



HAL
open science

Caractérisation du rôle de l'acrostyle, un organe localisé à la pointe des stylets de puceron, dans la transmission des virus et dans les interactions plante-insecte

Maëlle Deshoux

► To cite this version:

Maëlle Deshoux. Caractérisation du rôle de l'acrostyle, un organe localisé à la pointe des stylets de puceron, dans la transmission des virus et dans les interactions plante-insecte. Interactions entre organismes. Montpellier SupAgro, 2019. Français. NNT : 2019NSAM0028 . tel-04106657

HAL Id: tel-04106657

<https://theses.hal.science/tel-04106657>

Submitted on 25 May 2023

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En mécanismes des interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche BGPI – Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite

Caractérisation du rôle de l'acrostyle, un organe localisé à la pointe des stylets de puceron, dans la transmission des virus et dans les interactions plante-insecte

Présentée par Maëlle Deshoux

Le 22 Novembre 2019

Sous la direction de Marilyne Uzest et Stéphane Blanc

Devant le jury composé de

M. Bruno FAVERY, Directeur de recherche, Inra PACA - Centre Provence-Alpes-Côte d'Azur

Mme Véronique BRAULT, Directrice de recherche, Inra Grand-Est Colmar

Mme Federica CALEVRO, Maître de conférences, INSA Lyon

Mme Eugénie HÉBRARD, Chargée de recherche, IRD Montpellier

M. Philippe REYMOND, Professeur, Université de Lausanne

M. Stéphane BLANC, Directeur de recherche, Inra Montpellier

Mme Marilyne UZEST, Chargée de recherche, Inra Montpellier

Rapporteur, président du jury

Rapporteuse

Examinatrice

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



Remerciements

Je tiens à remercier **Véronique Brault**, **Federica Calevro**, **Eugénie Hébrard**, **Bruno Favery** et **Philippe Reymond** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps consacré à évaluer ce travail. Je souhaite également remercier **Stéphane Blanc** ainsi que les membres de mon comité de thèse, **Christine Cousteau**, **Mylène Ogliastro** et **Thomas Kroj** qui m'ont aiguillé dans les choix liés à ce projet. Je remercie enfin **Claire Neema** pour son accueil au sein de l'UMR BGPI et pour son soutien envers tous les doctorants de l'unité.

Je remercie infiniment tous nos collaborateurs sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci aux équipes de **Philippe Bulet** de la plateforme BioPark à Archamps, de **Patrick Bron** du CBS de Montpellier, et enfin de **Laurent David** de l'université Lyon 1 pour ces belles données générées ensemble. Agradezco a **Alberto Ferreres**, **Jaime Jimenez** y **Arantxa Moreno** por haberme recibido en su laboratorio y enseñarme los secretos de la técnica EPG. Merci aussi à **Gaël Le Trionnaire** pour toutes ses paroles positives, à **Sylvie** et **Sylvie**, ainsi qu'à toute l'équipe qui ont rendu mon séjour à Rennes très instructif et très agréable ! Je souhaite également remercier **Yvan Rahbé**, qui est pour moi l'exemple du chercheur passionné et passionnant, ainsi que **Natalia** pour tous nos échanges.

Je suis convaincue que la réussite d'une thèse repose en grande partie sur le duo encadrant/doctorant. **Marilyne**, je pense qu'on peut maintenant affirmer que le nôtre a plutôt bien fonctionné. Merci pour ton exigence, qui m'a forcé à me dépasser, merci pour ton extrême bienveillance, qui m'a permis d'y arriver. Merci de m'avoir si bien accompagné depuis le premier jour où tu m'as décrit l'acrostyle d'un puceron. Pour le moment j'ai surtout envie de vacances, mais je sais que très vite, nos aventures puceronniques vont beaucoup me manquer. Merci pour tout, et du fond du cœur.

Un immense merci à toute la MuzTeam ! Ma chère **Elo**, ou la reine du *silencing*. Merci pour ton travail exemplaire, tu m'as fait gagner un temps précieux ! Merci aussi pour ton amitié. Sache que je n'oublierai jamais toutes nos aventures à Madrid, des churros au parc d'attraction en passant par les moules à madeleines. **Bastien**, quel plaisir de travailler avec quelqu'un comme toi, tu sais tout sur tout ! Merci pour ton aide au labo mais aussi pour ta gentillesse constante ! J'espère qu'un jour j'arriverai à marcher aussi vite que toi dans les couloirs. **Baptiste**, tu auras été mon mentor durant la première année de ma thèse. Tu m'as énormément transmis et je te promets que j'ai toujours essayé de continuer à appliquer tes conseils. J'ai conscience que je te

dois beaucoup ! **Marie**, j'ai eu tellement de chance de t'avoir à la fin de ma thèse. Merci pour toutes nos discussions et merci d'avoir aussi bien pris en charge une partie de mes manips. Je n'ai jamais vu quelqu'un travailler aussi soigneusement que toi. Pour finir, merci à **Alex**, qui s'est embêté à disséquer des stylets à n'en plus finir, et à **Caro** pour sa formation BiFC et toutes ses combines en bio mol. Sans oublier **Craig** pour sa sympathie et tous ses conseils.

Merci à tous les membres de **l'équipe 2** en commençant par **Jean-Louis, Martine** et **Elodie**, les copains de la paillasse qui ont rendu mon travail au labo très agréable! Merci aussi à **Sophie** et **Jean-Luc** pour leur aide dans les espaces communs et avec les pucerons. Merci, enfin, à **Manuella, Cica, Marie-Steph, Michel** et **Michel**, pour leur gentillesse, et surtout à **Daniel**, qui m'a beaucoup manqué à la fin de ma thèse. Je n'oublie pas non plus les « anciens » avec qui j'ai fait un petit bout de chemin : **Romain, Béa, Mahsa, Mathilde...** C'était un vrai plaisir de tous vous côtoyer.

Merci à tous les membres de **l'UMR BGPI** avec qui j'aurais eu de chouettes discussions. Je souhaite remercier en particulier **Nicolas**, pour ses nombreux enseignements sur les insectes et sa grande sympathie, **Gaël** pour son aide en stat. et ses retours toujours constructifs après chaque séminaire, **Misha** pour les clubs virologie, **Katia** pour tout son travail à la laverie, et enfin **Michel A.**, pour les démarches administratives mais aussi pour sa bonne humeur et tous ses traquenards en course à pied. J'ai également une pensée pour le duo **Philippe** et **Pauline**, car c'est eux qui m'ont donné envie de faire une thèse !

Et bien sûr, à tous mes copains thésards (et les +1 !) : merci d'avoir fait de ma thèse une belle histoire d'amitié. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. **Edwige**, c'est avec toi que j'ai intégré l'équipe 2 il y a quatre ans, et je me demande combien d'heures de conversations enflammées on a eu ensemble dans l'unité (oups, pas très sérieux tout ça !). Merci pour ton écoute et ton grand cœur. **Faust**, ma binôme de choc et de toujours... Tu es indéniablement celle qui m'a le plus encouragé, réconforté ou félicité ! On en aura partagé des choses, toi et moi ! Du fond du cœur, merci. **Maud**, merci d'avoir pris une place de plus en plus grande dans ma thèse. Merci pour toutes tes confessions, nos midi courses à pieds, ces bons moments autour d'une bière ou d'un chocolat chaud. Mille merci de nous avoir fait découvrir ton île, quel souvenir inoubliable! **Emeline**, merci pour ton naturel qui rend toujours facile nos discussions, même les plus personnelles. Sache que c'était toujours un plaisir de découvrir tes hobbies si divers et tes blagues si... surprenantes ? Ne laisse jamais s'échapper ton âme d'enfant que j'admire tant. Merci à toi, **Coco**, je n'oublierai jamais cette merveilleuse complicité

qu'il y aura eu entre nous, que de souvenirs à tes côtés! Tu es une vraie battante qui m'a toujours inspirée et montrée l'exemple, et c'est en partie grâce à toi si j'en suis là. Mon **kéké des plages** (désolé !), on peut dire qu'on n'aura pas été d'accord très souvent toi et moi, et pourtant on n'a jamais cessé de prendre soin l'un de l'autre. Pour ça, un grand merci. Tu as finalement réussi là où j'ai moi-même échoué et pour ça je suis vraiment fière de toi ! Merci à toi **Jérémi**, toujours le sourire aux lèvres. Ta zénitude et ta bonne humeur auront été une aide précieuse dans ce bureau. J'envie tellement ton optimisme et ton organisation exemplaire ! **Thomas**, allez ici je peux te l'avouer : j'aimerais bien qu'on reste potes après la thèse ! Sache que tu nous manqueras, à mes octaves et moi. Mon cher **Raph, Albin** et aussi **Guillaume, Mathias**, et **Florian** pour tous ces bons moments et ces chouettes après-midi ou soirées jeux : mille merci à vous. Merci aussi à **Valentin** the king (j'avoue qu'on ne rencontre pas tous les jours quelqu'un comme toi !), **Pascal, Rémi, Thomas T., Yohann** ou encore les dernières belles rencontres de fin de thèse, **Marie B.** et **Audrey**. Sachez que tous ces moments de rigolade, en pause-déjeuner ou à l'heure de l'apéro, vont énormément me manquer !

Merci à mes amis qui ont toujours été là. **Louise**, je suis obligée de te citer, toi qui me connais par cœur. Ton amitié est l'une des plus belles choses qui me soit arrivée à Montpellier. Peu importe où le vent nous portera, on ne sera jamais trop loin pour une partie de Splendor avec **Lucas**. Et aussi, **Zonzon, Dudu** et **Sophita**, juste pour le plaisir d'afficher vos surnoms devant la communauté scientifique (et aussi, je l'avoue, parce-que vous êtes des amies en or).

Merci, enfin, à ma famille, le soutien le plus important. **Maman, Steven, Loïc, Delphine, Sonia** et bien sûr **Arthur**, un si grand rayon de soleil pour un si petit garçon. Merci aussi à **Jean-Luc** et à **mes beaux-parents**.

Je terminerai par toi, mon **Jérémy** (je vais peut-être éviter de t'appeler par ton surnom). Parce que personne d'autre que toi ne sait à quel point ces années auront été riches en émotions, cette thèse c'est aussi la tienne. On verra bien ce que l'avenir nous réserve, alors en route pour de nouvelles aventures...

Je m'excuse auprès de tous les pucerons que j'ai martyrisés durant ma thèse. Ils sont morts pour la science, mais quand même...

Table des matières

Liste des figures et des tables (hors articles).....	1
Liste des abréviations.....	3
Introduction générale.....	6
1. Le puceron, un ravageur redoutable.....	8
1.1. Taxonomie.....	8
1.2. Anatomie du puceron.....	10
1.3. Cycle de vie.....	10
1.4. Préférence de l'hôte et comportement alimentaire.....	14
1.5. Symbiose bactérienne.....	15
1.6. Impact agronomique et méthodes de lutte.....	16
2. L'acrostyle, un organe à la pointe des stylets de puceron.....	20
2.1. Le faisceau de stylets.....	20
2.2. La découverte d'un nouvel organe : l'acrostyle.....	22
2.3. La composition protéique de l'acrostyle.....	22
2.3.1. Propriétés générales de la cuticule.....	22
2.3.2. Classification et fonctions des protéines cuticulaires.....	24
2.3.3. Les protéines cuticulaires qui composent l'acrostyle.....	25
3. Les interactions entre les pucerons et les virus.....	28
3.1. La vection des virus de plante.....	28
3.2. Les différents modes de transmission.....	28
3.2.1. La transmission circulante.....	29
3.2.2. La transmission non circulante.....	29
3.3. Identification et caractérisation des récepteurs de virus chez les pucerons.....	31
3.3.1. Récepteurs de virus circulants.....	31
3.3.2. Récepteurs de virus non circulants.....	32
3.3.3. <i>Article de revue : Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses.....</i>	<i>34</i>
4. Les interactions entre les pucerons et les plantes.....	36
4.1. Le dialogue moléculaire entre une plante et un bio-agresseur.....	36
4.1.1. La PTI ou <i>PAMP-triggered immunity</i>	36

4.1.2. L'ETS ou <i>Effector-triggered susceptibility</i>	40
4.1.3. L'ETI ou <i>Effector-triggered immunity</i>	40
4.2. Les premiers niveaux de défense contre les pucerons.....	41
4.2.1. L'induction de la PTI par les plantes.....	41
4.2.2. Les voies hormonales.....	42
4.2.3. La recherche d'éliciteurs.....	43
4.3. Rôle de la salive dans le contournement des mécanismes de défenses.....	44
4.3.1. Composition en protéines des deux salives.....	45
4.3.2. Caractérisation fonctionnelle des effecteurs.....	46
4.4. Les gènes de résistance.....	48
5. Objectifs de la thèse.....	49

Chapitre 1.....52

1. Contexte de l'étude.....	52
2. Identification des protéines en surface de l'acrostyle.....	53
2.1. Résumé de l'étude protéomique.....	53
2.2. <u>Article 1</u> : <i>Cuticular structure proteomics in the pea aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i> reveals new plant virus receptor candidates at the tip of maxillary stylets</i>	55
3. Caractérisation des propriétés des stylines.....	58
3.1. Niveaux d'expression des gènes <i>stylins</i>	58
3.2. Détection des stylines dans les mues de puceron.....	60
4. Conclusion.....	61

Chapitre 2.....64

1. Contexte de l'étude.....	64
2. Mise au point de l'approche ARN interférence.....	66
2.1. Présentation de l'ARN interférence.....	66
2.2. Application aux gènes <i>stylins</i>	68
3. Obtention de mutants CRISPR-Cas9 pour le gène <i>stylin-01</i>.....	72
3.1. Présentation du système CRISPR-Cas9.....	72
3.2. Mise au point chez le puceron.....	73
3.2.1. Résumé de l'étude.....	74

3.2.2. Article 2 : An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid.....	75
4. Conclusion.....	76
Chapitre 3.....	78
1. Contexte de l'étude.....	78
2. Détermination du rôle de Stylin-01 et Stylin-02 dans la transmission du CaMV.....	78
2.1. Présentation du <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV).....	78
2.2. Mise en évidence du rôle de Stylin-01 dans la transmission du CaMV par ARN interférence.....	82
2.2.1. Résumé de l'étude.....	82
2.2.2. Article 3 : Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors.....	84
2.3. Capacité des mutants KO Stylin-01 à transmettre le CaMV.....	86
3. Détermination du rôle de Stylin-01 et Stylin-04 dans la transmission du TuMV.....	90
3.1. Présentation du <i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV).....	90
3.2. Capacité des mutants KO Stylin-01 à transmettre le TuMV.....	92
3.3. Mise en évidence du rôle de Stylin-04 dans la transmission du TuMV par ARN interférence.....	93
4. Conclusion.....	95
Chapitre 4.....	98
1. Contexte de l'étude.....	98
2. Détermination du rôle des stylines et de l'acrostyle dans le comportement alimentaire des pucerons.....	99
2.1. Résumé de l'étude.....	99
2.2. Article 4 : <i>Cuticular proteins of aphids stylets take part in effector-plant defense dialogue</i>	100
2.3. Tentatives de validation de l'interaction Stylin-03/Mp10.....	104
3. Etude du comportement de la lignée KO Stylin-01	104
4. Conclusion.....	109

Discussion générale.....112

1. La première analyse protéomique sur stylets de puceron.....112
2. Détermination du rôle de l'acrostyle dans les interactions plante-insecte.....114
3. Détermination du rôle de l'acrostyle dans la transmission des virus de plante.....118
4. Interactions effecteurs/virus.....120
5. Conclusion sur les approches de validation fonctionnelle.....121
6. Conclusion de la thèse.....123

Matériel et méthodes.....126

1. Anticorps.....126
2. Immuno-marquages des mues.....126
3. Recherche d'interactions protéine/protéine.....126
 - 3.1. *Western blot* et *far western blot*.....126
 - 3.2. Co-immunoprécipitation.....127
 - 3.3. *GST pull-down*.....128
 - 3.4. *Peptide array*.....128
 - 3.4. BiFC.....128
4. Tests de transmission du CaMV et du TuMV avec les pucerons *A. pisum* issus des lignées contrôle et KO.....129
5. Tests de transmission du TuMV avec des pucerons *M. persicae* traités avec des siRNA ciblant *stylin-04*.....129

Références bibliographiques.....132

Liste des figures et des tables (hors articles)

Introduction

- Figure 1.** Anatomie du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*
- Figure 2.** Développement du puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum*
- Figure 3.** Cycle de vie de *Myzus persicae*
- Figure 4.** Suivi des différentes phases d'alimentation du puceron par la technique EPG
- Figure 5.** Schémas descriptifs des pièces buccales du puceron
- Figure 6.** L'acrostyle, un organe à la pointe des stylets maxillaires
- Figure 7.** Structure et microstructure de l'exosquelette des arthropodes (exemple du homard, *Homarus americanus*)
- Figure 8.** Modèle des deux modes de transmission des virus de plante
- Figure 9.** Modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plante-parasite
- Figure 10.** Induction des voies de défense de la plante suite à une attaque par un bio-agresseur
- Figure 11.** Modèle de l'interaction plante-puceron

Chapitre 1

- Figure 12.** Niveaux d'expression relatifs des gènes *stylins* dans différents tissus du puceron *A. pisum*, et à tous les stades de développement
- Figure 13.** Détection par immuno-marquages des stylines RR-1 dans les mues d'*A. pisum*

Chapitre 2

- Figure 14.** Schéma de la voie RNAi chez les eucaryotes
- Figure 15.** Administration de siRNA fluorescents aux pucerons
- Figure 16.** Schéma du système CRISPR-Cas9
- Figure 17.** Obtention de lignées *A. pisum* mutées pour le gène *stylin-01*

Chapitre 3

- Figure 18.** Symptômes systémiques du CaMV sur navet
- Figure 19.** Organisation du complexe transmissible du CaMV
- Figure 20.** Représentation schématique du protocole de *silencing* et des tests de transmission
- Figure 21.** Impact de la mutation KO Stylin-01 sur l'ultrastructure des stylets
- Figure 22.** Taux de transmission du CaMV et comportement alimentaire des pucerons des lignées WT et KO Stylin-01
- Figure 23.** Symptômes systémiques du TuMV sur navet

Figure 24. Représentation schématique des régions et motifs de la protéine HC-Pro, et structure 3D des oligomères

Figure 25. Taux de transmission du TuMV des lignées WT et KO Stylin-01

Figure 26. Coupe transversale d'un faisceau de stylets d'un puceron *Aphis gossypii*, nourri sur une plante infectée par le TuMV, observée en MET

Figure 27. Effet du traitement RNAi sur la transmission du TuMV par le puceron *M. persicae*

Chapitre 4

Figure 28. Observation en microscopie électronique à balayage d'un stylet maxillaire d'un puceron qui s'est nourri sur plante saine.

