., Graziani, F. & Pennacchio, F. (2004) Physiological and molecular interaction in the host-parasitoid system *Heliothis virescens-Toxoneuron nigriceps*: current status and future perspectives. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:177-183.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Deweese-Scott, C., Fedorova, N. D., Geer, L. Y., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Madej, T., Marchler, G. H., Mazumder, R., Nikolskaya, A. N., Panchenko, A. R., Rao, B. S., Shoemaker, B. A., Simonyan, V., Song, J. S., Thiessen, P. A., Vasudevan, S., Wang, Y., Yamashita, R. A., Yin, J. J. & Bryant, S. H. (2003) CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 31:383-387.
- Marmaras, V. J., Charalambidis, N. D. & Zervas, C. G. (1996) Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 31:119-133.
- McGraw, E. A. & O'Neill, S. L. (2004) *Wolbachia pipientis*: intracellular infection and pathogenesis in *Drosophila*. *Current Opinion in Microbiology* 7:67-70.
- McKelvey, T. A., Lynn, D. E., Gundersen-Rindal, D., Guzo, D., Stoltz, D. A., Guthrie, K. P., Taylor, P. B. & Dougherty, E. M. (1996) Transformation of gypsy moth (*Lymantria dispar*) cell lines by infection with *Glyptapanteles indiensis* polydnavirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 23:764-770.
- Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Meister, M. (2000) L'hématopoïèse chez la drosophile. *Médecine/Sciences* 16:1444-1446.
- Meister, M. & Lagueux, M. (2003) *Drosophila* blood cells. *Cellular Microbiology* 5: 573-580.
- Metheniti, A., Paraskevopoulou, N., Lambropoulou, M. & Marmaras, V. J. (2001) Involvement of FAK/Src complex in the processes of *Escherichia coli* phagocytosis by insect hemocytes. *FEBS Letters* 496:55-59.
- Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A. & Royet, J. (2001) *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414:756-759
- Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E. & Yamano, Y. (1995) Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental and Comparative Immunology* 19:357-363.
- Najarro, P., Traktman, P. & Lewis, J. A. (2001) Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *Journal of Virology* 75:3185-3196.
- Nakamatsu, Y., Fujii, S. & Tanaka, T. (2002) Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. *Journal of Insect Physiology* 48:1041-1052.
- Nakamatsu, Y., Gytotoku, Y. & Tanaka, T. (2001) The endoparasitoid *Cotesia kariyai* (Ck) regulates the growth and metabolic efficiency of *Pseudaletia separata* larvae by venom and Ck polydnavirus. *Journal of Insect Physiology* 47:573-584.
- Nappi, A. J., Kohler, L. & Mastore, M. (2004) Signaling pathways implicated in the cellular innate immune responses of *Drosophila*. *Invertebrate Survival Journal* 1:5-33.
- Nappi, A. J. & Ottaviani, E. (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* 22:469-480.

- Nappi, A. J. & Vass, E. (1998) Acta Hydroxyl radical formation via iron-mediated Fenton chemistry is inhibited by methylated catechols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1425:159-167.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. & Carton, Y. (1996) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology* 68:450-456.
- Nappi, A. J., Vass, E., Frey, F. & Carton, Y. (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4:423-430.
- Nardi, J. B. (2003) Embryonic origins of the two main classes of hemocytes--granular cells and plasmatocytes--in *Manduca sexta*. *Development Genes and Evolution* 214:19-28.
- Nardi, J. B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. & Kanost M. R. (2003) Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Developmental Genes and Evolution* 213:477-491.
- Nardi, J. B., Pilas, B., Ujhelyi, E., Garsha, K. & Kanost, M. R. (2003) Hematopoietic organs of *Manduca sexta* and hemocyte lineages. *Development Genes and Evolution* 213:477-491.
- Nation J. L. (2002) Hormone and development. In: *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, Boca Raton. p. 119-155.
- Neel, B. G. & Tonks, N. K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 9:193-204.
- Newton, A. A. (1982) Viruses-exploiters or dependant of the host? *Parasitology* 85:189-216.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10:1-6.
- Ohta, T. (2000) Evolution of gene families. *Gene* 259:45-52.
- O'Reilly, A. M., Miller, L. K. & Luckow, V. A. (1992) Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. W. H. Freeman and Company, New York, 347 p.
- Pasquier-Barre, F., Dupuy, C., Huguët, E., Monteiro, F., Moreau, A., Poirie, M. & Drezen, J.M. (2002) Polydnavirus replication: the EP1 segment of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* is amplified within a larger precursor molecule. *Journal of General Virology* 83:2035-2045.
- Pech, L. L. & Strand, M. R. (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science* 109:2053-2060.
- Pech, L. L. & Strand, M. R. (2000) Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology* 46:1565-1573
- Pech, L. L., Trudeau, D. & Strand, M. R. (1995) Effects of basement membranes on the behavior of hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera; Noctuidae): Development of an *in vitro* encapsulation assay. *Journal of Insect Physiology* 41:801-807.
- Pennacchio, F., Falabella, P., Sordetti, R., Varricchio, P., Malva, C. & Vinson, S. B. (1998) Prothoracic gland inactivation in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera:Noctuidae) larvae parasitized by *Cardiophiles nigriceps* Viereck (Hymenoptera:Braconidae). *Journal of Insect Physiology* 44:845-857.
- Pennacchio, F., Falabella, P. & Vinson, S. B. (1998) Regulation of *Heliothis virescens* prothoracic glands by *Cardi chiles nigriceps* polydnavirus (CnPDV). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 38:1-10.
- Pennacchio, F., Malva, C. & Vinson, S. B. (2001) Regulation of host endocrine system by the endophagous braconid *Cardiophiles nigriceps* and its polydnavirus. In: *Endocrine interactions of insect parasites and pathogens*. Edwards, J. P. & Weaver, R. J. (eds), BIOS, Oxford, p. 123-132.
- Pennacchio, F., Sordetti, R., Falabella, P. & Vinson, S. B. (1997) Biochemical and ultrastructural alterations in prothoracic glands of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) last instar larvae parasitized by *Cardiophiles nigriceps* Viereck (Lepidoptera, Noctuidae-Hymenoptera, Braconidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:439-450.
- Pfister-Wilhelm, R. & Lanzrein, B. (1996) Precocious induction of metamorphosis in *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) by the parasitic wasp *Chelonus inanitus* (Braconidae): Identification of the parasitoid larva as the key regulatory element and the host corpora allata as the main targets. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32 : 511-525.