Figure 29. Recherche des propriétés des stylets, du comportement alimentaire et des traits d'histoire de vie de pucerons traités par RNAi

Figure 30. Comparaison du comportement alimentaire des pucerons *A. pisum* des lignées WT et KO Stylin-01

Table 1. Comportement alimentaire des lignées WT et KO Stylin-01 (KO) sur fève (*Vicia faba*)

Discussion

Figure 31. Représentation schématique des protéines cuticulaires identifiées à la pointe des stylets maxillaires de pucerons

Matériel et méthodes

Table 2. Liste complémentaire des amorces et siRNA utilisés dans l'étude RNAi du gène *stylin-04*

Liste des abréviations

AA : Acide aminé	MAPK : Mitogen-activated protein kinase
ACE : Angiotensin-converting enzyme	MIF : Macrophage migration inhibitory factor
ADN : Acide désoxyribonucléique	MET : Microscopie électronique à transmission
Armet : Arginine rich, mutated in early stage of tumors	NB-LRR : Nucleotide binding-leucine rich repeat
ARN : Acide ribonucléique	SA : Acide salicylique
BSA : Albumine de sérum bovin	OBP : Odorant-binding protein
Co-IP : Co-immunoprécipitation	PAMP : Pathogen-associated-molecular-pattern
CP : Protéine de capside	pb : Paire de bases
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	PCR : Polymerase chain reaction
CRISPR-Cas9 : CRISPR associated protein 9	pd : Potential drop
CSP : Chemosensory protein	PintO1 : Progeny increase to Overexpression 1
dsDNA : ADN double brin	PR : Pathogenesis-related
EPG : Electrical penetration graph (Electropénétrographie)	PRR : Pattern recognition receptor
ETI : Effector-triggered immunity	PTI : Pattern-triggered immunity
ETS : Effector-triggered susceptibility	RdRp : RNA-dependent RNA polymerase
GFP : Green fluorescent protein	RNAi : ARN interférence
HC-Pro : Helper component protease	ROS : Reactive oxygen species
HR : Réponse hypersensible	siRNAs : Petits ARNs interférents
JA : Acide jasmonique	TRX : Thiorédoxine
KO : Knock-out	VPS52 : Vacuolar protein sorting-associated protein 52
LC-MS-MS : Chromatographie liquide couplée à deux analyses par spectrométrie de masse	WT : Wild-type

Espèces cités

A. gossypii : *Aphis gossypii*

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

A. pisum : *Acyrtosiphon pisum*

B. aphidicola : *Buchnera aphidicola*

B. brassicae : *Brevicoryne brassicae*

CaMV : *Cauliflower mosaic virus*

CMV : *Cucumber mosaic virus*

E. coli : *Escherichia coli*

M. euphorbiae : *Macrosiphum euphorbiae*

M. persicae : *Myzus persicae*

N. benthamiana : *Nicotiana benthamiana*

PVY : *Potato virus Y*

T. castaneum : *Tribolium castaneum*

TEV : *Tobacco etch virus*

TuMV : *Turnip mosaic virus*

V. faba : *Vicia faba*

Introduction

Avant-propos

Dans nos régions tempérées, on estime qu'une espèce végétale sur quatre, dont la quasi-totalité des plantes d'intérêt agronomique, est attaquée par les pucerons (Dixon, 1998). Ces insectes, qui appartiennent à l'ordre des Hémiptères, ont un cycle de vie particulier, une grande plasticité phénotypique, et peuvent transmettre un nombre impressionnant de phytovirus. La communauté scientifique réalise actuellement des efforts pour comprendre la biologie de cet insecte, les interactions avec la plante hôte, ou encore les mécanismes de transmission des virus, ceci dans le but de proposer des moyens de lutte efficaces contre ce ravageur.

L'équipe « Interactions Virus-Insecte-Plante » (VIP) étudie depuis une vingtaine d'années le dialogue moléculaire entre les pucerons et les maladies virales qu'ils véhiculent. En s'intéressant à la transmission de certains virus retenus au niveau de la cuticule de leurs pièces buccales, le groupe de Marilyn Uzest a découvert un nouvel organe situé à la pointe des stylets maxillaires de pucerons : l'**acrostyle** (Uzest et al., 2007, 2010). Cet organe porte les récepteurs du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genre *Caulimovirus*), et potentiellement ceux d'autres virus de plante (Webster et al., 2018). Il semble conservé, y compris au niveau moléculaire, et joue probablement un rôle pour l'insecte lui-même, peut-être au niveau de son alimentation. S'il est effectivement impliqué dans ces processus alors il serait intéressant de perturber ses fonctions pour limiter les dégâts engendrés par les pucerons, qu'ils soient directs (liés à l'alimentation) ou indirects (liés à la vection de maladies).

L'acrostyle fait l'objet de mon sujet de thèse. Il vise à déterminer son rôle 1) dans la transmission des virus retenus dans les stylets de puceron, et 2) dans les interactions entre l'insecte et la plante.

Mon manuscrit de thèse commence par une **introduction générale**. Elle expose de manière globale les caractéristiques du puceron qui font de lui un redoutable ravageur, et présente l'acrostyle. Elle expose également l'avancée des connaissances concernant les interactions virus/puceron puis plante/puceron, avant de terminer par la présentation des objectifs du projet de recherche. **Le premier chapitre** est consacré à l'étude protéomique du faisceau de stylets du puceron du pois qui a permis d'identifier cinq protéines possédant des peptides directement accessibles dans l'acrostyle. Ces protéines, renommées stylines, représentent nos protéines candidates pouvant interagir avec des molécules en surface de l'organe. **Le deuxième chapitre** porte sur le développement d'outils permettant de valider les fonctions de ces protéines : l'approche ARN interférence et le système CRISPR-Cas9. Ils ont tous les deux permis de caractériser l'implication de certaines stylines dans la transmission des virus de plante, ainsi que dans les interactions plante/insecte. Ces résultats sont respectivement décrits dans **les chapitres 3 et 4**. Ces chapitres sont suivis d'une **discussion générale**, où sera mis en perspective l'ensemble des résultats obtenus au cours de ces travaux. Pour terminer, une section, à la fin du manuscrit, est dédiée au « matériel et méthodes », et une autre aux références bibliographiques citées dans ce travail.

1. Le puceron, un ravageur redoutable

1.1. Taxonomie

Les insectes sont retrouvés sur la quasi-totalité de la surface de la Terre, des zones les plus arides aux zones les plus froides, et englobent au moins un million d'espèces (Stork, 2018). S'ils ont pu coloniser la plupart des milieux au cours de leur évolution, c'est notamment grâce à leurs pièces buccales qui sont adaptées à divers régimes alimentaires (Nel et al., 2018). Ainsi, les insectes broyeur sont caractérisés par des mandibules développées, puissantes et tranchantes, capables de couper et de mâcher les aliments solides comme des feuilles ou des graines. C'est le cas des Coléoptères et des Hyménoptères (fourmis, guêpes). A l'inverse, les pièces buccales des insectes « suceurs » sont généralement allongées et forment un long tube dans lequel des aliments exclusivement liquides sont aspirés. Parmi eux se trouve le groupe des piqueurs-suceurs auquel appartient le puceron.

Les piqueurs suceurs des plantes sont regroupés dans l'ordre des Hémiptères et celui des Thysanoptères. L'ordre des **Hémiptères** comprend entre 50 000 et 80 000 espèces d'insectes piqueurs suceurs phytophages (Dolling, 1991). Cet ordre était originellement séparé en deux selon la structure des ailes et la position du rostre : les Homoptères et les Hétéroptères. Bien que cette classification soit toujours largement débattue (Cryan and Urban, 2012), il est maintenant divisé en quatre sous-ordres : les **Sternorrhynques** (pucerons, cochenilles, aleurodes et psylles) et les Auchenorrhynques (cicadelles, cigales, fulgoromorphes...) représentant anciennement les Homoptères, auxquels viennent s'ajouter les Hétéroptères (punaises) et les Coleorrhynques.

L'ordre des Thysanoptères, quant à lui, comporte plus de 7700 espèces décrites à ce jour (Mound, 2012). Auparavant classés parmi les Hémiptères, l'ordre est maintenant subdivisé en Tubulifères et Térébrantes. Les Térébrantes regroupent notamment les genres *Limothrips*, *Frankliniella* et *Thrips*, les principaux genres de ravageurs de culture.

Les pucerons, dans l'ordre des Hémiptères, constituent la super-famille des *Aphidoidea* répartie en trois familles : les *Phylloxeridae*, les *Adelgidae* et les *Aphididae*. Cette dernière constitue de loin la famille la plus importante. Au total, c'est plus de 5000 espèces de pucerons qui ont été recensées parmi lesquelles 250 sont responsables de pertes économiques dans des cultures d'intérêt agricole ou sylvicole (Blackman and Eastop, 2000).

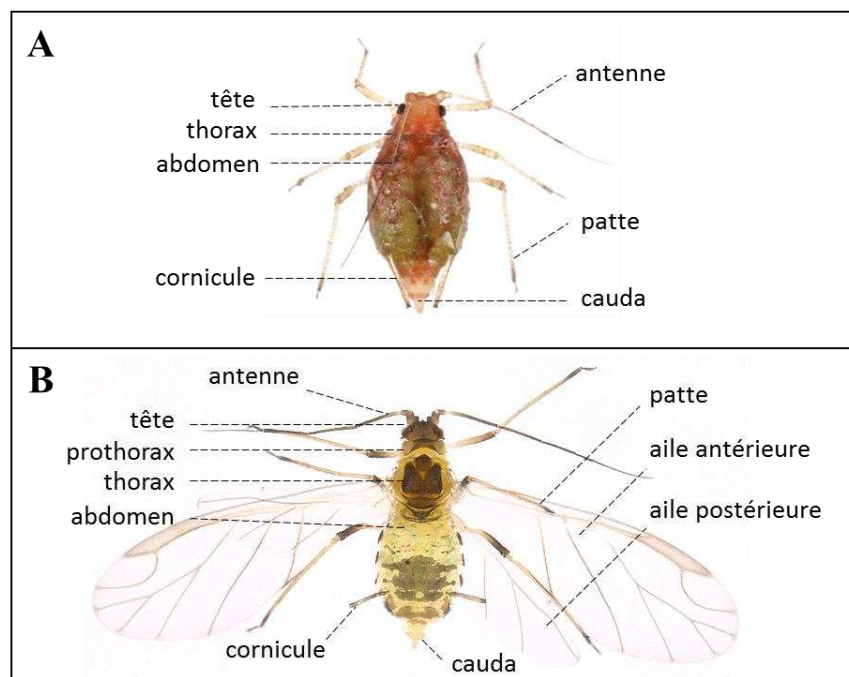


Figure 1. Anatomie du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*

Photographies en vue dorsale de morphes aptère (A) ou ailé (B). Clichés de B. Chaubet, INRA.

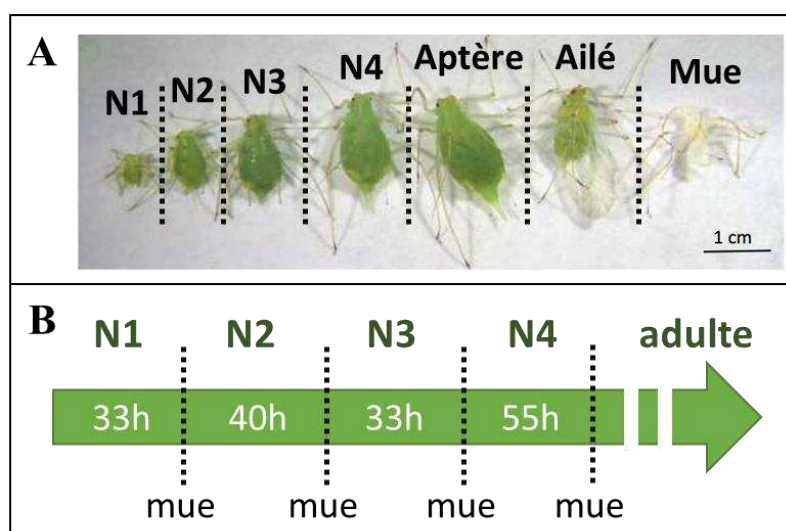


Figure 2. Développement du puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum*

A) De gauche à droite : les stades larvaires N1 à N4 du clone LL01, un adulte aptère, un adulte ailé et une mue de puceron, observés sous loupe binoculaire. B) Estimation des durées moyennes de chaque stade larvaire du clone LL01 sur fève (Febvay et al., 1988).

1.2. Anatomie du puceron

Les pucerons sont de petits insectes (1-10 mm) aux téguments mous (**Fig. 1**). Leurs tailles, leurs couleurs ou encore la forme de leurs appendices varient d'une espèce à l'autre. Ils présentent également d'importants polymorphismes au sein d'une même espèce qui regroupe à la fois des individus ailés et aptères. Ils possèdent un corps segmenté constitué d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen, munis chacun d'une paire d'appendices articulés.

La tête est généralement soudée à la région thoracique chez les formes aptères, alors que chez les formes ailées elle est séparée du thorax. Elle porte une paire d'antennes avec 3 à 6 articles antennaires insérés sur des lobes frontaux, une paire d'yeux, et un rostre dans lequel le faisceau de stylets est protégé. Le thorax porte trois paires de pattes de longueur inégale terminées par des griffes. Les formes ailées comportent deux paires d'ailes. Enfin, une cauda est visible sur l'abdomen, en prolongement du dernier segment à l'extrémité postérieure, servant à l'épandage du miellat, un liquide visqueux et sucré (<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons>). Dorsalement, il porte aussi une paire de cornicules (tubes creux dressés) sécrétant des phéromones d'alarme qui provoquent un comportement de fuite des pucerons voisins (Verma et al., 2016).

Le développement du puceron comprend quatre stades larvaires et un stade adulte, séparés par des mues (**Fig. 2**). La durée moyenne du développement varie selon l'espèce de puceron, mais aussi selon les conditions d'élevage (température, photopériode, etc.). Une étude a estimé la durée moyenne des stades larvaires du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* à 30 h, 40 h, 33 h et 55 h pour les 1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} stades respectivement, soit un développement larvaire complet d'environ 160 h (entre 6 et 7 jours) (Febvay et al., 1988). Ces temps de développement concernent des larves élevées sur fèves à une température de 21°C, une humidité relative de 70% et une photopériode de 16 h/8 h (jour/nuit).

A noter que le puceron est **hémimétabole** : les nymphes ressemblent fortement aux adultes aptères. Elles ont le même mode de vie, se nourrissent de la même manière et font le même type de dégâts que ces derniers.

1.3. Cycle de vie

Le cycle de vie complexe des pucerons et leur importante plasticité phénotypique contribuent grandement à leur succès en tant que ravageurs des cultures (Hardy et al., 2015; Tomlinson, 1987). Au cours de leur cycle de vie et en fonction des conditions environnantes (densité de population, conditions climatiques, photopériode, présence de prédateurs, qualité nutritive de l'hôte, etc.), ils ont la faculté de produire différents morphes. Le fait d'exprimer des phénotypes différents à partir d'un même matériel génétique est appelé **polyphénisme**. Chez le puceron, un **polyphénisme de dispersion** permet la formation de formes résidentes aptères, et de formes ailées leur offrant la capacité de se déplacer sur de longues distances (Braendle et al., 2006).