- Provost, B., Varricchio, P., Arana, E., Espagne, E., Falabella, P., Huguet, E., La Scaleia, R., Cattolico, L., Poirié, M., Malva, C., Olszewski, J. A., Pennacchio, F. & Drezen, J.-M. (2004) Bracoviruses contain a large multigenic family coding for Protein Tyrosine Phosphatases. Accepted par *Journal of Virology*.
- Quicke, D. L. J. (1997) Parasitic wasps. Chapman & Hall, London, 470 p.
- Rasmuson, T. & Boman, H.G., 1979. Insect immunity V. Purification and some properties of immune protein P4 from hemolymph of *Hyalophora cecropia pupae*. *Insect Biochemistry* 9:259–264.
- Ratcliffe, N. A. & Gagen, S. J. (1977) Studies on the in vivo cellular reactions of insects: an ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue and Cell* 9:73-85.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1990) Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 30:60-71.
- Reed, D. A. & Beckage, N. E. (1997) Inhibition of testicular growth and development in *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology* 43:29-38.
- Reichhart, J. M. & Imler, J. L. (2000) Toll story. *Médecine/Sciences* 12:1439-1442.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Vinuela, E. & Fresno, M. (1998) Inhibition of nuclear factor- κ B activation by a virus-encoded I κ B-like protein. *Journal of Biological Chemistry* 273:5405-5411.
- Riddiford, L. M., Hiruma, K., Zhou, X., Nelson, C. A. (2003) Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:1327-38.
- Rubtsov, A. M. & Lopina, O. L. (2000) Ankyrins. *FEBS Letters* 482:1-5.
- Saito, H., Suzuki, T., Ueno, K., Kubo, T. & Natori, S. (1989) Molecular cloning of cDNA for sarcocystatin A and analysis of the expression of the sarcocystatin A gene during development of *Sarcophaga peregrina*. *Biochemistry* 28:1749-1755.
- Sali, A. & Turk, V. (1987) Prediction of the secondary structures of stefins and cystatins, the low-molecular mass protein inhibitors of cysteine proteinases. *Biological chemistry* 368:493-499.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Savary, S., Beckage, N. E., Tan, F., Periquet, G. & Drezen, J.-M. (1997) Excision of the polydnavirus chromosomal integrated EP1 sequence of the parasitoid wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastinae) at potential recombinase binding sites. *Journal of General Virology* 78:3125–3134.
- Savary, S., Drezen, J.-M., Tan, F., Beckage, N. E. & Periquet, G. (1999) The excision of polydnavirus sequences from the genome of the wasp *Cotesia congregata* (Braconidae, Microgastinae) is developmentally regulated but not strictly restricted to the ovaries in the adult. *Insect Molecular Biology* 8:319–327.
- Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K. & Hartmann, S. (2003) Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infection and Immunity*. 71:2422-2429.
- Schmidt, H. A. & Von Haeseler, A. (2003) Maximum-Likelihood Analysis Using TREE-PUZZLE. In : Current Protocols in Bioinformatics. Baxevanis, A. D., Davison, D. B., Page, R. D. M. G., Stormo, G. & Stein, L. (eds), Wiley and Sons, New York, Unit 6.6.
- Schmidt, O., Theopold, U. & Strand, M. (2001) Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays* 23:344-351.
- Shchelkunov, S. N., Blinov, V. M. & Sandakhchiev, L. S. (1993) Ankyrine-like proteins of variola and vaccinia viruses. *FEBS Letters* 319:163-165.
- Shelby, K. S., Cui, L. & Webb, B. A. (1998) Polydnavirus-mediated inhibition of lysozyme gene expression and the antibacterial response *Insect Molecular Biology* 7:265-272.
- Shelby, K. S. & Webb, B. A. (1997) Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:263-270.
- Shelby, K. S. & Webb, B. A. (1999) Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *Journal of Insect Physiology* 45:507-514.

- Sheng, Z. & Charbonneau, H. (1993) The baculovirus *Autographa californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 268:4728-33.
- Shiba, H., Uchida, D., Kobayashi, H. & Natori, M. (2001) Involvement of cathepsin B- and L-like proteinases in silk gland histolysis during metamorphosis of *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 390:28-34.
- Shin, D. W., Ma, J. & Kim, D. H. (2000) The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca²⁺ and interacts with triadin. *FEBS Letters* 486:178-182.
- Shin, S. W., Park, S. S., Park, D. S., Kim, M. G., Kim, S. C., Brey, P. T. & Park, H. Y. (1998) *Hyphantria cunea* *hémoline* Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28:827-837.
- Smith, W., Priester, J. & Morais, J. (2003) PTTH-stimulated ecdysone secretion is dependent upon tyrosine phosphorylation in the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:1317-25.
- Soldevila, A. I., Heuston, S. & Webb, B. A. (1997) Purification and analysis of a polydnavirus gene product expressed using a poly-histidine baculovirus vector. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:201-211.
- Spradling, A.C. (1981) The organization and amplification of two chromosomal domains containing *drosophila* chorion genes. *Cell* 27:193-201.
- Stasiak, K., Demattei, M.-V., Federici, B. A. & Bigot, Y. (2000) Phylogenetic position of the *Diadromus pulchellus* ascovirus DNA polymerase among viruses with large double-stranded DNA genomes. *Journal of General Virology* 81:3059-3072.
- Stoltz, D. B. (1990) Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA. *Journal of General Virology* 71: 1051-1056.
- Stoltz, D. B., Beckage, N. E., Blissard, G. W., Fleming, J. G. W., Krell, P. J., Theilmann, D. A., Summers, M. D. & Webb, B. A. (1995) Polydnaviridae. In: Virus taxonomy. Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. & Summers, M. D. (eds). Springer-Verlag, News York, p. 143-147.
- Stoltz, D. B., Krell, P. J., Summers, M. D. & Vinson, S. B. (1984) Polydnaviridae - a proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes. *Intervirology* 21:1-4.
- Strand, M. R. & Clark, K. D. (1999) Plasmacyte spreading peptide induces spreading of plasmacytes but represses spreading of granulocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42:213-223.
- Strand, M. R. & Dover, B. A. (1991) Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18:131-145.
- Strand, M. R., Hayakawa, Y. & Clark, K. D. (2000) Plasmacyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *Journal of Insect Physiology* 46:817-824.
- Strand, M. R. & Pech, L. L. (1995) *Microplitis demolitor* polydnavirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. *Journal of General Virology* 76:283-291.
- Strand, M. R., Witherell, R. A. & Trudeau, D. (1997) Two *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in hemocytes of *Pseudoplusia includens* contain a common cysteine-rich domain. *Journal of Virology* 71:2146-2156.
- Strand, M. R. & Wong, E. A. (1991) The growth and role of *Microplitis demolitor* teratocytes in parasitism of *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology* 37:503-505
- Stulnig, T. M. & Amberger, A. (1994) Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *Biotechniques* 16:403-404.
- Su, X. D., Gastinel, L. N., Vaughn, D. E., Faye, I., Poon, P. & Bjorkman, P. J. (1998) Crystal Structure of Hemolin: A Horseshoe Shape with Implications for Homophilic Adhesion. *Science* 281:991-995.
- Sugumaran, M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research* 15:2-9.

- Suzuki, T. & Natori, S. (1985) Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Journal of Biological Chemistry* 260:5115-5120.
- Suzuki, T. & Natori, S. (1986) Changes in the amount of sarcocystatin A, a new cysteine proteinase inhibitor, during the development of adult *Sarcophaga peregrina*. *Insect Biochemistry* 16:589-595.
- Swofford, D. L., Olson, G. J., Waddell, P. J. & Hillis, D. L. (1996) Phylogenetic inference, p. 407-514. In D. M. Hillis, Moritz, C. and Mable, B. K. (eds) (ed.), *Molecular systematics*. Sinauer associates, Sunderland.
- Tagashira, E. & Tanaka, T. (1998) Parasitic castration of *Pseudaletia separata* by *Cotesia kariyai* and its association with polydnavirus gene expression. *Journal of Insect Physiology* 44:733-744
- Takahashi, N., Kurata, S. & Natori, S. (1993) Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body during metamorphosis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *FEBS Letters* 334:153-157.
- Tanaka T. (1987) Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. *Journal of Insect Physiology* 33:413-420.
- Tanaka, K., Tsuzuki, S., Matsumoto, H. & Hayakawa, Y. (2003) Expression of *Cotesia kariyai* polydnavirus genes in lepidopteran hemocytes and Sf9 cells. *Journal of Insect Physiology* 49:433-40.
- Tatusova, T. A. & Madden, T. L. (1999) Blast2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters* 174:247-250.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. A. & Imler, J. L. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:10520-10525.
- Teramoto, T. & Tanaka, T. (2003) Similar polydnavirus genes of two parasitoids, *Cotesia kariyai* and *Cotesia ruficrus*, of the host *Pseudaletia separata*. *Journal of Insect Physiology* 49:463-471.
- Theilmann, D. A. & M. D. Summers (1986) Molecular analysis of *Campoletis sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. *Journal of General Virology* 67:1961-1969.
- Theilmann, D. A. & Summers, M. D. (1987) Physical analysis of the *Campoletis sonorensis* virus multipartite genome and identification of a family of tandemly repeat elements. *Virology* 61:2589-2598.
- Theilmann, D. A. & Summers, M. D. (1988) Identification and comparison of *Campoletis sonorensis* virus transcripts expressed from four genomic segments in the insect hosts *Campoletis sonorensis* and *Heliothis virescens*. *Virology* 167:329-41.
- Theopold, U. & Schmidt, O. (1997) *Helix pomatia* lectin and annexin V, two molecular probes for insect microparticles: possible involvement in hemolymph coagulation. *Journal of Insect Physiology* 43:667-674.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Trudeau, D., Witherell, R. A. & Strand, M. R. (2000) Characterization of two novel *Microplitis demolitor* polydnavirus mRNAs expressed in *Pseudoplusia includens* haemocytes. *Journal of General Virology* 81:3049-3058.
- Tulman, E. R., Afonso, C. L., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. The genome of canarypox virus. *Journal of Virology* 78:353-366.
- Turnbull, M. & Webb, B. A. (2002) Perspectives on polydnavirus origins and evolution. *Advances in Virus Research* 58:203-254.
- Urwin, P. E., McPherson, M. J. & Atkinson, H. J. (1998) Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. *Planta* 204:472-479.
- Van Vactor, D., O'Reilly, A. M. & Neel, B. G. (1998) Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. *Current Opinion in Genetics & Development* 8:112-126.
- Varricchio, P., Falabella, P., Sordetti, R., Graziani, F., Malva, C. & Pennacchio, F. (1999) *Cardiochiles nigriceps* polydnavirus: molecular characterization and gene expression in parasitized *Heliothis virescens* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:1087-1096.

- Vasta, G. R., Quesenberry, M., Ahmed, H. & O'Leary N. (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Developmental & Comparative Immunology* 23:401-420.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13:213-217.
- Verdot, L., Lalmanach, G., Vercruyse, V., Hoebeke, J., Gauthier, F. & Vray, B. (1999) Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis. *European Journal of Biochemistry* 266:1111-1117.
- Volkoff, A. N., Bêliveau, C., Rocher, J., Hilgarth, R., Lévasseur, A., Duonor-Cerutti, M. M. Cusson & Webb, B. A. (2002) Evidence for a conserved polydnavirus gene family: ichnovirus homologs of the CsIV repeat element genes. *Virology* 300:316-331.
- Volkoff, A. N., Cerutti, P., Rocher, J., Ohresser, M. C., Devauchelle, G., and Duonor-Cerutti, M. (1999) Related RNAs in lepidopteran cells after in vitro infection with *Hyposoter didymator* virus define a new polydnavirus gene family. *Virology* 263:349-363.
- Volkoff, A. N., Ravallec, M., Bossy, J., Cerutti, P., Rocher, J., Cerutti, M., Devauchelle, G., 1995. The replication of *Hyposoter didymator* polydnavirus: cytopathology of the calyx cells in the parasitoid. *Biology of the Cell* 83:1-13.
- Volkoff, A. N., Rocher, J., Cerutti, P., Ohresser, M. C., D'Aubenton-Carafa, Y., Devauchelle, G. & Duonor-Cerutti, M. (2001) Persistent expression of a newly characterized *Hyposoter didymator* polydnavirus gene in long-term infected lepidopteran cell lines. *Journal of General Virology* 82:963-969.
- Vray, B., Hartmann, S. & Hoebeke, J. (2002) Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell and Molecular Life Science* 59:1503-1512.
- Wang, Y., Willott, E. & Kanost, M. R. (1995) Organization and expression of the hemolin gene, a member of the immunoglobulin superfamily in an insect, *Manduca sexta*. *Insect Molecular Biology* 4:113-123.
- Wasburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. T., Beckage, N. E. & Volkman, L. E. (2000) Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology* 46:179-190.
- Webb, B. A. (1998) Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In: The insect viruses. Miller, L. K. & Ball, L. A. (Eds.), Plenum Publishing Corporation, New York, p. 105-139.
- Webb, B. A. (2002) Reductive and proliferative evolution in the genome of an obligately, mutualistic virus. In: 8th European Workshop on Insect Parasitoids, Tours, September, 2002.
- Webb, B. A. & Dahlman, D. L. (1986) Ecdysteroid influence on the development of the host *Heliothis virescens* and its endoparasite *Microplitis croceipes*. *Journal of Insect Physiology* 32:339-345.
- Webb, B. A. & Summers, M. D. (1990) Venom and viral expression products of the endoparasitic wasp *Campoletis sonorensis* share epitopes and related sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87:4961-4965.
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K. P., Morse, M. A., Imler, J. L., Gay, N. J. (2003) Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature Immunology* 4:794-800.
- Weis, W. I., Taylor, M. E. & Drickamer, K. (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews* 163:19-34.
- Werner, T., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H. & Hultmark, D. (2003) Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 18:26319-26322.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H. & Hutmark, D. (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:13772-13777.
- Whitfield, J. B. (1990) Parasitoids, polydnaviruses and endosymbiosis. *Parasitology Today* 6:381-384.

- Whitfield, J. B. (1997) Molecular and morphological data suggest a single origin of the polydnviruses among braconid wasps. *Naturwissenschaften* 84:502-507.
- Whitfield, J. B. (1998) Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 43:129-151.
- Whitfield, J. B. (2000) Phylogeny of microgastroid braconid wasps, and what it tells us about polydnvirus evolution. In: Austin, A.D., Donwnton, M. (Eds.), *The hymenoptera: evolution, biodiversity and biological control*. CSIRO Publishing, Melbourne, p. 97–104.
- Whitfield, J. B. (2002) Estimating the age of the polydnvirus/braconid wasp symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:7508–7513.
- Whitfield, J. B. & Asgari, S. (2003) Virus or not? Phylogenetics of polydnviruses and their wasp carriers. *Journal of Insect Physiology* 49:397-405.
- Wicker, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hultmark, D., Samakovlis, C. & Hoffmann, J. A. (1990) Insect immunity. Characterization of a *Drosophila* cDNA encoding a novel member of the dipterin family of immune peptides. *Journal of Biological Chemistry* 265:22493-22498.
- Wiegand, C., Levin, D., Gillespie, J., Willott, E., Kanost, M. & Trenczek, T. (2000) Monoclonal antibody MS13 identifies a plasmatocyte membrane protein and inhibits encapsulation and spreading reactions of *Manduca sexta* hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 45:95-108.
- Willott, E., Trenczek, T., Thrower, L. W. & Kanost, M. R. (1994) Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *European Journal of Cell Biology* 65:417-423.
- Wright, S. D. (1999) Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *Journal of experimental medicine* 189:605-609.
- Wyder, S., Blank, F. & Lanzrein, B. (2003) Fate of polydnvirus DNA of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* in the host *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology* 49:491-500.
- Wyder, S., Tschannen, A., Hochuli, A., Gruber, A., Saladin, V., Zumbach, S. & Lanzrein, B. (2002) Characterization of *Chelonus inanitus* polydnvirus segments: sequences and analysis, excision site and demonstration of clustering. *Journal of General Virology* 83:247-56.
- Wyder, S., Tschannen, A., Hochuli, A., Gruber, A., Saladin, V., Zumbach, S. & Lanzrein, B. (2002) Characterization of *Chelonus inanitus* polydnvirus segments: sequences and analysis, excision site and demonstration of clustering. *Journal of General Virology* 83:247–256.
- Wyers, F., Petitjean, A. M., Dru, P., Gay, P. & Contamine, D. (1995) Localization of domains within the *Drosophila* Ref(2)P protein involved in the intracellular control of sigma rhabdovirus multiplication. *Journal of Virology* 69:4463-4470.
- Xu, D. & Stoltz, D. B. (1991) Evidence for a chromosomal location of polydnvirus DNA in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology* 65:6693–6704.
- Xu, D. & Stoltz, D. B. (1993) Polydnvirus genome segment families in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter fugitivus*. *Journal of Virology* 67:1340–1349.
- Xu, Y. & Kawasaki, H. (2001). Isolation and expression of cathepsin B cDNA in hemocytes during metamorphosis of *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 130:393-399.
- Yan, H., Yagy, F., Okitsu, S., Nishio, O. & Ushijima, H. (2003) Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and Astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. *Journal of Virological Methods* 114:37-44.
- Yasuhara Y., Koizumi Y., Katagiri C. & Ashida M. (1995) Reexamination of properties of prophenoloxidase isolated from larval hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 320:14-23.
- Yin, L., Zhang, C., Qin, J. & Wang, C. (2003) Polydnvirus of *Campoletis chloridaeae*: characterization and temporal effect on host *Helicoverpa armigera* cellular immune response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 52:104-113.