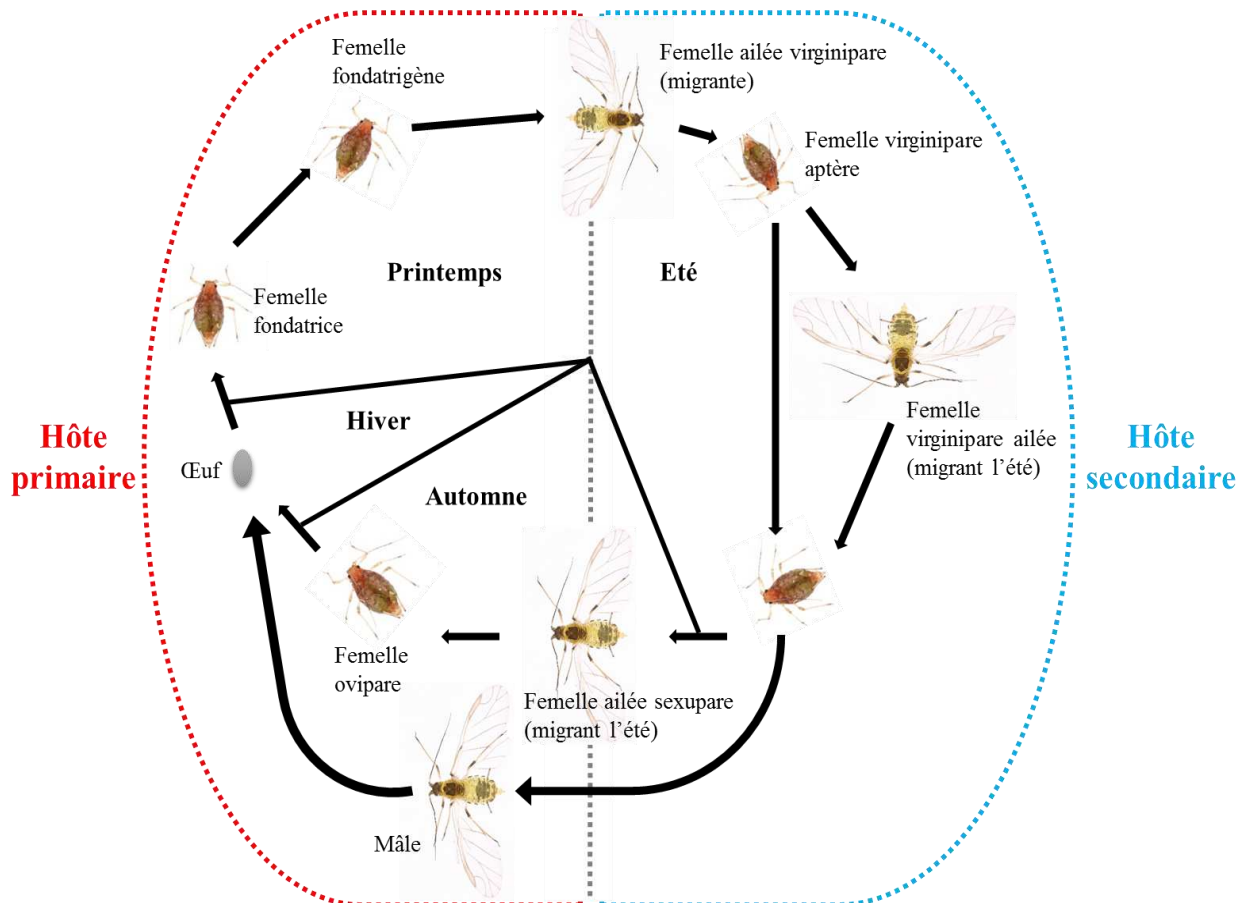


Figure 3. Cycle de vie de *Myzus persicae*

De l'œuf d'hiver éclos toujours une femelle fondatrice sur l'hôte primaire, qui engendre une population de femelles parthénogénétiques, appelées fondatrigènes, sur le même hôte. La proportion de fondatrigènes ailées augmente au fil du temps. Au printemps, les fondatrigènes ailées migrent sur l'hôte secondaire pour donner naissance à de nouvelles générations parthénogénétiques aptères qualifiées de virginipares. A l'automne apparaissent des femelles appelées sexupares qui donnent naissance à des mâles et des femelles ovipares sur l'hôte primaire (le pêcher ou le prunier). Après accouplement, la femelle pond des œufs.

Adapté d'Encyclop'APHID (<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons>), photos de B. Chaubet, INRA.

Le **polyphénisme de reproduction** leur donne la possibilité d'alterner entre des formes sexuée (mâle ou femelle **ovipare**), assurant la production d'œufs qui est la forme de survie durant l'hiver, et asexuée (femelle **vivipare**) par parthénogénèse apomictique (Simon et al., 2010).

Un cycle complet ou **holocycle**, comporte une alternance entre reproduction sexuée et asexuée. A la fin de l'été, le raccourcissement des jours (photopériode) semble agir directement sur les futurs embryons qui deviendront des mâles ou femelles ovipares sexués (Le Trionnaire et al., 2008). Ces individus s'accouplent et les femelles pondent des œufs fécondés sur les plantes pendant la période automnale. Ensuite, ces œufs restent en diapause obligatoire pendant trois mois au cours de l'hiver, puis les femelles « **fondatrices** » éclosent au début du printemps pour donner de nouvelles colonies parthénogénétiques, les femelles « **fondatrigènes** ». La reproduction par parthénogénèse perdure jusqu'à la fin de l'été, engendrant une très forte augmentation démographique : un puceron adulte pond en moyenne entre 40 à 60 larves (<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons>).

Les espèces qui exploitent la même espèce ou famille de plante durant les phases sexuée et asexuée sont dites **monoeciques**. D'autres en revanche (environ 10%) effectuent leur phase de reproduction sexuée sur un hôte primaire (généralement une plante ligneuse) et leur phase asexuée sur un hôte secondaire (le plus souvent une plante herbacée). Elles sont dites **diœciques**. C'est le cas par exemple de l'espèce *M. persicae* qui a pour hôte primaire le pêcher ou le prunier, tandis qu'à la fin du printemps, lorsque la population a atteint sa densité maximale, les femelles ailées apparaissent pour aller coloniser une plante hôte secondaire (**Fig. 3**). Celle-ci peut appartenir à environ 50 familles botaniques dont les *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* et *Cucurbitaceae*.

Enfin, il est intéressant de noter qu'environ 3% des espèces, comme *Myzus ascalonicus* ou *Toxoptera citricidus*, ne se reproduisent plus que par parthénogénèse dans les régions où les hivers sont suffisamment doux (Jaquiéry et al., 2014; Ogawa and Miura, 2014). On parle alors d'**anholocyclie**. De plus, une variabilité de cycles (holocyclie / anholocyclie) peut co-exister au sein de la même espèce en fonction de la rigueur de l'hiver et de la disponibilité des plantes hôtes. Ce phénomène est par exemple observé chez *M. persicae* ou encore chez *Macrosiphum euphorbiae* (Blackman and Eastop, 2000).

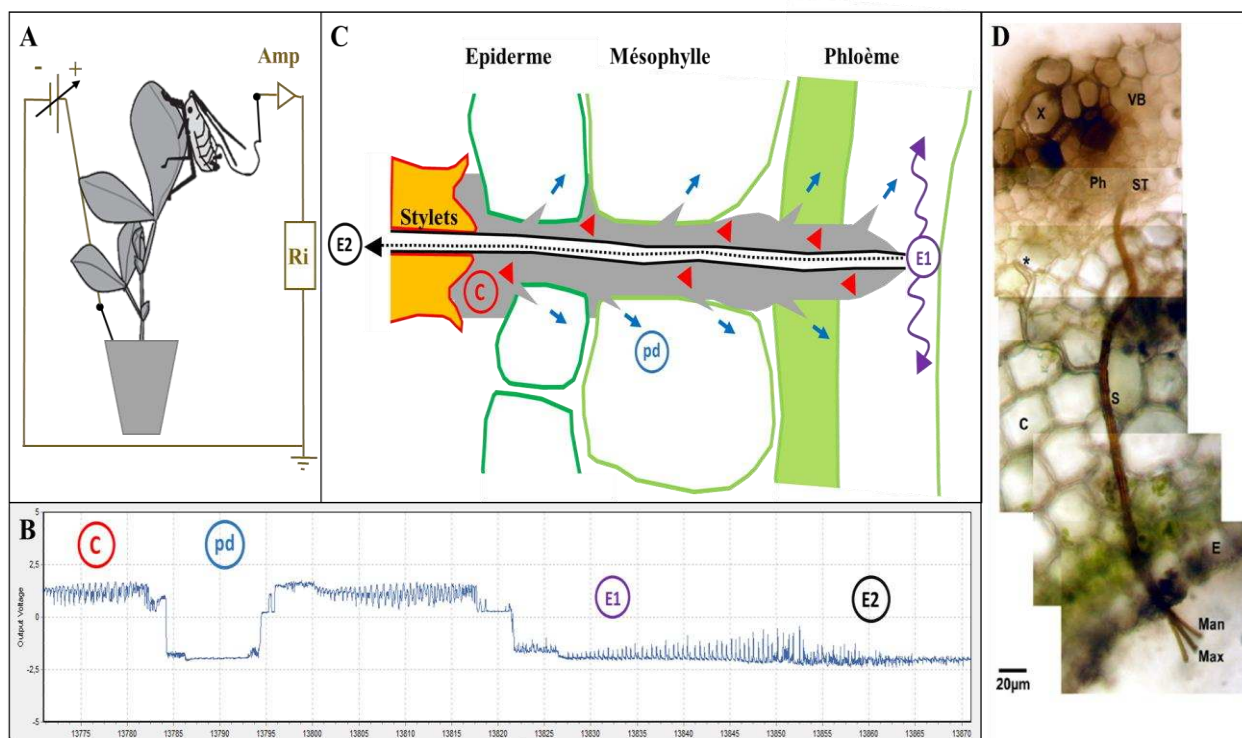


Figure 4. Suivi des différentes phases d'alimentation du puceron par la technique EPG

A) Branchement du puceron dans le circuit électrique. **B)** Exemple d'un profil EPG avec les phases principales présentées en C), caractéristiques de l'alimentation d'un puceron. Ce profil a été enregistré avec des pucerons adultes *A. pisum* sur fève (*Vicia faba* cv Robin Hood). **C)** Différentes périodes de salivation détectées en EPG. Dans l'apoplaste des cellules, le puceron sécrète la salive gélifiée qui forme une gaine enveloppant les stylets tout le long de leur trajet (zone grise avec triangles rouges). Cette phase correspond à la **phase C** en EPG. Le puceron sécrète aussi de la salive aqueuse pendant quelques secondes lors de brèves ponctions intracellulaires dans les cellules de l'épiderme et du mésophylle (**pd** – *potentiel drop* – ou flèches bleues), ainsi que dans les vaisseaux conducteurs (**phase E1**) où il ingère la sève pendant plusieurs heures (**phase E2**). Adapté de Tjallingii (2006). **D)** Image d'un faisceau de stylets de *Megoura viciae* progressant à travers les parois des cellules d'une tige de *V. faba*, visible dans différentes coupes transversales. De la salive gélifiée est toujours visible même après rétraction des stylets, et son extrémité est marquée par une astérisque (*). La barre d'échelle représente 20 µm. C : cortex, E : épiderme, Man : stylet mandibulaire, Max : stylet maxillaire, ph : phloème, S : faisceau de stylets, ST : pointe du stylet, VB : tissus vasculaires, X : xylème. D'après Hewer et al. (2011)

1.4. Préférence de l'hôte et comportement alimentaire

Les pucerons sont capables de coloniser une large variété d'hôtes (environ 25% des espèces existantes) (Dedryver et al., 2010). Bien que l'extrême majorité des espèces soient inféodées à une seule famille végétale, certaines espèces sont extrêmement polyphages (i.e capables de se nourrir sur diverses plantes appartenant à différentes familles botaniques non apparentées). On parle dans le premier cas d'espèces « spécialistes » (cas d'*A. pisum*) et dans le second, d'espèces « généralistes » (cas de *M. persicae*) considérées comme hautement ravageuses (Blackman and Eastop, 2000).

Lorsque le puceron n'arrive pas de manière accidentelle sur une plante (porté par les vents), il doit être capable de la sélectionner à longue distance. Il va s'orienter en fonction des longueurs d'ondes lumineuses (signaux visuels) et de la perception de composés volatils émis par les plantes qui sont détectés grâce aux sensilles olfactives antennaires (Park and Hardie, 2003). Lorsqu'il atterrit sur un nouvel hôte, il explore la plante en surface avec ses antennes et ses tarsi afin de percevoir les propriétés physico-chimiques du végétal telles que la nature des composés volatils, la texture de la surface, la typologie, les exsudats de trichomes et les cires épicuticulaires (Powell et al., 2006). Il balaie également la surface de la plante avec son rostre, dont les récepteurs tactiles permettent de détecter la zone préférentielle de piqûre (Feres and Moreno, 2009). Une fois cette zone identifiée, le puceron sécrète un bouchon salivaire en surface de la feuille où les stylets, après avoir coulissé le long de la gouttière dorsale du rostre, pénètrent les tissus de la plante.

L'**électropénétrographie (EPG)** est une technique qui a été mise au point pour suivre l'alimentation des insectes piqueurs-suceurs sur leurs plantes hôtes (McClean and Kinsey, 1964, 1967; Tjallingii, 1978, 1988). Elle consiste à intégrer l'insecte et la plante dans un circuit électrique par l'intermédiaire de deux électrodes : l'un est positionné dans le pot de la plante tandis que l'autre est relié au dos de l'insecte par un fil d'or conducteur et une colle à base d'argent (Fig. 4-A). Il est ainsi possible de suivre la pénétration des stylets dans les tissus végétaux grâce à l'enregistrement des variations de résistance électrique induites par les différentes activités de l'insecte sur sa plante hôte (Fig. 4-BC) :

- Les stylets pénètrent dans les tissus entre les cellules de l'épiderme et du mésophylle (**phase C**). Une salive gélifiée est sécrétée dans l'apoplaste des cellules, tout le long du trajet intercellulaire, formant une gaine protectrice autour des stylets (Fig. 4-D). Elle a pour but de limiter le contact direct avec les parois cellulaires (Tjallingii, 2006) et les composés de défense de la plante (Hogenhout and Bos, 2011). La durée de cette phase est très variable (minutes à heures) et dépend de la capacité du vecteur à atteindre les vaisseaux conducteurs.
- Le puceron effectue des piqûres d'essai intracellulaires dans les cellules de l'épiderme et du mésophylle, de l'ordre de quelques secondes, afin de « goûter » la plante. La rupture de la membrane plasmique est associée à un signal spécifique, décrit comme *potential drop* (**pd**). Un

pd comporte deux sous-phases de salivation (II-1 et II-2) où un deuxième type de salive, la salive aqueuse, est alors secrétée ; et une sous-phase d'ingestion (II-3) où il aspire le contenu de la cellule. Cette exploration est déterminante pour le choix de la plante hôte : elle permet au puceron de se diriger vers le phloème grâce à des gradients de pH et de sucrose entre les différentes cellules végétales (Hewer et al., 2011).

- Si la plante lui convient, le puceron insère ses stylets plus profondément jusqu'au phloème pour atteindre les tubes criblés où il sécrète à nouveau de la salive aqueuse pendant quelques secondes (**phase E1**). Cette salivation anticipe les réactions de la plante et empêche la cicatrisation des tissus blessés par la pénétration des stylets (Tjallingii, 2006). Le puceron ingère alors la sève élaborée (**phase E2**), parfois durant plusieurs heures en cas d'interaction compatible. Durant cette phase, la salivation est continue et la salive se mélange à la sève.

La composition des deux salives et leur rôle pour l'installation durable du puceron sur sa plante hôte sont présentés plus en détails dans [la section 4.3 de l'introduction](#).

1.5. Symbiose bactérienne

Le succès des pucerons comme ravageurs des cultures provient également des relations qu'ils entretiennent avec des microorganismes symbiotiques.

Tous les insectes qui se développent dans des niches trophiques spécialisées, souvent carencées en nutriments essentiels à leur développement, sont en effet associés à des symbiotes qui viennent compléter leur alimentation. C'est le cas des pucerons qui s'alimentent dans la sève élaborée, riche en sucres, mais dans laquelle certains acides aminés et vitamines essentiels se trouvent en quantité insuffisante (Douglas et al., 2006). Leur adaptation n'a pu se faire que via une symbiose obligatoire avec le **symbiote primaire** *Buchnera aphidicola*. Il s'agit d'une γ -protéobactérie confinée dans le cytoplasme des cellules spécialisées du puceron, appelées bactériocytes, au niveau de sa cavité abdominale (Shigenobu and Wilson, 2011; Wernegreen, 2002). *B. aphidicola* est transmise verticalement à la descendance soit dans l'œuf, soit aux embryons lors de la parthénogénèse (Miura et al., 2003).