- Yoshida, H., Ochiai, M. & Ashida, M. (1986) Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are present as separate entities within insect prophenoloxidase activating system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141:1177-1184.
- Yu, X. Q. & Kanost, M. R. (1999) Developmental expression of *Manduca sexta* hemolin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42:198-212.
- Yu, X. Q. & Kanost, M. R. (2000) Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to gram-negative bacteria. *Journal of Biological Chemistry* 275:37373-37381.
- Yu, X. Q. & Kanost, M. R. (2002) Binding of hemolin to bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. An immunoglobulin superfamily member from insects as a pattern-recognition receptor. *European Journal of Biochemistry* 269:1827-1834.
- Yu, X. Q. & Kanost, M. R. (2003) *Manduca sexta* lipopolysaccharide-specific immulectin-2 protects larvae from bacterial infection. *Developmental & Comparative Immunology* 27:189-196.
- Yu, X. Q., Gan, H. & Kanost, M. R. (1999) Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29:585-597.
- Yu, X. Q., Zhu, Y. F., Ma, C., Fabrick, J. A. & Kanost, M. R. (2002) Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32:1287-1293.
- Zalensky, A. O., Allen, M. J., Kobayashi, A., Brinkley, B. R. & Bradbury, E. M. (1995) Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* 103:577-590.
- Zhang, D., Dahlman, D. L. & Schepers, E. J. (1998) *Microplitis croceipes* teratocytes: in vitro culture and biological activity of teratocyte secreted protein. *Journal of Insect Physiology* 44:767-777.
- Zhang, G., Lu, Z. Q., Jiang, H. & Asgari, S. (2004) Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:477-483.
- Zhang, G., Schmidt, O. & Asgari, S. (2004) A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *Journal of Biological Chemistry* 279:41580-41585.
- Zhao, L. & Kanost, M. R. (1996) In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. *Journal of Insect Physiology* 42:73-79.
- Zhu, Y., Johnson, T. J., Myers, A. A. & Kanost, M. R. (2003) Identification by subtractive suppression hybridization of bacteria-induced genes expressed in *Manduca sexta* fat body. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33:541-559.

ANNEXES

ANNEXE 1

LE MONDE | 08.10.04 |

BIOLOGIE

Pour assurer sa descendance, une guêpe s'associe à un parasite viral

Des chercheurs français ont séquencé le génome d'un virus très ancien impliqué dans la ponte d'un insecte.

Une guêpe qui porte en son sein un virus et le transmet de génération en génération depuis environ 73 millions d'années, voilà qui est déjà fascinant pour les biologistes. Lorsque l'association, loin d'être fatale pour la guêpe, assure au contraire la survie de l'espèce, cette curiosité de la nature devient un objet d'étude intensif.

Une étape marquante vient d'être franchie avec le séquençage du génome de l'un de ces virus symbiotiques, celui de la guêpe *Cotesia congregata*, par l'équipe de génétique de l'Institut de recherche sur la biologie de l'insecte (IRBI) - université de Tours-CNRS en collaboration avec le Génoscope d'Evry. Ces travaux, publiés vendredi 8 octobre dans la revue *Science*, montrent que le génome de ce virus... n'a pas grand-chose à voir avec un génome viral.

La guêpe *Cotesia congregata* doit, pour se perpétuer, pondre ses œufs dans la chenille du sphinx du tabac (*Manduca sexta*). La chenille sert alors de garde-manger aux larves de la guêpe et en meurt lorsque celles-ci, ayant atteint un stade de maturité suffisant, s'expulsent du corps exsangue de leur hôte et continuent leur transformation à l'extérieur, se métamorphosant en pupes puis en adultes volants.

MARIAGE À TROIS

Plus de la moitié des hyménoptères se perpétuent ainsi. Bien entendu, l'insecte hôte ne se laisse pas faire. Son principal mécanisme de défense consiste à entourer l'œuf du parasite d'une sorte de capsule de cellules qui libèrent des substances toxiques pour détruire le corps étranger. Depuis l'adoption d'un mode de vie parasitaire par les hyménoptères au jurassique, l'espèce hôte a constamment évolué, car les gènes lui permettant d'échapper au parasitisme ont été favorisés. En réponse, de nouveaux moyens d'éviter les défenses immunitaires de la chenille ont, à leur tour, été sélectionnés chez l'hyménoptère.

Les deux organismes ont ainsi évolué en parallèle de manière que le parasite trouve toujours de quoi manger. Que vient faire le virus dans

cette course épuisante ? Il est tout simplement indispensable. C'est lui qui permet à la guêpe de manipuler la physiologie de la chenille pour que ses larves puissent se développer.

Des particules virales ayant la forme de baguettes cylindriques incluses dans une matrice protéique sont en effet introduites en même temps que les œufs du parasite lors de la ponte dans le corps de la chenille. Là, les gènes du virus s'expriment, c'est-à-dire que les protéines virales sont synthétisées et qu'elles vont servir de véritables armes biologiques entraînant des modifications dans la physiologie de l'hôte.

Ces modifications induites peuvent différer selon les systèmes biologiques, mais elles sont toujours avantageuses pour le parasite. Elles se divisent en deux catégories : l'inactivation des mécanismes de défense de l'hôte et la perturbation de son développement. Généralement, la chenille parasitée n'effectue pas sa métamorphose et reste bloquée dans un stade prépupal, ce qui permet au parasite d'achever son propre développement. Il s'agit donc d'un mariage à trois où la chenille paie le prix fort. Comme le souligne Catherine Dupuy, enseignante-chercheuse à Tours et membre de l'équipe, *"il n'y a pas, dans l'évolution, d'autre exemple d'utilisation par un organisme d'un troisième partenaire viral pour supprimer les défenses d'un autre organisme"*.

CONTOURNER LES DÉFENSES

Pour comprendre le rôle de ces virus, plus précisément des polydnavirus, dans la réussite parasitaire des guêpes, il est important de connaître, non seulement les protéines qu'ils expriment dans l'hôte, mais aussi la manière dont leur production est contrôlée par la guêpe ainsi que leur véritable nature.

C'est à cela que s'emploie l'équipe de génétique de l'IRBI. Un des enjeux, à terme, serait de réussir à mettre au point de nouvelles méthodes de contrôle d'insectes nuisibles grâce à une meilleure connaissance des bases moléculaires de ces mécanismes de contournement des défenses de l'hôte. Les résultats publiés cette semaine permettent de lever en grande partie le voile sur les zones d'ombre qui persistaient concernant l'organisation du génome viral, son origine évolutive et ses particularités.

Première surprise, et de taille : la séquence complète de l'ADN - environ 568 paires de bases - de la particule virale introduite dans la chenille révèle une organisation complexe qui ressemble plus à une région génomique d'eucaryote qu'à celle d'un virus ! Les eucaryotes sont des organismes ayant des cellules avec noyau qui comprennent aussi bien les guêpes que les hommes. Mais pas les virus.

Contrairement à celui d'autres virus connus, l'ADN du polydnavirus est très dense en gènes ; il comprend au total 156 régions codantes, dont 42 % n'ont pas d'homologie avec des gènes déjà décrits. De plus, ce génome ne contient aucun ensemble de gènes que l'on puisse relier à une famille virale connue ni de gène similaire à un gène capital de virus.

Autre caractéristique singulière, l'abondance des familles de gènes : 66 gènes sont organisés en 9 familles. Autre fait intéressant, les protéines produites à partir de 4 de ces familles de gènes contiennent des domaines précédemment décrits dans des toxines utilisées par des bactéries pathogènes (*Pseudomonas*, *Yersinia*, *Salmonella*...) ou des vers parasites, autrement dit par des bactéries et des eucaryotes.

Les chercheurs avancent l'hypothèse que ces gènes de virulence pourraient avoir été sortis du génome de la guêpe au cours de l'évolution des lignées. Ces polydnavirus ne descendraient donc pas d'un grand génome de virus : ils auraient été construits à partir du génome de la guêpe, grâce à un système de production d'ADN circulaire - car le génome présent dans les particules produites dans l'ovaire de la guêpe est constitué de 30 cercles d'ADN.

En revanche, les protéines de chacune des baguettes, ou capsides, contenant ce génome seraient d'origine virale, probablement acquises au cours d'une infection. Les gènes impliqués dans la réplication de ce virus originel n'ont probablement pas été transférés dans le génome de la guêpe. "La nature, estime Jean-Michel Drezen, chargé de recherche au CNRS, a ici développé une technique de transfert de gènes qui fait songer aux approches médicales actuellement entreprises pour fabriquer des pseudovirus utilisés pour véhiculer des gènes à visée thérapeutique et leur permettre de s'exprimer."

Catherine Tastemain

Vers de nouveaux insecticides naturels

L'étude des bases moléculaires des interactions hôte-parasite chez l'insecte pourrait conduire à l'identification de nouveaux insecticides naturels et à la mise au point de produits sans danger pour l'environnement. Mais aussi à celle de technologies innovantes pour le contrôle des insectes. Les molécules produites par des parasites et (ou) des virus associés, et toxiques pour l'hôte, devraient se révéler plus sélectives du fait de la spécificité considérable des mécanismes de régulation de l'hôte par le parasite. Pour l'heure, une application a déjà fait l'objet d'essais : un gène homologue de celui produit par le polydnavirus associé à l'hyménoptère *Campoletis sonorensis* a été

génétiqnement introduit dans des plants de tabac. Une réduction considérable de la croissance et du développement des larves du sphinx du tabac nourries de ces plantes transgéniques a été ensuite observée.

• ARTICLE PARU DANS L'EDITION DU 09.10.04

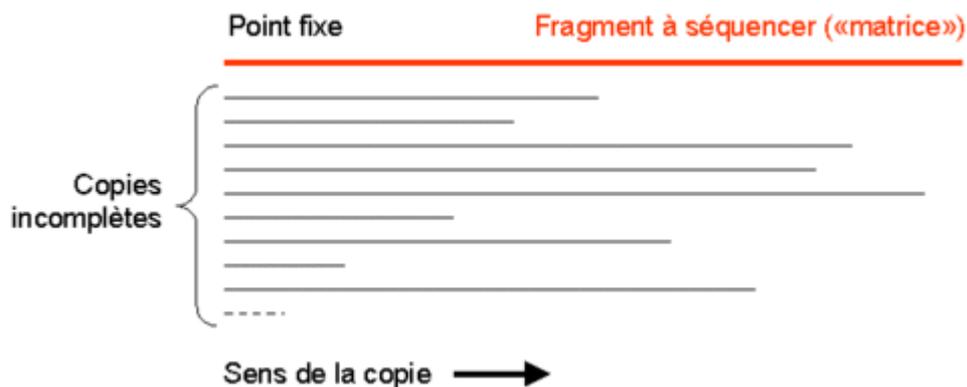
ANNEXE 2

Source : <http://www.genoscope.cns.fr/externe/Francais/Questions/FAQ.html#02>

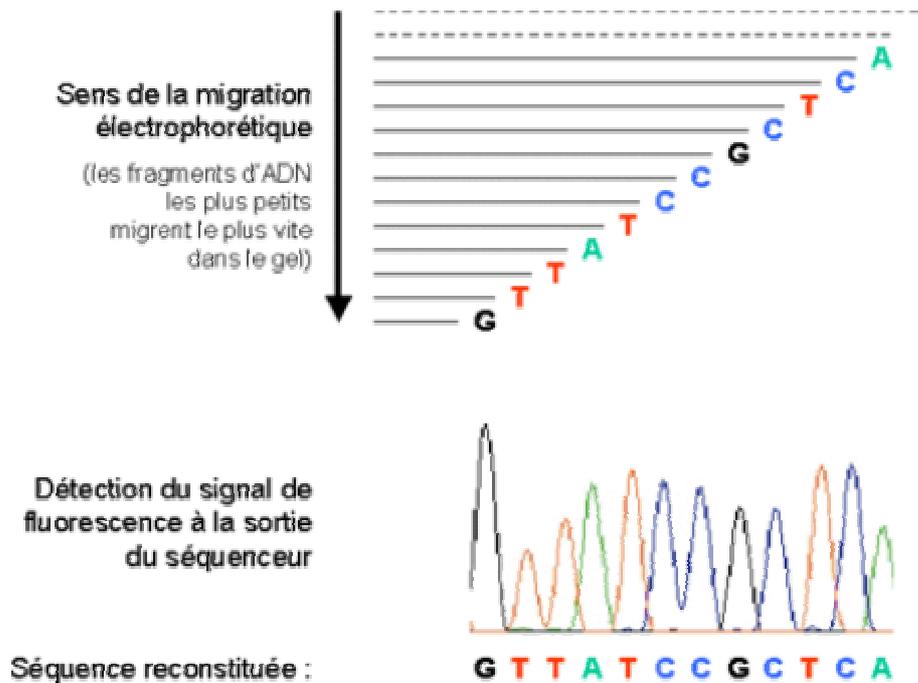
Pourquoi séquence-t-on l'ADN ?

Les nucléotides, constituants élémentaires de l'ADN, peuvent être de 4 types distincts selon qu'ils incluent la base A, T, G ou C. Dans un fragment d'ADN à séquencer, des centaines de nucléotides s'enchaînent dans un ordre défini. Séquencer le fragment d'ADN consiste à déterminer cet ordre, ou séquence, un long mot écrit dans un alphabet à quatre lettres seulement.