Le métabolisme de *B. aphidicola* complète celui de l'hôte (Douglas, 2003). Il s'est en effet spécialisé au cours de son évolution dans la biosynthèse des acides aminés, puisque 10% de son génome, soit une soixantaine de gènes, est dédié à cette fonction (Shigenobu et al., 2000). Malgré cette spécialisation, la bactérie elle-même, est dépendante du métabolisme du puceron pour la synthèse d'autres acides aminés. L'analyse couplée du génome des deux partenaires symbiotiques a en effet mis en évidence une véritable interdépendance sur le plan métabolique entre le puceron et la bactérie (Hansen and Moran, 2011; Shigenobu and Wilson, 2011; Wilson and Duncan, 2015; Wilson et al., 2010). Ainsi, la bactérie peut survivre quelques heures en dehors de son hôte, mais n'est pas cultivable *in vitro* (Whitehead and Douglas, 1993).

A l'inverse, il est possible de débarrasser les pucerons de leurs bactéries symbiotiques, mais ceux-ci se développent beaucoup moins bien et deviennent stériles (Douglas, 2003).

Les pucerons peuvent aussi accueillir des **symbiotes secondaires facultatifs**, les plus répandus étant *Serratia symbiotica*, *Regiella insecticola* et *Hamiltonella defensa* (Oliver et al., 2010). Les symbiotes secondaires jouent un rôle dans l'adaptation de l'hôte à l'environnement car ils peuvent impacter différents traits comme la tolérance thermique (Harmon et al., 2009; Montllor et al., 2002), l'amélioration de l'exploitation de la plante hôte (Sugio et al., 2015; Tsuchida et al., 2004), ou encore la résistance vis à vis de pathogènes, parasites ou prédateurs (Lukasik et al., 2013; McLean and Godfray, 2015; Oliver et al., 2003, 2005, 2010; Polin et al., 2015; Scarborough et al., 2005). Les symbiotes influencent également la couleur corporelle des individus (Tsuchida et al., 2010).

1.6. Impact agronomique et méthodes de lutte

Toutes ces caractéristiques (cycle de vie complexe, développement rapide, importante plasticité, comportement alimentaire unique, etc.) placent les pucerons parmi les principaux ravageurs des cultures. Ils constituent en effet le groupe de ravageurs dominant des six principales cultures à visée alimentaire (maïs, blé, pomme de terre, betterave, orge et tomate) (Dedryver et al., 2010).

Ils occasionnent d'abord des **dégâts directs** sur les plantes via leur alimentation, puisqu'ils détournent à leur profit la sève, engendrant de profonds changements physiologiques chez leurs plantes hôtes (Girousse et al., 2005) : ralentissement de la croissance ou encore production de grains ou de fruits de taille réduite (Dedryver, 2007; Douglas, 2003). Ils rejettent ensuite du miellat en grande quantité via leur cauda qui favorise le développement de champignons phytopathogènes comme la fumagine (moisissure noire responsable d'une asphyxie de la plante) et qui représente une source de nourriture pour d'autres insectes nuisibles (Sabri et al., 2013). Enfin, certaines espèces produisent une salive très toxique comme l'espèce *Diuraphis noxia* qui s'alimente sur céréales (Nicholson et al., 2012). D'autres composés chimiques contenus dans la salive peuvent aussi interférer dans le processus de multiplication cellulaire et provoquer la formation de galles (Will and van Bel, 2006).

A cela s'ajoutent les **dégâts indirects** encore plus dommageables liés au nombre important de virus que les pucerons transmettent et qui les placent ici au premier rang des vecteurs de phytovirus. Par exemple, l'espèce *M. persicae* est capable à elle seule de transmettre plus de 120 virus (<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons>). La prolifération virale à l'intérieur des tissus végétaux se traduit le plus souvent par la décoloration et la déformation du limbe foliaire, la formation de mosaïques et de marbrures et un retard de croissance. Elle peut parfois entraîner des symptômes plus drastiques tels

que le nanisme, la mort de la plante et une baisse de qualité des fruits (Bar-Joseph et al., 1989; Dallot et al., 2003; Dedryver et al., 2010; Tomlinson, 1987).

Différentes méthodes existent pour lutter contre les pucerons. La **lutte chimique** est utilisée depuis de nombreuses années mais elle a un coût non négligeable en plus de présenter certains inconvénients. Elle engendre évidemment des dommages collatéraux sur l'environnement (destructions d'insectes bénéfiques, pollution de l'air et des sols) et pour la santé de l'homme. Dans certains cas, elle engendre aussi une adaptation des pucerons qui se traduit par des clones résistants aux molécules chimiques utilisées, et par une perte d'efficacité si la fréquence des traitements est trop importante (Bass et al., 2014). La pulvérisation d'un traitement aphicide peut également entraîner une augmentation de l'activité et de la mobilité des pucerons, favorisant la transmission des virus (Budnik et al., 1996; Hooks and Fereres, 2006). Depuis quelques années, d'autres moyens alternatifs émergent comme la **lutte biologique** (utilisation de parasitoïdes ou de prédateurs), le déploiement de **variétés résistantes** (Edwards and Singh, 2006) ou encore la **lutte culturale** comme le paillage ou l'utilisation de bâches. Concernant le nombre important de maladies virales véhiculées par les pucerons, il n'existe toujours aucune molécule chimique permettant d'éradiquer les virus de manière curative. Seule la lutte préventive avec l'élimination des vecteurs peut être envisagée.

Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de rétention et de transmission chez l'insecte afin de mettre au point de nouvelles méthodes de lutte ciblant spécifiquement l'interaction virus/vecteur ou plante/puceron.

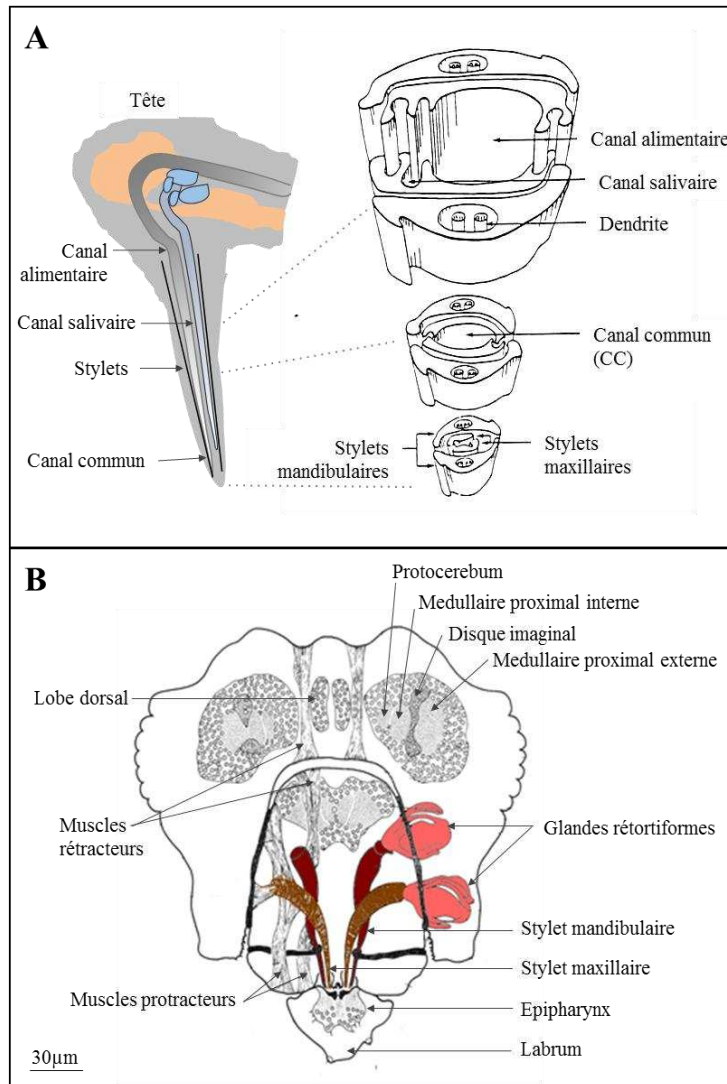


Figure 5. Schémas descriptifs des pièces buccales du puceron

A) Représentation schématique du faisceau de stylets. L'architecture particulière des stylets maxillaires avec des crêtes et des rainures de part et d'autre permet de délimiter le canal alimentaire et le canal salivaire qui fusionnent à la pointe en un canal commun. Les glandes salivaires du puceron sont représentées en bleues. *Adapté de Taylor and Robertson (1974) et Blanc et al. (2014).* **B)** Représentation de la tête du puceron *M. persicae*, dessinée à partir d'une série de sections transversales sur un individu âgé de 24 h. Les quatre glandes rétortiformes et les quatre stylets sont respectivement colorés en rose et en marron. Des muscles protracteurs sont visibles à l'extrémité de chaque stylet. La barre d'échelle représente 30 µm. *Adapté de Ponsen (1972)*

2. L'acrostyle, un organe à la pointe des stylets de puceron

2.1. Le faisceau de stylets

Le faisceau de stylets des pucerons comporte deux **stylets mandibulaires** entourant deux **stylets maxillaires** (Fig. 5-A). Chaque stylet mandibulaire est innervé par deux dendrites présentes dans un petit conduit interne (Forbes, 1966). Leur extrémité distale est incurvée à la pointe et la partie externe abrite des crêtes qui permettent de lacérer les tissus et d'ancrer les stylets en profondeur (Forbes, 1966; Van Hoof, 1958). Les maxillaires quant à eux, sont caractérisés par de nombreuses crêtes et rainures au niveau de leur face intérieure, verrouillées à la façon d'un « ziplock » sur la quasi-totalité de leur longueur. Cette architecture délimite un grand **canal alimentaire** (environ 0,6 à 1,2 μm de diamètre chez *M. persicae*) et un petit **canal salivaire** (0,2 à 0,5 μm), qui se rejoignent à l'extrémité du faisceau pour former le **canal commun** (Forbes, 1969; Leonhardt, 1940; Mittler, 1957).

Les stylets sont protégés à la base par un labrum court et triangulaire. Ils s'insèrent ensuite dans une rainure creusée le long de la surface antérieure du labium, ou rostre. Le rostre est une sorte d'organe segmenté et « télescopique » qui se contracte et se raccourcit lors de l'insertion des stylets dans les tissus, afin de faciliter leur pénétration. Une fois dans les tissus, les mouvements des deux paires de stylets (mandibulaires et maxillaires) doivent être parfaitement coordonnés afin de créer la force nécessaire à leur propulsion. Ils progressent ainsi via de nombreuses contractions alternées des muscles attachés à l'extrémité basale de chaque stylet (Balch, 1952; Bradley et al., 1962; Ponsen, 1972) (Fig. 5-B). Enfin, les stylets sont extrêmement souples : des études ont en effet démontré une torsion possible de 90° chez plusieurs espèces de pucerons (Sorin, 1966) (Fig. 4-D).

Bien que leur taille puisse varier d'une espèce à l'autre, l'anatomie des stylets est très conservée (Forbes, 1977). Ils sont perdus à chaque mue et sont remplacés par des stylets néo-synthétisés, sécrétés par les **glandes rétoriformes** situées dans la tête des pucerons (Pesson, 1944; Ponsen, 1972) (Fig. 5-B). Une paire de glandes sécrète les stylets mandibulaires et une autre les stylets maxillaires (un stylet par glande). Les quatre stylets sont donc ancrés séparément à l'intérieur de la tête.

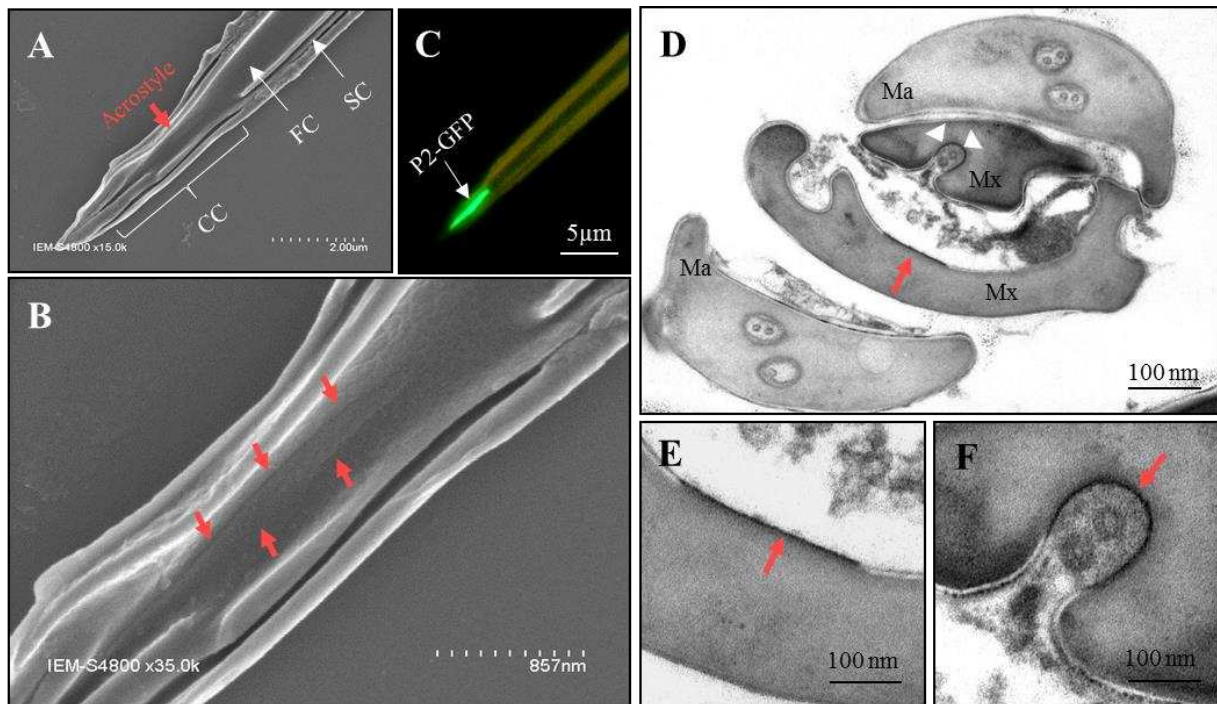


Figure 6. L'acrostyle, un organe à la pointe des stylets maxillaires

A) Observation en microscopie électronique à balayage d'une coupe longitudinale de la pointe d'un stylet maxillaire de puceron *A. pisum*. L'acrostyle visible dans le canal commun est indiqué par une flèche rouge (Uzest et al., 2010). **B)** Agrandissement de la figure A. L'acrostyle est mis en évidence par des flèches rouges. **C)** Incubation de la fusion P2-GFP (facteur assistant du CaMV fusionné à une protéine fluorescente) sur un stylet maxillaire d'*A. pisum*, observé en microscopie à épifluorescence. Une fluorescence est visible tout le long du canal commun, dans lequel se situe l'acrostyle. **D-F)** Coupe transversale d'un faisceau de stylets du puceron *Brevicoryne brassicae*, nourri sur une plante infectée par le CaMV et observée au niveau de l'extrémité distale en microscopie électronique à transmission. L'acrostyle est indiqué par une flèche rouge. Deux particules virales sont visibles dans le canal commun au niveau du stylet maxillaire supérieur (indiquées par des flèches blanches).

CC : canal commun, FC : *food canal* (canal alimentaire), Ma : stylet mandibulaire, Mx : stylet maxillaire, SC : *salivary canal* (canal salivaire).

Barres d'échelles : A) 2 μ m, B) 857 nm, C) 5 μ m et D-F) 100 nm.

2.2. La découverte d'un nouvel organe : l'acrostyle

En cherchant à caractériser les sites de rétention des virus dans les pièces buccales des pucerons, mon équipe d'accueil a découvert un organe dans le canal commun, à la pointe des stylets maxillaires. Cet organe a été appelé **acrostyle** (Fig. 6). Il mesure 3 à 5 μm de long et 250 nm dans sa partie la plus large (Uzest et al., 2010). Il a été trouvé à tous les stades larvaires, chez toutes les espèces de pucerons dans lesquelles il a été recherché, soit environ une trentaine d'espèces dans la famille des *Aphididae* (majoritairement dans la sous-famille des *Aphidinae*, mais aussi chez les *Lachninae* et *Eriosomatinae*) (Webster et al., 2018). Pour l'instant, il n'a pas encore été identifié chez d'autres espèces d'hémiptères.

Sa fonction physiologique pour l'insecte lui-même est toujours inconnue, cet organe n'ayant pas été étudié de manière approfondie. Etant donné qu'il fait partie intégrante des stylets, nous savons qu'il est constitué de cuticule.

2.3. La composition protéique de l'acrostyle

2.3.1. Propriétés générales de la cuticule

Chez les insectes et tous les arthropodes en général, la cuticule est retrouvée dans la couche externe sécrétée par les cellules épidermiques qui constitue l'exosquelette recouvrant tout le corps de l'animal. Elle est aussi retrouvée à l'intérieur de l'organisme au niveau intestinal (Neville, 1975). Elle confère une protection contre les agressions extérieures, comme les produits chimiques, la déshydratation, les rayonnements, les blessures et les attaques de prédateurs ou pathogènes (Vincent and Wegst, 2004). De plus, les différenciations internes et externes du squelette permettent aux organes d'être maintenus en place et à l'insecte de se mouvoir grâce à l'insertion des muscles sur des parties dures. Etant donné les propriétés d'élasticité limitées de la cuticule, l'exosquelette des insectes est inextensible. La mue leur permet de grandir en taille ou d'acquérir de nouveaux organes voire de changer de forme.