Le principe du séquençage est de réaliser, à partir d'un point fixe, des copies incomplètes de la molécule d'ADN (la "matrice"), interrompues au hasard. L'interruption est provoquée par l'incorporation aléatoire, lors de la copie, d'un analogue de nucléotide qui bloque la réaction. Comme l'on travaille sur un très grand nombre de molécules de matrice, on obtient toutes les copies partielles possibles à partir du point fixe.



On sépare ensuite ces divers fragments selon leur taille en les faisant migrer dans un gel poreux sous l'action d'un champ électrique. Cette technique, nommée électrophorèse, permet de séparer deux copies incomplètes consécutives qui ont une différence de taille d'un seul nucléotide. Si l'on peut identifier le nucléotide au niveau duquel la copie s'est interrompue (nucléotide terminal) pour chacune des copies incomplètes, de la plus petite à la plus grande, on est alors en mesure de reconstituer la succession des nucléotides tout au long de la copie.

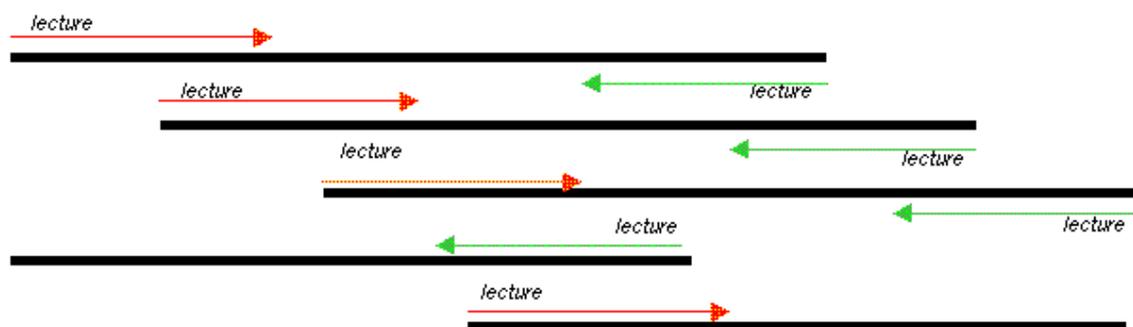


Mais comment identifie-t-on, en pratique, les nucléotides terminaux ? On réalise quatre séries de copies en parallèle, chacune incluant un analogue d'un des 4 types de nucléotides A, T, G ou C. Par exemple, toutes les copies incomplètes d'une série seront terminées par un A. En outre, le composé provoquant l'interruption est fluorescent : le fragment copié peut ainsi être détecté automatiquement par un système optique à la fin de sa migration dans l'appareil d'électrophorèse, nommé séquenceur. Le signal obtenu à mesure que les copies incomplètes achèvent leur migration est interprété par un programme informatique qui reconstitue la séquence originale du fragment d'ADN analysé. Par opération unitaire, ou lecture, un séquenceur automatique peut déterminer la succession de 500 à 1000 bases (une séquence "brute" également appelée lecture).

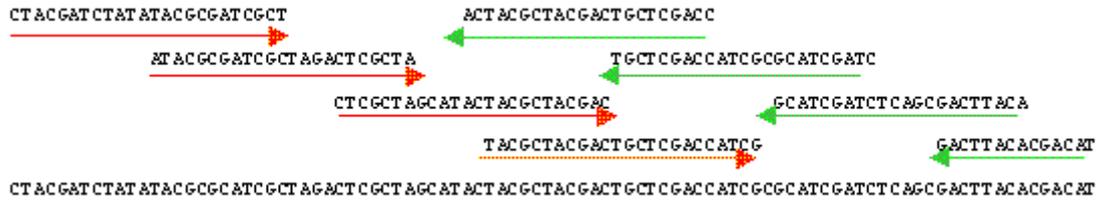
Qu'est-ce que l'assemblage ?

Chaque manipulation de séquençage, ou lecture, ne livre à l'heure actuelle qu'une séquence de 500 à 1000 bases. Il est donc impossible de lire "d'une traite" la séquence des immenses molécules d'ADN, nommées chromosomes, qui renferment l'information héréditaire d'un organisme. Les chromosomes humains, par exemple, sont longs de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de millions de nucléotides. Pour reconstituer ces séquences gigantesques, il faut réaliser un grand nombre de lectures, et même produire un volume de séquence plusieurs fois supérieur à la taille du chromosome : ces lectures redondantes permettent de raccorder les séquences les unes aux autres et de s'assurer de la qualité du résultat de chaque lecture.

En pratique, on commence par casser de façon aléatoire la grande molécule d'ADN à séquencer afin d'obtenir des sous-fragments de quelques milliers de nucléotides. En procédant à la lecture des extrémités d'un grand nombre de ces sous-fragments pris au hasard, on obtient des séquences qui se recouvrent en partie.

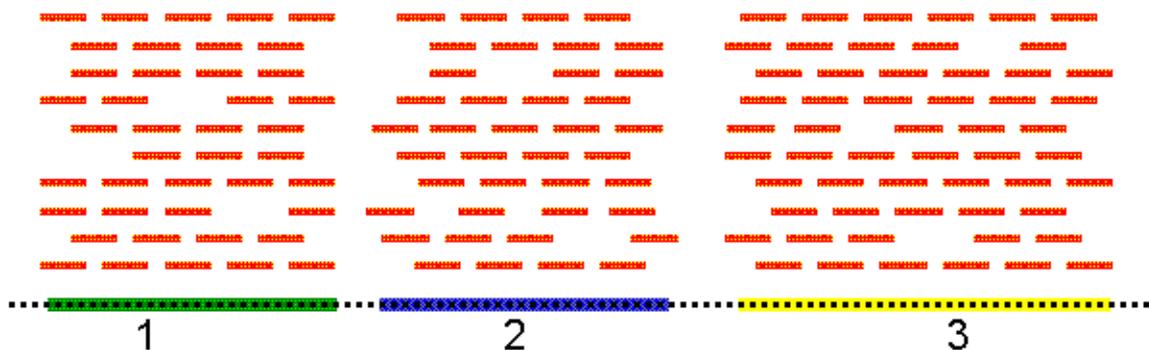


La comparaison de ces séquences entre elles permet de reconnaître et d'aligner les parties séquencées plusieurs fois. Grâce à ces séquences chevauchantes, on peut assembler un certain nombre de lectures pour reconstituer des enchaînements plus grands (nommés contigs), voire la totalité de la séquence du fragment de départ. Cette opération d'assemblage, réalisée par des programmes informatiques, permet de reconstituer de proche en proche des séquences de plusieurs millions à plusieurs dizaines de millions de bases.



Dans des génomes tels que le génome humain, il est nécessaire d'opérer avec une redondance d'un facteur 8 à 10 ("profondeur de 8 à 10X") pour réassembler la séquence d'un fragment d'ADN de grande taille. En d'autres termes, pour séquencer un tel fragment, il faut le réduire en petits segments, puis réaliser un nombre de lectures suffisant pour que ces lectures, mises bout à bout, représentent 10 fois la longueur de la séquence du grand fragment. Cela revient à ce que chaque base de cette séquence soit représentée dans 10 lectures en moyenne. Même à ce niveau de redondance, il subsistera quelques trous lors de l'assemblage, car les lectures résultent d'un échantillonnage aléatoire : certaines régions seront représentées par plus de 10 lectures, d'autres par moins de 10, et quelques unes ne seront pas du tout couvertes. Le nombre et la taille des trous seront d'autant plus importants que le niveau de redondance des lectures est faible. Ces trous peuvent ensuite être "comblés" par un travail ciblé.