La cuticule est composée de fibres de chitine (polymère de N-acéyl-D-glucosamine) incorporées dans une matrice protéique, et contient également des lipides et cires complexes (Locke, 2001) (Fig. 7). Il existe des cuticules avec des propriétés physiques et mécaniques très différentes (rigides à souples, flexibles ou non), y compris au sein d'un même insecte (aile, exosquelette, stylet, etc.), vraisemblablement régies par les interactions chitine-protéine, par la composition en protéines cuticulaires, et par les processus de sclérotisation (Andersen and Højrup, 1987; Chihara et al., 1982; Cox and Willis, 1985; Nakato et al., 1990).

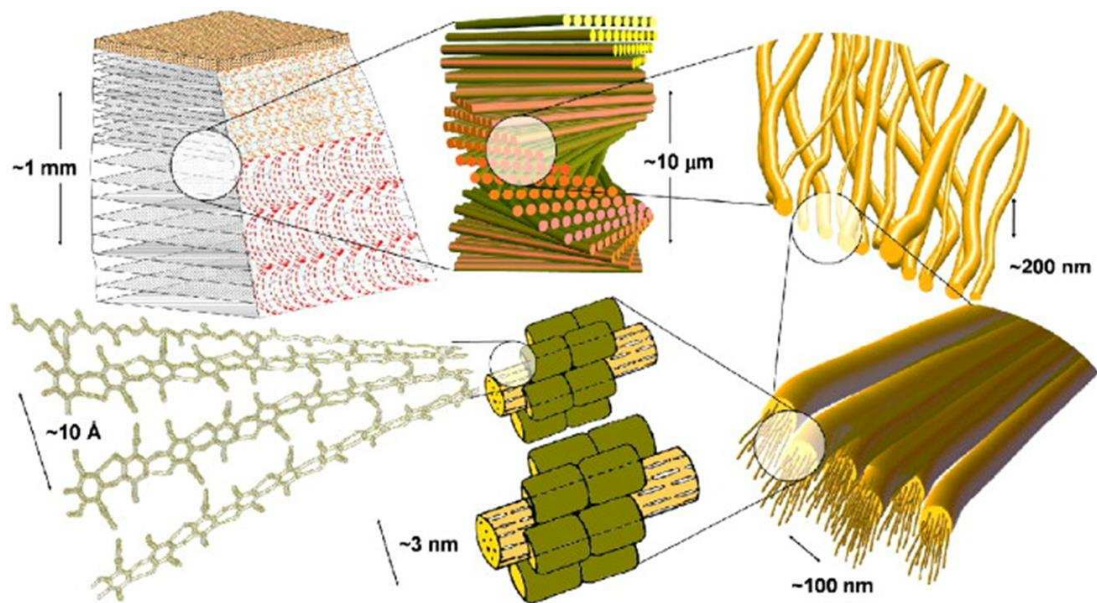


Figure 7. Structure et microstructure de l'exosquelette des arthropodes (exemple du homard, *Homarus americanus*)

La cuticule des arthropodes révèle un degré élevé d'organisation interne, qui peut être décrite à six niveaux. Le premier niveau est le polymère de N-acétyl-D-glucosamine, la chitine (en bas à gauche). Le deuxième niveau est la disposition de 18 à 25 chaînes polysaccharidiques formant des nanofibrilles d'environ 2 à 5 nm de diamètre et 300 nm de longueur (Vincent, 2002; Vincent and Wegst, 2004). Les tubes verts représentent les protéines cuticulaires. Le troisième est le regroupement de certaines de ces nanofibrilles en longues fibres d'environ 50 à 300 nm de diamètre. Le quatrième est la formation d'un réseau ramifié entre ces fibres. Le cinquième montre qu'elles s'empilent en plusieurs plans hélicoïdaux qui tournent progressivement autour d'un axe pour former une structure « torsadée », désignée comme le motif Bouligand (Bouligand, 1972; Giraud-Guille, 1984, 1998; Giraud-Guille et al., 1990; Hadley, 1986). Leur rotation progressive d'un plan à l'autre crée des structures complexes (sixième niveau) lorsqu'elles sont vues en coupe transversale.

D'après Raabe et al. (2005)

2.3.2. Classification et fonctions des protéines cuticulaires

Les protéines cuticulaires sont classées dans différentes familles, définies en fonction de la présence de motifs caractéristiques conservés (Ioannidou et al., 2014). De nouvelles familles sont régulièrement décrites dans la littérature, qui en dénombre actuellement quatorze : **CPR**, **CPF**, **CPFL**, **Tweedle**, **CPLCA**, **CPLCG**, **CPLCP**, **CPLCW**, **Glycine-rich proteins**, **Apidermin**, **CPAP1**, **CPAP3**, **GPG** et **TPAP** (Pan et al., 2018; Willis, 2010).

Près de la moitié des protéines cuticulaires d'arthropodes disponibles dans les bases de données appartiennent à la famille des CPR. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine conservé connu comme le consensus R&R (Rebers and Riddiford, 1988), qui a pour fonction de lier la chitine (Rebers and Willis, 2001; Togawa et al., 2004). Cette famille est subdivisée en trois groupes différents (RR-1 / -2 / -3), basés sur les variations de ce consensus (Andersen, 1998, 2000; Andersen et al., 1997). Il est décrit que les RR-1 seraient préférentiellement retrouvées dans la cuticule souple et les RR-2 dans la cuticule rigide, mais ceci n'est pas toujours le cas puisqu'on trouve par exemple des protéines RR-1 dans la cuticule rigide des élytres de *Tribolium castaneum* (Noh et al., 2015). Les RR-3 sont moins bien décrites car retrouvées chez peu d'arthropodes. Chez le puceron, elles sont par exemple décrites chez *M. persicae* mais n'ont pas été retrouvées dans le génome d'*A. pisum*.

Les protéines cuticulaires participent à la **formation** et à l'**intégrité des cuticules** des insectes (Cohen and Moussian, 2016; Cornman, 2010; Ionomidou et al., 2005). Elles jouent divers rôles, qui ont entre autre été démontrés grâce à l'approche ARN interférence (RNAi). Une mortalité accrue ainsi que différentes anomalies dans le développement ont été constatées suite à la diminution de l'expression de gènes cuticulaires chez *Tribolium castaneum* (Arakane et al., 2012; Jasrapuria et al., 2012). Trois CPAP1, cinq CPAP3 et deux RR-2 ont en effet été décrites comme essentielles pour la **morphogénèse des élytres**, la **mue**, la **locomotion** ou encore la **fécondité** de cet insecte. De plus, des expériences menées à plus large échelle (135 gènes cuticulaires ciblés par RNAi) ont permis de montrer que 32 gènes cuticulaires s'avéraient essentiels pour le développement de la cicadelle brune, *Nilaparvata lugens*, et/ou la production d'œufs (Pan et al., 2018). Des fonctions redondantes et complémentaires entre les gènes ont aussi été observées dans cette étude.

Les protéines cuticulaires pourraient être impliquées dans d'autres processus. Il a en effet été montré, par analyses transcriptomiques, puces à ADN ou encore PCR quantitative, que des gènes cuticulaires étaient surexprimés suite à de nombreuses agressions extérieures, telles que :

- **les insecticides**. Des gènes cuticulaires appartenant à la famille CPLCG sont surexprimés chez des souches d'*Anopheles Gambiae* et *Anopheles stephensi* (moustiques) résistantes au pyréthrinocide (Awolola et al., 2009; Vannini et al., 2014; Vontas et al., 2007).
- **les métaux lourds**. Une surexpression est induite lors d'un stress déclenché par une accumulation de cadmium chez l'arthropode du sol *Orchesella cincta* (collembole) (Roelofs et al., 2009).

- **la sécheresse.** Deux gènes cuticulaires sont également surexprimés sous stress hydrique chez l'espèce *Leptinotarsa decemlineata* (doryphore) (Zhang et al., 2008).

- **les pathogènes.** La protéine Tweedle BmCPT1 chez l'espèce *Bombyx mori* est induite en présence de la bactérie *Escherichia coli* (Liang et al., 2015).

Pour terminer, les protéines cuticulaires peuvent également être impliquées dans la transmission de certains virus de plante. Cet aspect sera développé dans la section 3.3.3 de l'introduction.

2.3.3. Les protéines cuticulaires qui composent l'acrostyle

Actuellement, 150 protéines cuticulaires ont été annotées chez l'espèce modèle *A. pisum*, dont la grande majorité appartient à la sous-famille des RR-2 (famille CPR). Très peu de données étaient disponibles avant ma thèse sur la composition protéique de l'acrostyle, des stylets et même des pièces buccales de n'importe quel autre arthropode.

En l'absence de données protéomiques et transcriptomiques, et d'une méthodologie adaptée à l'extraction de protéines cuticulaires de l'acrostyle, mon équipe avait commencé à développer une approche immunologique pour détecter et identifier les protéines *in situ*. Elle a produit une série d'anticorps dirigés contre des peptides de protéines cuticulaires et réalisé des immuno-marquages directement sur stylets maxillaires disséqués. Les premiers anticorps produits et testés étaient des anticorps génériques dirigés contre des motifs conservés dans le domaine de liaison à la chitine de protéines RR-2, comme les motifs **pepL** et **pepS** (Uzest et al., 2010; Webster et al., 2017). Ces peptides ont été détectés au niveau du canal commun enfouis dans la chitine et sont présents chez plusieurs protéines cuticulaires. De plus, lors de mon arrivée dans l'équipe d'accueil, des anticorps dirigés cette fois contre des peptides de protéines RR-1 avaient été utilisés et venaient de permettre l'identification des deux premières protéines dans l'acrostyle, nommées **Stylin-01** et **Stylin-02** (Webster et al., 201

3. Les interactions entre les pucerons et les virus

Les virus sont des parasites endocellulaires obligatoires et sont entièrement dépendants de la cellule qu'ils infectent. Ils doivent être capables d'entrer dans une cellule hôte, de s'y répliquer et de migrer vers une autre cellule. Avant la mort de cet hôte, ils doivent impérativement infecter un nouvel organisme pour assurer leur « survie ». Cette étape, appelée **transmission**, doit faire face chez les phytovirus à deux contraintes spécifiques : 1) les plantes sont des organismes immobiles, ce qui restreint les possibilités de transmission par contact direct d'hôte à hôte, 2) les cellules végétales sont entourées d'une paroi rigide pecto-cellulosique, barrière que les virus sont incapables de traverser de manière autonome. Bien que certains soient transmissibles par la graine ou par le pollen, d'autres par propagation végétative, par greffage ou encore par contact, l'immense majorité est (soit aussi, soit exclusivement) transmise par l'intermédiaire d'un organisme tiers, appelé **vecteur**.

3.1. La vexion des virus de plante

Différents organismes ont été décrits comme vecteurs de virus : des oomycètes (Adams, 1991), des protistes (Harris and Maramorosch, 1980), des nématodes du sol (Andret-Link et al., 2004; Taylor and Brown, 1997), des acariens (Slykhuis, 1965), des plantes parasites du genre *Cuscuta* (Mikona and Jelkmann, 2010), ou encore des insectes adaptés à un régime alimentaire de type « broyeur » qui transmettent quelques dizaines d'espèces virales (Hogehout et al., 2008). Les insectes « piqueurs-suceurs » (hémiptères et thysanoptères) sont néanmoins les vecteurs les plus importants, transmettant à eux seuls environ 60% des phytovirus connus (Francki, 1991; Ullman et al., 1992; Whitfield et al., 2015) et 30% en ce qui concerne les pucerons, les champions de la vexion (Brault et al., 2010).

Le processus de vexion comprend trois phases successives : la **phase d'acquisition** durant laquelle le vecteur prélève le virus sur une plante infectée, la **phase de latence** durant laquelle il est encore incapable de l'inoculer, et enfin la **phase d'inoculation** durant laquelle il transmet le virus à une plante saine. La **période de rétention** correspond quant à elle à la période durant laquelle le vecteur reste infectieux.

3.2. Les différents modes de transmission

La classification des modes de transmission des virus de plante n'a cessé d'évoluer. La première était fondée sur des critères « quantitatifs » : les durées des périodes d'acquisition, de latence, d'inoculation et enfin de rétention (Watson and Roberts, 1939). Elle a permis de distinguer le mode « non persistant » et le mode « persistant ». D'autres travaux ont fait évoluer cette classification par la découverte d'un troisième mode intermédiaire dit « semi persistant » (Sylvester, 1954). Peu à peu, elle a ensuite cédé sa place à des critères « qualitatifs » décrivant les interactions entre le virus et son vecteur (Kennedy et al, 1962 ; Harris, 1977).

On peut ainsi diviser les stratégies de transmission en deux grandes catégories : la **transmission circulante** (regroupant la transmission persistante) et la **transmission non circulante** (non persistante et semi persistante) (Fig. 8).

3.2.1. La transmission circulante

La transmission est dite circulante lorsque les virus effectuent un passage par l'intérieur du corps de l'insecte avant d'être inoculés. Les virus sont généralement restreints au niveau du phloème où ils sont ingérés via le tractus alimentaire. Ils traversent ensuite les cellules du **tube digestif** au niveau de points d'entrée qui varient en fonction de l'espèce virale (intestin moyen et/ou postérieur). Ils sont alors libérés dans l'hémolymphe où ils transitent jusqu'aux **glandes salivaires**, principales ou accessoires, dont ils traversent la barrière cellulaire, avant d'être inoculés à la plante lors des repas suivants, au moment de la salivation. Les virus doivent donc franchir la barrière intestinale et la barrière des glandes salivaires pour être efficacement transmis par le vecteur (Brault et al., 2010).

Les temps d'acquisition sont relativement longs (de quelques minutes à plusieurs heures ou jours), et une période de latence est nécessaire après acquisition et avant transmission du virus (temps nécessaire au virus pour atteindre les glandes salivaires et donc se retrouver dans la salive). Une fois acquis, ces virus persistent dans l'insecte tout au long de sa vie (Nault, 1997).

Les virus circulants se subdivisent en deux catégories, ceux qui se répliquent dans leur vecteur (virus circulants **multipliants**) et ceux qui ne le font pas (virus circulants **non multipliants**). Les virus de la première catégorie peuvent se multiplier dans différents tissus lors du passage de l'intestin aux glandes salivaires (Blanc et al., 2014). Elle inclut des virus des genres *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, et *Oryzavirus* (*Reoviridae*), *Rhabdovirus* (*Rhabdoviridae*), *Tospovirus* (*Bunyaviridae*), *Tenuivirus* (*Phenuyviridae*) et *Marafivirus* (*Tymoviridae*), tandis que le mode de transmission circulant non multipliant concerne les familles *Luteoviridae*, *Geminiviridae* et *Nanoviridae* (Ammar et al., 2009; Blanc et al., 2014; Hogenhout et al., 2008).

3.2.2. La transmission non circulante

La transmission est dite non circulante lorsque les virus sont retenus au niveau de la cuticule des pièces buccales des vecteurs. La majorité d'entre eux sont localisés au niveau des stylets (**stylet-borne viruses**) bien que certains, transmis de manière semi persistante, aient été retrouvés sur la face interne de l'œsophage (**foregut-borne viruses**) (Murant et al, 1976; Blanc et al., 2014; Ng and Zhou, 2015; Whitfield et al., 2015, Killini et al, 2016). Le temps minimal d'acquisition du virus par le vecteur est réduit (quelques secondes à quelques minutes pour les non persistants, et quelques minutes à quelques heures pour les semi persistants) (Harris, 1977). Il n'y a pas de phase de latence, c'est-à-dire que le vecteur peut transmettre le virus immédiatement après son acquisition.

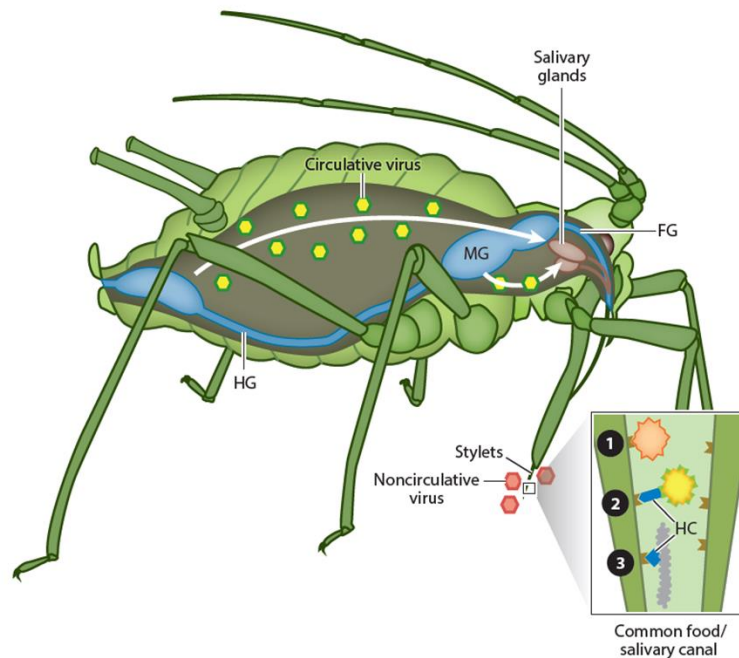


Figure 8. Modèle des deux modes de transmission des virus de plante

Les flèches blanches représentent le trajet des virus circulants (hexagones jaunes) dans le corps du puceron, à travers l'épithélium intestinal (en bleu), dans l'hémolymphe, et jusqu'aux glandes salivaires (en marron). Les virus non circulants (particules rouges, jaunes et grises) se lient sur des récepteurs à la pointe des stylets de l'insecte (encart dans le coin inférieur). Certains virus emploient une stratégie capsidique (genre *Cucumovirus* par exemple, représenté ici en rouge) et se lient directement au récepteur via un domaine de la protéine de capsidique (1). D'autres utilisent la stratégie *helper* : la liaison virus-récepteur est permise par l'intermédiaire d'une protéine supplémentaire appelée facteur assistant (HC – *helper component*, en bleu). Les cas les plus connus sont les genres *Caulimovirus* (en jaune) avec la protéine P2 (2), et *Potyvirus* (en gris) avec HC-Pro (3).

FG : *foregut* (oesophage), HG : *hindgut* (intestin postérieur), MG : *midgut* (intestin moyen).

D'après Blanc et al. (2014)

Enfin, le virus est perdu lors de la mue, et la période de rétention dans le vecteur est courte (quelques secondes à quelques minutes pour les non persistants, quelques minutes à quelques heures pour les semi persistants) (Brault et al., 2010).

Les virus des plantes sont majoritairement transmis selon ce mode, et environ 85% d'entre eux sont transmis par pucerons (Hogenhout et al., 2008).

Deux « stratégies » d'interaction moléculaire entre le virus et le vecteur sont décrites pour ce mode. La première est la **stratégie capsid**, c'est-à-dire que la particule virale (le virion) se lie directement à la cuticule du puceron (**Fig. 8**). Les virus à stratégie capsid concernent le genre *Cucumovirus* (*Bromoviridae*), dont le *Cucumber mosaic virus* (CMV) pour lequel la stratégie a été la mieux décrite, ainsi que les genres *Alfavirus* (*Bromoviridae*), *Carlavirus* (*Betaflexiviridae*) ou encore *Crinivirus* (*Closteroviridae*) (Uzest and Blanc, 2016).

La seconde est la stratégie facteur assistant **ou stratégie helper**, qui signifie qu'une protéine virale non-structurale, appelée « facteur assistant de la transmission », fait le lien entre la particule virale et le vecteur (Pirone and Blanc, 1996). Les genres *Caulimovirus* (*Caulimoviridae*) et *Potyvirus* (*Potyviridae*) sont les genres pour lesquels la stratégie facteur assistant a été la mieux décrite. Chez les caulimovirus, le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), le virus modèle, est transmis sous la forme d'un complexe composé des protéines P2, P3 et de la particule virale, P2 jouant le rôle du facteur assistant (Uzest et al., 2011). Chez les potyvirus, ce facteur correspond à la protéine HC-Pro (*helper component protease*) (Govier et al., 1977).

3.3. Identification et caractérisation des récepteurs de virus chez les pucerons

Cette section regroupe les études qui ont porté sur la recherche de candidats récepteurs de virus circulants et non circulants chez le puceron. Elle ne traite pas des autres candidats mis en évidence chez les autres hémiptères.

3.3.1. Récepteurs de virus circulants

Aucune protéine de puceron n'a pu être reliée de façon certaine à la transmission d'un virus multipliant. Concernant les virus non multipliant, la recherche de récepteurs a majoritairement concerné les lutéovirus. Les déterminants viraux impliqués dans la transmission sont la **protéine majeure de capsid CP** (*coat protein*) et la **protéine mineure RT** (*readthrough protein*). La RT est en fait une protéine de fusion comprenant la séquence de la CP en N-terminal, suivie en C-terminal d'une séquence exprimée par translecture. Elle porte dans sa partie centrale les déterminants moléculaires impliqués dans la transmission (Brault et al., 2007; Gray and Gildow, 2003). Ces protéines interagiraient avec des sites récepteurs à la surface des cellules du puceron, au niveau de la barrière intestinale ou des glandes salivaires pour permettre le mécanisme de transcytose (passage par endocytose-exocytose).

Plusieurs protéines du puceron, capables de se lier *in vitro* à des lutéovirus, ont été rapportées, mais leur rôle dans la transmission n'a pas encore été validé et des expériences complémentaires sont nécessaires (Bouvaine et al., 2011; Cilia et al., 2011; Seddas et al., 2004; Yang et al., 2008).

Seules deux protéines ont clairement été démontrées comme impliquées. La première est la protéine membranaire **APN (alanyl aminopeptidase N)**. Cette protéine pourrait interagir avec la protéine de capsid du *Pea enation mosaic virus* (PEMV), au niveau de l'intestin du puceron du pois *A. pisum*. Une première étude avait initialement permis de démontrer, via des expériences de phages display, que le peptide GBP3.1 était capable de se lier à l'intestin du puceron, et qu'il bloquait l'entrée du PEMV. En effet, la quantité de particules virales diminuait dans l'hémolymphe de pucerons qui s'alimentaient sur des plantes infectées par le virus, lorsqu'ils avaient préalablement ingéré ce peptide (Liu et al., 2010). Étonnamment, ce peptide était prédit pour avoir une structure proche de la capsid du virus. Ensuite, une seconde étude a permis de démontrer que ce même peptide interagissait *in vitro* précisément avec la protéine APN (Chougule et al., 2013). Enfin, dans une dernière étude, les auteurs ont identifié une interaction entre la capsid du PEMV et APN et ont pu observer que l'expression d'APN dans des cellules Sf9 de lépidoptère permettait l'internalisation du virus (Linz et al., 2015).

La seconde protéine est la protéine **Ephrine** (*membrane-bound Ephrine receptor*) identifiée par l'équipe Virologie-Vection de l'INRA de Colmar (Mulot et al., 2018). Ce candidat a été identifié grâce au criblage d'une banque de glandes salivaires du puceron *M. persicae* dans le système double-hybride en levure, face aux protéines structurales du CABYV (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*) et du TuYV (*Turnip yellows virus*). Les auteurs ont démontré que le TuYV, le CABYV et le *Beet mild yellowing virus* (BMV) s'accumulaient moins chez les pucerons pour lesquels les transcrits *Eph* étaient diminués par RNAi, suggérant un mécanisme commun d'internalisation de ces virus au niveau de la barrière intestinale. Cette diminution a directement été corrélée à une réduction du taux de transmission du TuYV mais pas du CABYV, ni du BMV. D'autres expériences sont donc nécessaires pour évaluer le rôle de cette protéine dans la transmission de ces deux polérovirus.

3.3.2. Récepteurs de virus non circulants

En ce qui concerne les virus retenus au niveau de l'œsophage (*foregut-borne viruses*), une seule étude a recherché l'existence d'un récepteur et celui-ci ne serait pas de nature protéique (Killiny et al., 2016). Les auteurs ont en effet démontré qu'un traitement des pièces buccales avec de la chitinase, ainsi que des tests de compétition avec différents sucres, réduisaient fortement l'accrochage du *Citrus tristeza virus* (CTV, *Closterovirus*) sur l'œsophage de l'espèce vectrice *Toxoptera citricida*. L'ensemble des résultats suggérait que le virus pouvait s'accrocher sur des résidus de la chitine.

Les virus retenus dans les stylets (*stylet-borne viruses*) sont ceux qui nous intéressent dans le cadre de ma thèse puisqu'ils sont susceptibles de s'accrocher au niveau de l'acrostyle, à la pointe des stylets maxillaires de pucerons. Leurs sites de liaison ont d'abord été recherchés chez les potyvirus et la microscopie électronique à transmission a été employée à différentes reprises, permettant de les localiser au niveau du **canal alimentaire** dans les stylets.

Des particules virales filamenteuses tapissant environ 20µm de la partie distale du canal alimentaire, et parfois un peu l'œsophage, ont en effet été observées pour la toute première fois chez des pucerons nourris sur plantes infectées par le *Tobacco Etch Virus* (TEV) (Taylor and Robertson, 1974) ou avec un mélange HC-Pro/virions pour le TEV et le *Tobacco Vein Mottling Virus* (TVMV) (Ammar, 1994). Ensuite, de la radioactivité a de nouveau été observée à cet endroit-là avec des pucerons nourris artificiellement sur un mélange de protéines HC-Pro et de particules radioactives de PVY ou TEV (Berger and Pirone, 1986). Enfin, des particules de PVY marquées avec des billes d'or ont été trouvées dans la partie distale du canal alimentaire dans plus de 80% des observations, tandis que ce marquage n'est plus observé lors de l'utilisation de HC-Pro inactives (Wang and Pirone, 1996). Une corrélation directe entre la localisation des virus au niveau des sites d'attachement et la transmission n'a néanmoins jamais été établie.

La première démonstration de l'existence d'un récepteur dans le canal commun a concerné le CaMV. Ces travaux ont démarré il y a une dizaine d'années dans l'équipe. Des incubations *in vitro* sur stylets disséqués avec la protéine virale P2 couplée à la GFP, ont mis en évidence une zone de rétention dans le canal commun, à l'extrémité des stylets maxillaires des espèces vectrices *A. pisum*, *M. persicae* et *B. brassicae* (Uzest et al., 2007). A l'inverse, P2 ne s'accroche pas sur les stylets d'une espèce non vectrice, *Acyrtosiphon lactucae*, sauf si les stylets ont été préalablement traités à la chitinase. Le récepteur est donc bien présent, mais trop profondément enfoui dans la chitine pour être accessible. Plus tard, une étude méticuleuse de l'ultrastructure du faisceau de stylets en microscopie électronique à transmission et à balayage, a permis d'observer que la protéine virale P2 s'accrochait en fait sur un organe bien délimité où la cuticule présente des propriétés différentes : l'acrostyle (Uzest et al., 2010). Par ailleurs, différents traitements ont été appliqués sur stylets avant incubation avec la protéine virale P2. Ils ont permis de montrer que les récepteurs du CaMV étaient de nature protéique puisque des pré-traitements à la protéinase K abolissaient la fixation de P2-GFP (Uzest et al., 2007).

Une approche gène candidat a alors été initiée et consistait dans un premier temps à déterminer si les protéines cuticulaires de la famille des CPR (majoritaires chez *A. pisum*) étaient localisées dans l'acrostyle. Comme présenté dans [la section 2.3.3 de l'introduction](#), des peptides conservés de protéines RR-2 ainsi que Stylin-01 et Stylin-02 ont été détectés (Uzest et al., 2010; Webster et al., 2017, 2018). Nous avons ensuite recherché les rôles de ces protéines dans la transmission des virus dans le cadre de ma thèse. Les résultats sont présentés dans le [chapitre 3](#) de ce manuscrit.

En parallèle, les rôles des protéines cuticulaires dans la transmission des virus de plante, à la fois circulants et non circulants ont émergé dans la littérature et dans ce contexte, j'ai co-écrit une revue présentée ci-après.

3.3.3. Article de revue : *Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses*

Cet article de revue porte sur le rôle des protéines cuticulaires dans la transmission des virus de plante, qu'ils soient circulants ou non circulants. Elle traite du puceron mais aussi des autres insectes vecteurs.

Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses

Maëlle Deshoux, Baptiste Monsion¹ and Marilyne Uzest



Many viruses of agricultural importance are transmitted to host plants via insect vectors. Characterizing virus–vector interactions at the molecular level is essential if we are to fully understand the transmission mechanisms involved and develop new strategies to control viral spread. Hitherto, insect proteins involved in virus transmission have been characterized only poorly. Recent advances in this topic, however, have significantly filled this knowledge gap. Among the vector molecules identified, cuticular proteins have emerged as key molecules for plant virus transmission, regardless of transmission mode or vector considered. Here, we review recent evidence highlighting that the CPR family, and particularly RR-1 proteins, undoubtedly deserves special attention.

Address

BGPI, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

Corresponding author: Uzest, Marilyne (marilyne.uzest@inra.fr)

¹ Current address: UMR1161 Virologie, INRA-ANSES-ENVA, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France.

Current Opinion in Virology 2018, **33**:137–143

This review comes from a themed issue on **Virus–vector interactions**

Edited by **Anna E Whitfield** and **Ralf Dietzgen**

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.015>

1879-6257/© 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

To ensure sustainability in the environment, phytoviruses must overcome two major constraints: their hosts are immobile, and the plant cell wall represents a physical barrier that viruses have to cross before they can replicate and spread in plant tissues. Most plant viruses are transmitted horizontally and re-transported by plant-feeding organisms (vectors) that are able to move from plant to plant [1,2]. The most frequent vectors of plant viruses are hemipteran and thysanopteran insects with piercing-sucking mouthparts, including aphids, whiteflies, leafhoppers, planthoppers, and thrips [2]. Virus–vector interactions, which are sophisticated and highly specific [3], can be classified into two main categories (for a review see [4]). Noncirculative viruses are reversibly attached to the cuticle of the insect mouthparts, in the stylets or foregut

of their vectors [4–6], during their journey from one plant to another. Circulative viruses are ‘internalized’ in the vector body, and must cross the gut barrier to reach the hemolymph and/or other tissues. Ultimately, viruses reach the salivary glands, and are injected, together with vector saliva, into new host plants. A few virus species have been shown to replicate within their vectors during their journey and have been classified in the circulative propagative subcategory [7]. Numerous studies have focused on elucidating the mechanisms underlying vector transmission [3,5,6,8], and viral determinants have been well characterized for most plant virus species studied. These include structural proteins, membrane viral glycoproteins, or non-structural virus-encoded proteins [4,9,10]. However, an extensive study of virus–vector interactions at the molecular level is still challenged by the difficulty of identifying vector partners and validating their role in virus transmission [11^{••},12^{••},13^{••},14^{••},15^{••}].

Nonetheless, considerable efforts have been made to develop complementary approaches and high-throughput methods to help identify vector proteins involved in virus–vector interactions. Among these interacting molecules are several cuticular proteins (CuPs) [13^{••},15^{••},16,17,18^{••},19–26]. CuPs are chitin-binding proteins that contribute to cuticle structural integrity, and reflect its diversity and mechanical properties [27–29]. CuPs have been classified into 14 families [30[•],31,32], the most abundant by far being the CPR family comprising proteins with a Rebers and Riddiford (RR) consensus [33]. The RR family is divided into three subfamilies, RR-1, RR-2, RR-3 [30[•]], to which most identified virus-interacting proteins can be assigned (Table 1). Their role as a key partner of both noncirculative and circulative plant viruses was hitherto unforeseen. Here, we review striking advances in the characterization of CuP–virus interactions that have brought novel insights to the field of vector transmission of plant viruses.

Role of cuticular proteins in noncirculative plant virus transmission

Noncirculative viruses bind reversibly to specific retention sites on the cuticle of the feeding apparatus. Therefore, virus-interacting molecules should be cuticular compounds that fulfill the role of virus receptors. To date, receptors of foregut-borne viruses have been poorly characterized [34,35], and no CuP has been shown to be involved in their retention or transmission. The great majority of noncirculative viruses, among which are members of the families *Potyviridae*, *Bromoviridae* and

Table 1

Cuticular proteins (CuPs) identified in the virus–insect vector interaction studies presented in this review

Virus species/genus	Vector – species	Transmission mode	CuPs identifier ^a – other name	Protein family ^b (subfamily)	Approaches	Reference
ZYMV/ <i>Potyvirus</i>	Aphid – <i>M. persicae</i>	Noncirculative	AAO63549	CPR (RR-2)	Urea extraction of aphid CuPs, 1-D & 2-D gel electrophoresis, Far-western blot, MS analyses	[17]
			AAL29466 AAZ20451 AAZ20447	CPR (RR-2) CPR (RR-1) CPR (RR-2)		
CaMV/ <i>Caulimovirus</i>	Aphid	Noncirculative	ND	ND	Biochemical characterization, Stylet immunolabeling	[40*]
CaMV/ <i>Caulimovirus</i>	Aphid – <i>A. pisum</i> , <i>M. persicae</i>	Noncirculative	MG188739 – <i>Stylin-01</i>	CPR (RR-1)	Stylet immunolabeling, Colocalization, <i>in vitro</i> competition assays, RNAi	[15**]
			MG188741 – <i>Stylin-01</i>	CPR (RR-1)		
CMV/ <i>Cucumovirus</i>	Aphid – <i>M. persicae</i>	Noncirculative	DQ108938 – <i>Mpcp4</i>	CPR (RR-1)	YTH	[22]
CMV/ <i>Cucumovirus</i>	Aphid – <i>A. pisum</i>	Noncirculative	ND	CPR (RR-2)	Peptide array (RR-2 proteins)	[25]
TuYV ^c / <i>Polerovirus</i>	Aphid – <i>M. persicae</i>	Circulative	ND ^d	ND	Whole cell lysate (aphids), 1-D & 2-D gel electrophoresis, Far-western blot & MS analyses	[16]
CYDV-RPV/ <i>Polerovirus</i>	Aphid – <i>S. graminum</i>	Circulative	gi:193647865	CPR (RR-2)	Genetics coupled to 2-D-DIGE & MS analyses	[18**]
			gi:193706873 gi:193647875 gi:193582403	ND ^d CPR (RR-2) CPR (RR-2)		
BYDV-GPV/ <i>Luteoviridae</i> ^e	Aphid – <i>R. padi</i>	Circulative	gi:288558725 – <i>Cp62 precursor</i>	CPR (RR-2)	iTRAQ & MS analyses	[20]
			NP_001156154.1 – <i>Cp5 precursor</i>	CPR (RR-2)		
RSV/ <i>Tenuivirus</i>	Planthopper – <i>L. striatellus</i>	Circulative-Propagative	KC485263 – <i>CPR1</i>	CPR (RR-1)	YTH, Chemiluminescent co-IP, Colocalization, GST pull-down, RNAi	[13**]
RSV/ <i>Tenuivirus</i>	Planthopper – <i>L. striatellus</i>	Circulative-Propagative	XM_014390248.1 – <i>Cuticle protein A3A like</i>	CPR (RR-2)	YTH	[26]
			JAS02196.1	Tweedle		

^a Given accession numbers from original studies.