Une autre difficulté dans l'assemblage des séquences de "grands" génomes est causée par les séquences répétées, présentes plus ou moins à l'identique en plusieurs endroits du génome. Elles sont particulièrement abondantes dans les génomes de mammifères et représentent 50% du génome humain. Ces séquences répétées peuvent conduire à assembler ensemble deux séquences provenant en réalité de régions distantes du génome. Pour cette raison, elles sont "masquées" lors de l'assemblage.



La séquence du génome humain, avec ses 24 types de chromosomes, comporte environ 3 milliards de bases. Pour déterminer la séquence complète des chromosomes humains à une profondeur de 10X, il faut réaliser des dizaines de millions de lectures. Il est cependant possible d'obtenir une première ébauche avec un niveau de redondance moindre. Dans ce cas, les fragments réassemblés seront assez petits. Par exemple, avec un niveau de redondance de 5X, on obtient pour le génome humain des contigs d'environ 5000 bases. La séquence du génome ainsi obtenue sera donc éclatée en plusieurs centaines de milliers de morceaux.

ANNEXE 3

Composition des solutions et tampons utilisés

Sauf quand cela est précisé, toutes les solutions sont à autoclaver (ou filtrer) avant utilisation.

Solution d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2)

Acétate de sodium, 3H₂O (MM = 136,08 g/mol) 408,1 g
Ajuster le pH à 5,2 avec une solution d'acide acétique glacial.
H₂O UP qsp 1 L

Solution de chlorure de sodium 1 M

NaCl (MM = 58,44 g/mol) 58,44 g
H₂O UP qsp 1 L

Solution de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

EDTA(Na₂), 2H₂O (MM = 372,2 g/mol) 186,1 g
Ajuster le pH à 8,0 avec une solution de NaOH 10 N.
H₂O UP qsp 1 L

Solution d'HCl 0,25 N

HCl 37 % 4,31 mL
H₂O UP qsp 200 mL

Solution de NaOH 0,4 N

NaOH 10 N 60 mL
H₂O UP qsp 1,5 L

Solution de Tris 1M (pH 7,0)

Tris base (MM = 121,1 g/mol) 121,1 g
Ajuster le pH à 7,0 avec une solution de l'HCl.
H₂O UP qsp 1 L

Solution de Tris 0,5 M (pH 7,0)

Tris base 1 M (pH 7) 100 ml
Ajuster le pH à 7,0 avec une solution de l'HCl.
H₂O UP qsp 200 mL

Tampon de charge Blue/Orange (Promega)

Orange G 0,4 % (p/v)
Bleu de bromophénol 0,03 % (p/v)
Xylène cyanol 0,03 % (p/v)
Ficoll® 400 15 % (p/v)
Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM
EDTA (pH 8,0) 50 mM

Tampon NaPO₄ 1 M (pH 7,2)

Na₂HPO₄ anhydre (MM = 141,96 g/mol) 97,1 g
NaH₂PO₄ anhydre (MM = 119,98 g/mol) 37,91 g
H₂O UP qsp 1 L

Tampon CHURCH

Tampon NaPO₄ 1 M pH 7,2 250 mL 0,5 M
SDS 20 % 175 mL 7 %
EDTA 0,5 M (pH 8,0) 1 mL 0,001 M
H₂O UP qsp 500 mL

Tampon RINGER

KCl (MM = 74,5 g/mol)	13,6 g	182 mM
NaCl (MM = 58,5 g/mol)	2,7 g	46 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O (MM = 147 g/mol)	0,44 g	3 mM
Tris-HCl (MM = 121,1 g/mol)	1,21g	10 mM
Ajuster le pH à 7,2 avec une solution d'HCl.		
H ₂ O UP	qsp 1 L	

Tampon Tris-acétate (TAE) x1

Tris base (MM = 121,1 g/mol)	48,5 g	0,04 M
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	2 mL	0,001 M
Ajuster le pH à 8,0 avec une solution d'acide acétique glacial.		
H ₂ O UP	qsp 1 L	

Tampon SSC x20

NaCl (MM = 58,44 g/mol)	174 g
Citrate de sodium (MM = 258,1 g/mol)	88,2 g
Ajuster le pH à 7,0 avec quelques gouttes de NaOH 10 N.	
H ₂ O UP	qsp 1 L
Conserver à température ambiante.	

Tampon de lavage SSC x0,2, 0,1 % SDS

SSC x20	10 mL
SDS 20 % (ICN)	5 mL
H ₂ O UP	qsp 1 L
Ne pas autoclaver.	

Tampon de lavage SSC x2, 0,1% SDS

SSC x20	100 mL
SDS 20 % (ICN)	5 mL
H ₂ O UP	qsp 1 L
Ne pas autoclaver.	

ANNEXE 4

PROTOCOLES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

Protocole d'extraction de l'ADN viral

(1) Libération de l'ADN viral

Prélever le surplus de TAE x1 (conserver moins de 400 μ L de tampon) puis placer dans la glace
 Dilacérer les ovaires à l'aide d'une aiguille stérile 18G, puis 23G (5 à 10 min pour chaque aiguille)
 ↓
 Centrifuger 3 min à 3000 r/min à 4°C
 ↓
 Couper les bouchons de 2 tubes-filtre 0,45 μ m (Spin X, Costar) et préhumidifier leur tamis avec 20 μ L de TAE x1
 Prélever le surnageant contenant les particules virales puis déposer celui-ci sur les 2 (ou 4) filtres (80 μ L de solution par le filtre maximum)
 ↓
 Centrifuger 15 min à 15000 r/min à 4°C
 Suspender les culots viraux puis transférer le tout dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 mL
 Ajouter 5 μ L de protéinase K (20 μ g/ μ L, Promega) pour 500 μ L de particules virales
 Bien mélanger
 ↓
 Incuber 30 à 60 min à 55°C
 Ajouter ensuite 25 μ L de sarcosyl 20 %
 Mélanger
 Puis 1 h après l'ajout du sarcosyl, ajouter 5 μ L de protéinase K
 ↓
 Incuber 2 à 3 h (ou toute une nuit) à 55°C.

(2) Extraction phénol/chloroforme

Ajouter à la solution de particules virales un volume identique de solution de phénol:chloroforme:AIA (25:24:1)
 Bien agiter pendant 10 min (vortex à faible vitesse)
 ↓
 Centrifuger 10 min à 14000 r/min à température ambiante
 Prélever dans un nouveau tube la phase supérieure contenant l'ADN en laissant 100 μ L
 RINCER CE QUI RESTE (LA PHASE PHENOLIQUE) AVEC DU TAE X1
 Homogénéiser quelques min
 ↓
 Recentrifuger 10 min à 14000 r/min à température ambiante
 Prélever la phase supérieure et la mettre dans le même tube que précédemment
 ↓
 Ajouter 1/25 vol de NaCl 5 M et mélanger
 Ajouter 2 vol d'éthanol absolu glacial et mélanger
 Précipiter à -20°C pendant au moins 2 h
 ↓
 Centrifuger 15 min à 15000 r/min à température ambiante puis éliminer le surnageant (ne pas décoller le culot)
 Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70 %
 ↓
 Centrifuger 10 min à 15000 r/min à température ambiante
 Eliminer le surnageant

Recentrifuger 30 s à 15000 r/min pour faire redescendre le surnageant restant sur les parois du tube



Laisser sécher 10 min sur la paillasse tube ouvert
 Reprendre dans 20 µL d'H₂O UP
 Laisser les acides nucléiques se resuspendre toute une nuit à 4°C.

(3) Traitement à la RNase

Ajouter 2 µL de RNase (DNase free, Promega) et bien mélanger
 Incuber 30 min ou toute la nuit à 37°C
 Conserver à -20°C.

Protocole d'extraction des ARN totaux

(1) Extraction des ARN

Broyer à l'Ultraturrax (vitesse de 1 à 6 pendant 2 min environ)
 Incuber 5 min à température ambiante
 ↓
 Centrifuger 10 min à 12000 g à 4°C
 Récupérer le surnageant
 Ajouter 200 µL de chloroforme
 Vortexer vigoureusement pendant 15 s
 Incuber 5 min à température ambiante
 ↓
 Centrifuger 15 min à 12000 g à 4°C
 Récupérer la phase aqueuse (supérieure)
 ↓
 Ajouter 200 µL de chloroforme
 Vortexer vigoureusement pendant 15 s
 ↓
 Centrifuger 10 min à 12000 g à 4°C
 Récupérer la phase aqueuse (supérieure)
 Ajouter 1 vol d'isopropanol et 0,1 vol de NaAc 3 M (pH 5,2)
 Mélanger puis incuber à -20°C pendant 1 h (minimum)
 ↓
 Centrifuger 10 min à 12000 g à 4°C
 Eliminer le surnageant
 ↓
 Laver avec 1 mL d'éthanol 75 %
 Vortexer puis centrifuger 5 min à 7500 g à 4°C
 Eliminer le surnageant
 Sécher le culot puis le reprendre par 100 µL d'eau stérile
 Pipeter pour remettre en solution et si besoin incuber 10 min à 55-60°C

(2) Traitement à la DNase

Aux 100 µL d'acides nucléiques
 Ajouter 13 µL de tampon (x10 fourni avec la DNase)
 15 µL de DNase (RNase free, 1 u/µL, Promega)
 2 µL d'eau stérile (volume réactionnel de 130 µL)
 ↓
 Incuber 30 à 60 min à 37°C
 Ajouter 1 vol de mélange phénol:chloroforme:AIA (25:24:1)
 Vortexer
 ↓

Centrifuger 5 min à 5000 g à 4°C
Récupérer la phase aqueuse (supérieure)
Ajouter 1 vol de chloroforme:alcool isoamylique (24:1)
↓
Centrifuger 5 min à 5000 g à 4°C
Récupérer la phase aqueuse (supérieure)
Ajouter 1 vol d'isopropanol et 0,1 vol de NaAc 3 M (pH 5,2)
Mélanger
↓
Centrifuger 10 min à 7000 g à 4°C
Éliminer le surnageant
↓
Laver avec 1 mL d'éthanol 75 %
Vortexer
↓
Centrifuger 5 min à 7500 g à 4°C
Éliminer le surnageant
↓
Sécher le culot puis le reprendre par 20 µL d'eau stérile
Stocker à -80°C

ABSTRACT

GENOME AND VIRULENCE FACTORS OF A POLYDNAVIRUS OF PARASITOID HYMENOPTERA

The hymenoptera *Cotesia congregata* (Microgastrinae ; Braconidae) lays its eggs inside its host, a caterpillar of the lepidoptera *Manduca sexta* (Noctuidae ; Sphingidae) and introduces bracovirus (CcBV) particles, containing 30 double-stranded DNA circles. The viral genes carried by these circles encode for a range of proteins expressed in the tissues of the parasitized caterpillar. These viral proteins play an essential role for successful parasitism. Viral gene expression leads to host physiology modifications such as alteration of immunity allowing the parasitoid larvae to develop. Additionally, the parasitized host undergoes a prewandering developmental arrest.

The characterization of bracovirus genome has advanced and allowed the discovery of many gene families. This thesis summarizes up-to-date knowledge about insect immunity and bracoviral genes potentially involved in host physiology control.

During my thesis, sequencing and genome analyses demonstrated that the CcBV genome is composed of 30 double-stranded DNA circles coding for 9 multigenic families (Espagne *et al* 2004) comprising the protein tyrosine phosphatase (PTP) family (27 genes) (Provost *et al* 2004), the cystatin family (3 genes) (Espagne *et al* soumis) and the ankyrin motif encoding genes (6 genes) (Pennacchio *et al* en préparation). The detailed characterisation of the viral PTP gene family was performed. Field inversion gel electrophoresis (FIGE) allowed to physically localize PTP genes on the viral genome. Their expression was analysed on different host tissues by a multiplex RT PCR approach. Biochemical activity tests of 2 PTPs were performed by *in vitro* production using the baculovirus expression system.

Globally, genes of the described families are expressed in the parasitized host and some proteins have the biochemical function predicted by their conserved domains, suggesting these proteins play a role in the host physiological modifications induced by parasitism.

The characterization of viral genes expressed in the host is a key step toward further identification of the role of each protein in host physiology alteration.

Key-words : bracovirus, *Cotesia congregata*, *Manduca sexta*, genome, protein tyrosine phosphatase, cystatin, ankyrin.

RESUME

GENOME ET FACTEURS DE VIRULENCE DU POLYDNAVIRUS D'UN HYMENOPTERE PARASITOÏDE

L'hyménoptère *Cotesia congregata* (Microgastrinae ; Braconidae) pond ses oeufs à l'intérieur de son hôte, la chenille du lépidoptère *Manduca sexta* (Noctuidae ; Sphingidae) et introduit des particules virales de bracovirus contenant 30 cercles d'ADN double brin. Les gènes viraux portés par ces cercles codent pour une série de protéines qui sont produites dans les tissus de la chenille parasitée. Ces protéines virales jouent un rôle indispensable à la réussite parasitaire. En effet, l'expression des gènes viraux entraîne de nombreuses altérations de la physiologie de l'hôte, notamment un contournement de l'immunité de la chenille qui permet le développement des larves du parasite. D'autre part, le développement de l'hôte est bloqué à un stade pré-pupal. Les travaux portant sur la caractérisation des génomes de bracovirus ont beaucoup progressé et plusieurs familles de gènes ont été découvertes. Une synthèse des connaissances actuelles sur l'immunité des insectes et les gènes de bracovirus potentiellement impliqués dans le contrôle de l'immunité et du développement des lépidoptères est présentée en introduction.

Au cours de ma thèse, le séquençage et l'analyse du génome du bracovirus de *Cotesia congregata* ont été réalisés (Espagne *et al* 2004). L'existence de plusieurs familles multigéniques a été mise en évidence, notamment la famille des protéines tyrosines phosphatases (PTP) composée de 27 gènes (Provost *et al* 2004), la famille des cystatines composée de 3 gènes (Espagne *et al* soumis) et enfin celle des protéines à motif ankyrine composée de 6 gènes (Pennacchio *et al* en préparation). La caractérisation détaillée de la famille des PTP a été effectuée. La technique d'électrophorèse en champs inversés (FIGE) a permis la localisation physique de ces gènes sur l'ensemble du génome viral, et leur expression a été analysée dans une série de tissus de l'hôte parasité grâce à une méthode de PCR multiplex. Enfin, des tests d'activité biochimique de PTP de bracovirus produites *in vitro* grâce à un système d'expression en baculovirus.

Les gènes des familles décrites sont exprimés dans l'hôte parasité et les protéines possèdent, en général, la fonction biochimique prédite grâce aux domaines conservés qu'elles contiennent. Ceci suggère que ces protéines virales jouent un rôle actif dans les modifications de la physiologie de l'hôte induite par le parasitisme. La caractérisation des gènes viraux exprimés dans l'hôte est une étape indispensable vers l'identification du rôle individuel de chaque protéine dans le contrôle de la physiologie des chenilles parasitées.

Mots-clés : bracovirus, *Cotesia congregata*, *Manduca sexta*, génome, protéine tyrosine phosphatase, cystatine, ankyrine.