^b Classified using CutProtFam-Pred (<http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/>).

^c Formerly BWYV-FL1 (beet western yellows virus).

^d published accession number does not correspond to a CuP according to databases and CutProtFam-Pred.

^e Unassigned member in the family Luteoviridae. CuP: cuticular protein; ND: not determined; MS: mass spectrometry; RNAi: RNA interference; DIGE: difference gel electrophoresis; iTRAQ: isobaric tags for relative and absolute quantification; co-IP: co-immunoprecipitation; YTH: yeast two-hybrid. ZYMV: zucchini mosaic virus; CaMV: cauliflower mosaic virus; CMV: cucumber mosaic virus; TuYV: turnip yellows virus; CYDV: cereal yellow dwarf virus; BYDV: barley yellow dwarf virus, RSV: rice stripe virus.

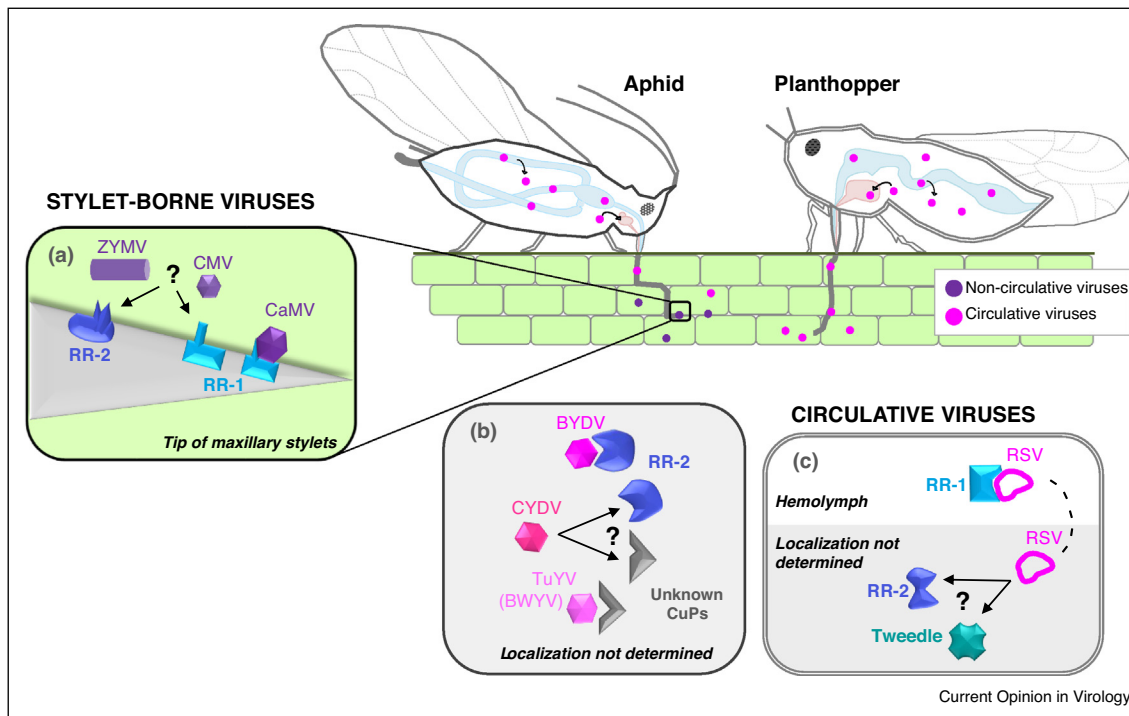
Caulimoviridae, is retained in the stylets [36–38], whose composition is poorly characterized [39]. Using *in vitro* interaction assays on dissected stylets, Uzest *et al.* [38] demonstrated that the receptor of the cauliflower mosaic virus (CaMV) was a CuP located at the fused food/salivary common canal of aphid maxillary stylets, on the acrostyle — an organ discovered later [40*] in an area described to harbor receptors of potyviruses and cucumoviruses [37,41]. However, binding to the acrostyle has been demonstrated only for a caulimovirus, and direct evidence of virus retention within the common canal is still lacking for other viruses.

Dombrovsky *et al.* [17] were the first to identify cuticular partners of a noncirculative virus, the zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) — a potyvirus that interacts with its aphid vectors through a viral-encoded protein (helper component, HC-Pro [42]). A far-western blot approach allowed detection of a few spots that specifically interacted with wt ZYMV-HC-Pro combinations, but not with a transmission-defective mutant. Out of nine spots micro-sequenced, four were identified as CuPs: one RR-1 and three RR-2 proteins (Table 1). At the time, it was not possible to ascertain the presence of any of these CuPs in

the stylets, nor to confirm the biological relevance of these results. However, since then, using immunodetection approaches, some peptides have been identified at the tip of maxillary stylets [15**,25,40*], among which the peptide PepS was found to be present in two CuPs identified in this study (AAO63549.1 and AAL29466.1), reinstating them as prime candidate receptors of ZYMV (Figure 1). Further investigations should determine if ZYMV is retained in the common canal, and evaluate the role of these RR-2 proteins in ZYMV transmission.

Two independent studies on cucumber mosaic virus (CMV) receptor candidates were published in 2017 [22,25]. This cucumovirus, transmitted by aphids, interacts directly with vector receptors through its coat protein [43,44]. In the first study, using a yeast-two-hybrid (YTH) system, Liang and Gao [22] reported interaction between the coat protein of CMV, and one of four reported *Myzus persicae* CuPs [45], the RR-1 protein Mpcp4 (Table 1, Figure 1). Whether this interaction in yeast reflects a true binding of CMV to Mpcp4 within vector stylets remains to be demonstrated, and the role of this protein in CMV transmission has not yet been assessed; however, the very recent identification of

Figure 1



Plant virus–cuticular protein (CuP) interactions. (a) Interaction of noncirculative viruses with cuticular proteins at the tip of aphid maxillary stylets: cauliflower mosaic virus (CaMV) with RR-1 protein via its helper protein P2 [15**], cucumber mosaic virus (CMV) with RR-1 and/or RR-2 proteins [22,25], zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) via its helper protein HC-Pro with RR-1 and/or RR-2 proteins [17]. (b) Interaction of barley yellow dwarf virus (BYDV), cereal yellow dwarf virus (CYDV) and turnip yellow virus (TuYV), three circulative viruses, with RR-2 and/or unknown cuticular proteins within their aphid-vector body [16,18**,20]. (c) The nucleocapsid protein of the circulative rice stripe virus (RSV) binds an RR-1 protein in the hemolymph of its planthopper vector [13**], and may also interact with another RR-2 and a Tweedle cuticular protein [26].

Mcp4 in the acrostyle (named Stylin-01 by Webster and co-workers [15**], see below) supports this CuP as a CMV receptor candidate. In the second study, a peptide array approach, based on results showing the presence of RR-2 proteins in the acrostyle [40*], was developed to characterize CuP-virus interactions [25]. Two consensus sequences were deduced from the pattern of hybridization of CMV onto the array, one within the RR-2 chitin-binding domain, the other being a sequence frequently found in RR-2 proteins, likely exposed on the acrostyle surface [25]. These two studies revealed that CMV interacts with both RR-1 proteins in yeast, and with RR-2 peptides *in vitro* (Table 1, Figure 1). As these two types of CuPs are part of the acrostyle [15**], we hypothesize that they both play a role in virus retention. However, as already mentioned for ZYMV, binding of CMV in the common canal lacks direct evidence [37], and additional biochemical and functional validation are needed to determine the role of these CuPs in CMV transmission.

A recent study has made great strides towards noncirculative virus receptor identification [15**]. By immunolabeling with a series of antibodies specific to annotated CuPs from the CPR family, two highly homologous RR-1 proteins, Stylin-01 and Stylin-02, were detected at the tip of aphid stylets [15**]. A peptide corresponding to the C-terminus of Stylin-01 and Stylin-02 was shown to evenly cover the surface of the acrostyle, and to overlap with CaMV retention sites. Two series of experiments support Stylin-01 as a receptor candidate for CaMV (Table 1, Figure 1): firstly, CaMV helper protein P2 and the antibody targeting the surface-exposed peptide compete for binding to the acrostyle, and secondly, silencing Stylin-01 in the vector species *M. persicae* via RNA-mediated interference resulted in a 40% decrease in CaMV transmission efficiency.

To date, the only CuPs identified in insect stylets are proteins from the CPR family [15**,25,40*]. Both RR-1 and RR-2 proteins have been detected at the tip of maxillary stylets, displaying domains at the interface in direct contact with contaminated phloem sap. And both are involved in virus–vector interactions. One of the RR-1 proteins is already clearly involved in CaMV transmission, and some results suggest that it might also be important for the transmission of cucumoviruses. However, current knowledge does not distinguish if only a single CPR protein is required for binding all noncirculative viruses, which includes hundreds of virus species, or if several CuPs can act as receptors of noncirculative viruses within insect stylets.

Role of cuticular proteins in circulative plant virus transmission

Since circulative transmission entails crossing several vector tissues and travelling within the insect body, various vector molecules are likely to interact with

circulative viruses throughout their journey to, firstly, promote virus entry into, and release from, insect tissues, secondly, facilitate virus movement, thirdly, protect viruses from degradation within the insect hemolymph, and lastly, play a role in virus replication in the case of propagative viruses. In addition to classical methods such as YTH screenings, current attempts to characterize insect partners of circulative viruses often rely on the development of high-throughput approaches such as proteomic and transcriptomic analyses able to detect changes in protein abundance or genes differentially expressed between viruliferous or healthy insects. Generally, these studies generate listings with many protein candidates, including some CuPs [13**,18**,19–21,23,26,46–48]. These listings are important resources of potential virus putative partners. However, the major issue will be to confirm virus–CuP interactions and to validate the role of these candidates in virus transmission.

In a pioneering study, Seddas *et al.* [16] searched for aphid proteins that interact with a polerovirus, the beet western yellows virus (BWYV, currently known as turnip yellows virus or TuYV [49]), and that could be involved in virus transmission. Using wt viruses or derived non-transmissible mutants as overlays, a few aphid proteins of *M. persicae* were revealed by far-western blot analyses, and a CuP of 33 kDa was identified from 2-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analysis (Table 1). This CuP was shown to interact strongly with wt BWYV, but not with the mutant lacking the readthrough (RT) domain, suggesting an interaction through the RT protein (Figure 1)—a protein strictly required for aphid transmission [50] and shown to play a role in virus movement [51]. At that time, as it was unexpected to find an interaction between a circulative virus and a CuP, the authors concluded that this aphid protein might not play a role in the BWYV transmission mechanism. However, a plausible involvement of CuPs in polerovirus translocation in the gut was later suggested with the identification of several aphid CuPs that correlated with a transmission efficient phenotype and cereal yellow dwarf virus-RPV (CYDV-RPV) movement through the insect gut [18**]. Amongst the aphid proteins predicted to facilitate virus entry at the gut barrier, two CuPs were detected: one RR-2 and CPG12 (gi:193647865 and gi:193706873, respectively) (Table 1, Figure 1). Additionally, two other RR-2 CuPs (gi:193647875, gi:193582403) were upregulated both in competent and hindgut-refractive genotypes (Table 1), precluding any clear conclusion on their role in virus translocation [18**]. In a third recent study [20], interactions between barley yellow dwarf virus BYDV-GPV, a member of the *Luteoviridae* family, and CuPs from its aphid vector *Rhopalosiphum padi* were also reported. The two insect partners, which are RR-2 proteins, were identified using two approaches: firstly, differential proteomics analyses between healthy and viruliferous *R. padi* (Table 1, Figure 1), and secondly, YTH using viral RT

protein as bait (Table 1, Figure 1). Interestingly, this second RR-2 protein, called *cuticular protein 5 precursor*, is highly homologous with CYDV-RPV partners (gi:193582403, gi:193647865, [18**]). Although additional experiments are required to determine whether CuPs play a role in luteovirids transmission by facilitating virus entry at the gut level or at another step of the transmission process, taken together, these results stress the importance of characterizing luteovirids–CuPs interactions in future work.

A role for a CuP in circulative virus transmission was formally demonstrated for rice stripe virus (RSV) [13**]—a tenuivirus transmitted mostly by the planthopper *Laodelphax striatellus* in a propagative manner [52]. The authors provided the only direct experimental evidence thus far of an interaction between a CuP and a circulative virus within an insect vector. CPR1, an RR-1 protein, was identified by YTH screening of a cDNA library using the viral nucleocapsid protein pc3 (N) as bait (Table 1). A strong interaction between CPR1 and pc3 proteins was confirmed *in vivo* by a co-immunoprecipitation assay. Moreover, the two proteins co-localized in insect cell culture, and in hemocytes isolated from the hemolymph of viruliferous insects (Figure 1), whereas silencing CPR1 in *L. striatellus* resulted in a 57% decrease in RSV transmission capacity. The authors proposed that CPR1 could bind virus particles in the hemolymph and hence assist viral movement towards the salivary glands [13**]. Two additional CuPs were shown to interact with RSV nucleocapsid protein N (pc3) in another, YTH-independent, screening [26]. These CuPs belong to the CPR (RR-2) and Tweedle protein families. It will be interesting to determine if RSV can interact with several CuPs within its vector, and if several CuPs are required for successful transmission. However, interactions of these novel candidates have not been confirmed in the vector, and their role in RSV transmission remain to be investigated thoroughly [26].

Role of cuticular proteins in arbovirus transmission

Interestingly, CuPs have also been reported to potentially interact with arboviruses, but the precise role of CuPs in arboviruses infection is not well documented. A deregulation of CuP gene expression in insects upon infection with animal viruses has been reported [53,54**,55]. In a more extended study, Colpitts *et al.* [54**] characterized a mosquito-borne flavivirus–CuP interaction. The authors investigated the role of a RR-2 pupal CuP, whose transcripts were downregulated in *Aedes aegypti* pupae upon infection by West Nile (WNV), dengue (DENV) or yellow fever (YFV) viruses. Overexpression of this CuP gene in mosquito cells or in live mosquitoes inhibited WNV infection. Furthermore, this pupal CuP interacted with the envelope of WNV, DENV and the capsid of YFV, which might impede viral entry to host cells. More

importantly, pre-incubation of WNV with pupal CuP prevented lethal WNV encephalitis in mice. This work highlights once again the key role of a CuP from the CPR family in virus transmission through a direct virus–vector interaction. However, in contrast to vectored plant viruses for which CuPs have been shown to promote virus transmission, chitin-binding proteins were instead proposed to protect the insect from viral infection by preventing virus–receptor interactions, or by strengthening natural barriers to pathogen infection.

Conclusions

Cuticular proteins now feature prominently on the short-list of insect molecules demonstrated to play a key role in plant virus transmission [12**,13**,14**,15**]. Recent literature has revealed that CuPs—the most obvious candidates as receptors for noncirculative viruses—also interact with plant circulative viruses. Current knowledge indicates that insect CuPs may facilitate their entry at the gut level, and assist virus particles in the hemolymph.

Almost all the CuPs identified so far in plant virus–vector interaction studies belong to the large CPR family. More precisely, while the role of RR-2 proteins in virus transmission remains to be determined, RR-1 proteins are definitely associated with circulative and noncirculative virus transmission. Future research should help define whether additional CuPs also participate in the transmission process.

The data presented in this review highlight the interest in strengthening further efforts to characterize insect CuPs and their interactions with plant viruses. In the future, we can count on growing interest from virologists to characterize CuPs, as novel candidates in the search for innovative viral control strategies.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

We are grateful to Helen Rothnie for English editing of the manuscript. MU is funded by the French National Institute for Agricultural Research (INRA), MD is funded by French National Research Agency (grant ANR15-CE20-0011), BM is funded by the Bill & Melinda Gates Foundation (grant OPP1130147).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as

- of special interest
- of outstanding interest

1. Thresh JM: **The long-range dispersal of plant viruses by arthropod vectors.** *Philos Trans R Soc Lond* 1983, **302**:497–528.
2. Bragard C, Caciagli P, Lemaire O, Lopez-Moya JJ, MacFarlane S, Peters D, Susi P, Torrance L: **Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission.** *Annu Rev Phytopathol* 2013, **51**:177–201.

3. Dietzgen RG, Mann KS, Johnson KN: **Plant virus–insect vector interactions: current and potential future research directions.** *Viruses* 2016, **8** pii:E303.
 4. Blanc S, Drucker M, Uzest M: **Localizing viruses in their insect vectors.** *Annu Rev Phytopathol* 2014, **52**:403-425.
 5. Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D: **Insect vector-mediated transmission of plant viruses.** *Virology* 2015, **479–480**:278-289.
 6. Ng JC, Zhou JS: **Insect vector–plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges.** *Curr Opin Virol* 2015, **15**:48-55.
 7. Hogenhout SA, Ammar el D, Whitfield AE, Redinbaugh MG: **Insect vector interactions with persistently transmitted viruses.** *Annu Rev Phytopathol* 2008, **46**:327-359.
 8. Jia D, Chen Q, Mao Q, Zhang X, Wu W, Chen H, Yu X, Wang Z, Wei T: **Vector mediated transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74.** *EMBO J* 1995, **14**:650-659.
 11. Liu S, Sivakumar S, Sparks WO, Miller WA, Bonning BC: **A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of Pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel.** *Virology* 2010, **401**:107-116.
- These papers identified the first virus receptor in a vector.
12. Linz LB, Liu S, Chougule NP, Bonning BC: **In vitro evidence supports membrane alanyl aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector.** *J Virol* 2015, **89**:11203-11212.
- See annotation to Ref [11**].
13. Liu W, Gray S, Huo Y, Li L, Wei T, Wang X: **Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein.** *Mol Cell Proteomics* 2015, **14**:2229-2242.
- First cuticular protein shown to interact with a circulative virus in its insect vector, and shown to play a key role in transmission.
14. Mulot M, Monsion B, Boissinot S, Rastegar M, Meyer S, Bochet N, Brault V: **Transmission of Turnip yellows virus by *Myzus persicae* is reduced by feeding aphids on double-stranded RNA targeting the ephrin receptor protein.** *Front Microbiol* 2018, **9**:457.
- This study identified an aphid protein involved in circulative virus transmission.
15. Webster CG, Pichon E, van Munster M, Monsion B, Deshoux M, Gargani D, Calevro F, Jimenez J, Moreno A, Krenz B *et al.*: **Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors.** *J Virol* 2018 <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00432-18>. pii: JVI.00432-18. [Epub ahead of print].
- First cuticular protein identified in aphid stylets, shown to play a key role in the transmission of a noncirculative virus, the CaMV.
16. Seddas P, Boissinot S, Strub JM, Van Dorsselaer A, Van Regenmortel MH, Pattus F: **Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid.** *Virology* 2004, **325**:399-412.
 17. Dombrovsky A, Gollop N, Chen S, Chejanovsky N, Raccach B: **In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*.** *J Gen Virol* 2007, **88**:1602-1610.
 18. Cilia M, Tamborindeguy C, Fish T, Howe K, Thannhauser TW, Gray S: **Genetics coupled to quantitative intact proteomics links heritable aphid and endosymbiont protein expression to circulative polerovirus transmission.** *J Virol* 2011, **85**:2148-2166.
- This study combines an original genetic approach to quantitative proteomics analyses to identify virus-vector interacting partners involved in circulative transmission.
19. Mar T, Liu W, Wang X: **Proteomic analysis of interaction between P7-1 of Southern rice black-streaked dwarf virus and the insect vector reveals diverse insect proteins involved in successful transmission.** *J Proteomics* 2014, **102**:83-97.
 20. Wang H, Wu K, Liu Y, Wu Y, Wang X: **Integrative proteomics to understand the transmission mechanism of Barley yellow dwarf virus-GPV by its insect vector *Rhopalosiphum padi*.** *Sci Rep* 2015, **5**:10971.
 21. Xu D, Zhong T, Feng W, Zhou G: **Tolerance and responsive gene expression of *Sogatella furcifera* under extreme temperature stresses are altered by its vectored plant virus.** *Sci Rep* 2016, **6**:31521.
 22. Liang Y, Gao XW: **The cuticle protein gene MPCP4 of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) plays a critical role in cucumber mosaic virus acquisition.** *J Econ Entomol* 2017, **110**:848-853.
 23. Schneeweis DJ, Whitfield AE, Rotenberg D: **Thrips developmental stage-specific transcriptome response to tomato spotted wilt virus during the virus infection cycle in *Frankliniella occidentalis*, the primary vector.** *Virology* 2017, **500**:226-237.
 24. Shrestha A, Champagne DE, Culbreath AK, Rotenberg D, Whitfield AE, Srinivasan R: **Transcriptome changes associated with Tomato spotted wilt virus infection in various life stages of its thrips vector, *Frankliniella fusca* (Hinds).** *J Gen Virol* 2017, **98**:2156-2170.
 25. Webster CG, Thillier M, Piroles E, Cayrol B, Blanc S, Uzest M: **Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions.** *Insect Sci* 2017, **24**:990-1002.
 26. Li S, Li X, Zhou Y: **Ribosomal protein L18 is an essential factor that promote rice stripe virus accumulation in small brown planthopper.** *Virus Res* 2018, **247**:15-20.
 27. Willis JH: **Cuticular proteins: the neglected component.** *Arch Insect Biochem Physiol* 1987, **6**:203-215.
 28. Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P: **Insect cuticular proteins.** *Insect Biochem Mol Biol* 1995, **25**:153-176.
 29. Willis JH: **Cuticular proteins in insects and crustaceans.** *Am Zool* 1999, **39**:600-609.
 30. Willis JH: **Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era.** *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**:189-204.
- Comprehensive review on cuticular proteins of arthropods.
31. Ioannidou ZS, Theodoropoulou MC, Papandreou NC, Willis JH, Hamodrakas SJ: **CutProtFam-Pred: detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile hidden Markov models.** *Insect Biochem Mol Biol* 2014, **52**:51-59.
 32. Pan PL, Ye YX, Lou YH, Lu JB, Cheng C, Shen Y, Moussian B, Zhang CX: **A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018, **115**:5175-5180.
 33. Rebers JE, Riddiford LM: **Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes.** *J Mol Biol* 1988, **203**:411-423.
 34. Chen AY, Walker GP, Carter D, Ng JC: **A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:16777-16782.
 35. Killiny N, Harper SJ, Alfaress S, El Mohtar C, Dawson WO: **Minor coat and heat shock proteins are involved in the binding of citrus tristeza virus to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*.** *Appl Environ Microbiol* 2016, **82**:6294-6302.
 36. Wang RY, Ammar ED, Thornbury DW, Lopez-Moya JJ, Pirone TP: **Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets.** *J Gen Virol* 1996, **77**:861-867.
 37. Martin B, Collar JL, Tjallingii WF, Fereres A: **Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses.** *J. Gen. Virol.* 1997, **78**:2701-2705.

38. Uzeit M, Gargani D, Drucker M, Hebrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S: **A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:17959-17964.
39. Parrish WB: **The origin, morphology, and innervation of aphid stylets (Homoptera)**. *Ann Entomol Soc Am* 1967, **60**:273-276.
40. Uzeit M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevielle C, Cot D, Blanc S:
 • **The “acrostyle”: a newly described anatomical structure in aphid stylets**. *Arthropod Struct Dev* 2010, **39**:221-229.
 This study reports the discovery of an organ in aphid stylets that harbors the receptor of CaMV and likely those of other a non-circulative virus.
41. Powell G: **Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses**. *J Gen Virol* 2005, **86**:469-472.
42. Gal-On A: **Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity – the tails of two proteins**. *Mol Plant Pathol* 2007, **8**:139-150.
43. Gera A, Loebenstein G, Raccach B: **Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission of *Aphis gossypii***. *Phytopathology* 1979, **69**:369-399.
44. Chen B, Francki RIB: **Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein**. *J Gen Virol* 1990, **71**:939-944.
45. Dombrovsky A, Sobolev I, Chejanovsky N, Raccach B: **Characterization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins from *Myzus persicae***. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007, **146**:256-264.
46. Brault V, Tanguy S, Reinbold C, Le Trionnaire G, Arneodo J, Jaubert-Possamai S, Guernec G, Tagu D: **Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum***. *J Gen Virol* 2010, **91**:802-808.
47. Badillo-Vargas IE, Rotenberg D, Schneeweis DJ, Hiromasa Y, Tomich JM, Whitfield AE: **Proteomic analysis of *Frankliniella occidentalis* and differentially expressed proteins in response to tomato spotted wilt virus infection**. *J Virol* 2012, **86**:8793-8809.
48. Kaur N, Chen W, Zheng Y, Hasegawa DK, Ling KS, Fei Z, Wintermantel WM: **Transcriptome analysis of the whitefly, *Bemisia tabaci* MEAM1 during feeding on tomato infected with the crinivirus, Tomato chlorosis virus, identifies a temporal shift in gene expression and differential regulation of novel orphan genes**. *BMC Genomics* 2017, **18**:370.
49. Stevens M, Freeman B, Liu HY, Herrbach E, Lemaire O: **Beet poleroviruses: close friends or distant relatives?** *Mol Plant Pathol* 2005, **6**:1-9.
50. Brault V, Uzeit M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S: **Aphids as transport devices for plant viruses**. *C R Biol* 2010, **333**:524-538.
51. Mutterer JD, Stussi-Garaud C, Michler P, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V: **Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii***. *J Gen Virol* 1999, **80**(Pt 10):2771-2778.
52. Falk BW, Tsai JH: **Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus***. *Annu Rev Phytopathol* 1998, **36**:139-163.
53. Sanders HR, Foy BD, Evans AM, Ross LS, Beaty BJ, Olson KE, Gill SS: **Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti***. *Insect Biochem Mol Biol* 2005, **35**:1293-1307.
54. Colpitts TM, Cox J, Vanlandingham DL, Feitosa FM, Cheng G, Kurscheid S, Wang P, Krishnan MN, Higgs S, Fikrig E: **Alterations in the *Aedes aegypti* transcriptome during infection with West Nile, dengue and yellow fever viruses**. *PLoS Pathog* 2011, **7**: e1002189.
 This paper demonstrates that a cuticular protein interacts with flavivirus-mosquito-borne viruses.
55. Behura SK, Gomez-Machorro C, Harker BW, deBruyn B, Lovin DD, Hemme RR, Mori A, Romero-Severson J, Severson DW: **Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection**. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**:e1385.

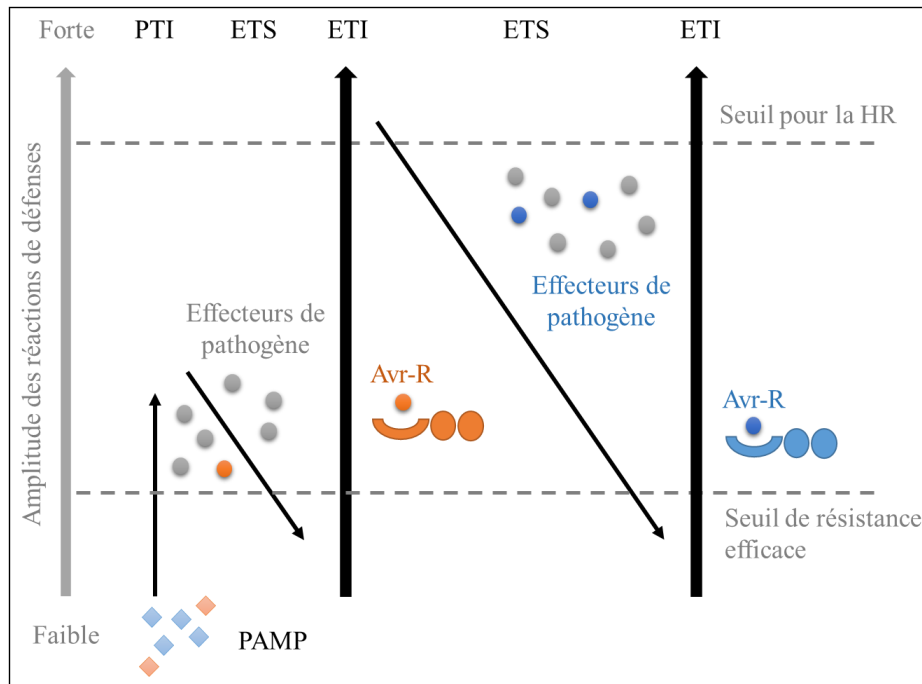


Figure 9. Modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plante-parasite

La plante reconnaît les PAMP délivrés par le bio-agresseur et déclenche ses réactions basales de défense. Cette phase est qualifiée de PTI. Certains pathogènes adaptés contournent la PTI via un panel d'effecteurs sécrétés qui déclenchent la deuxième phase : l'ETS. Les plantes possédant des protéines de résistance (R) reconnaissent un effecteur donné (alors qualifié de protéine d'avirulence) et déclenchent l'ETI. Dans certains cas, le bio-agresseur arrive à supprimer l'ETI et à rétablir l'ETS. Plusieurs cycles ETI/ETS se succèdent. La PTI et l'ETI se différencient principalement par l'amplitude des réponses déclenchées qui sont plus fortes et prolongées.

Avr-R : protéine d'avirulence, ETI : *Effector-triggered immunity*, ETS : *Effector-triggered susceptibility*, HR : réaction hypersensible, PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*, PTI : *Pattern-triggered immunity*.

Adaptée de Jones and Dangl (2006).

4. Les interactions entre les pucerons et les plantes

Les plantes sont exposées à de nombreuses attaques de différents organismes, notamment les bactéries, les virus, les nématodes, les insectes, les oomycètes ou encore les champignons. Face à ces agressions, un certain nombre de **défenses préformées** dites « passives », tels que des **barrières physiques** (les trichomes, les cires ou encore la paroi cellulaire) et **chimiques** (les composés antimicrobiens) constituent un rempart naturel et permettent de stopper certaines infections. Dans le cas où les bio-agresseurs contournent ces défenses préformées, les plantes déclenchent un ensemble de réactions de défense dont les mécanismes moléculaires pourraient s'organiser autour du **modèle de co-évolution en zig-zag** proposé par Jones et Dangl (Jones and Dangl, 2006).

Cette première section porte sur les interactions plante/bio-agresseur de manière très générale, puis les interactions plante/puceron sont décrites en détails dans les sections suivantes.

4.1. Le dialogue moléculaire entre une plante et un bio-agresseur

4.1.1. La PTI ou *Pattern-triggered immunity*

Il existe deux niveaux d'immunité selon le modèle Zig-Zag : la PTI (*Pattern-triggered immunity*) et l'ETI (*Effector-triggered immunity*) (Fig. 9).

Le premier niveau de l'immunité végétale est la PTI. Il s'agit de la résistance basale des plantes qui leur confère une protection non spécifique vis-à-vis d'une large gamme de parasites. Elle nécessite la reconnaissance de molécules appelées éliciteurs, qui peuvent avoir une origine microbienne ou bien provenir de la dégradation de la paroi cellulaire végétale causée par le bio-agresseur (Garcia-Brugger et al., 2006; Montesano et al., 2003). Les éliciteurs appartiennent à plusieurs familles chimiques (protéines, glycoprotéines, glycanes, lipides) et sont retrouvés dans la littérature sous différentes dénominations : **PAMP / DAMP / HAMP / MAMP** (pour *Pathogen/Damage/Herbivore/Microbe-associated molecular patterns*). Certains motifs de bactéries, comme flg22, un peptide de 22 acides aminés de la flagelline (Felix et al., 1999), ou encore la chitine des champignons (Felix et al., 1993) font partie des PAMP les mieux décrits.

Les PAMP sont reconnus via une interaction directe avec des récepteurs transmembranaires appelés **PRR** pour *Pattern-recognition receptor*. Ces PRR appartiennent à la classe des RLK (*Receptor like kinases*) ou RLP (*Receptor like proteins*) (Monaghan and Zipfel, 2012). Ils possèdent un domaine N-terminal interagissant avec le PAMP correspondant, un domaine transmembranaire et parfois un domaine C-terminal intra-cytoplasmique responsable de la transduction du signal. La partie N-terminale des PRR comporte généralement un motif conservé, parmi lesquels on peut citer le domaine LysM contenant des motifs lysine, ou le domaine LRR (*Leucine-rich repeat*) (Monaghan and Zipfel, 2012; Tör et al., 2009). Le couple PAMP/PRR le plus étudié est constitué du peptide flg22 et du récepteur FLS2 (*Flagelline sensitive 2*) chez *A. thaliana* (Boller and Felix, 2009).

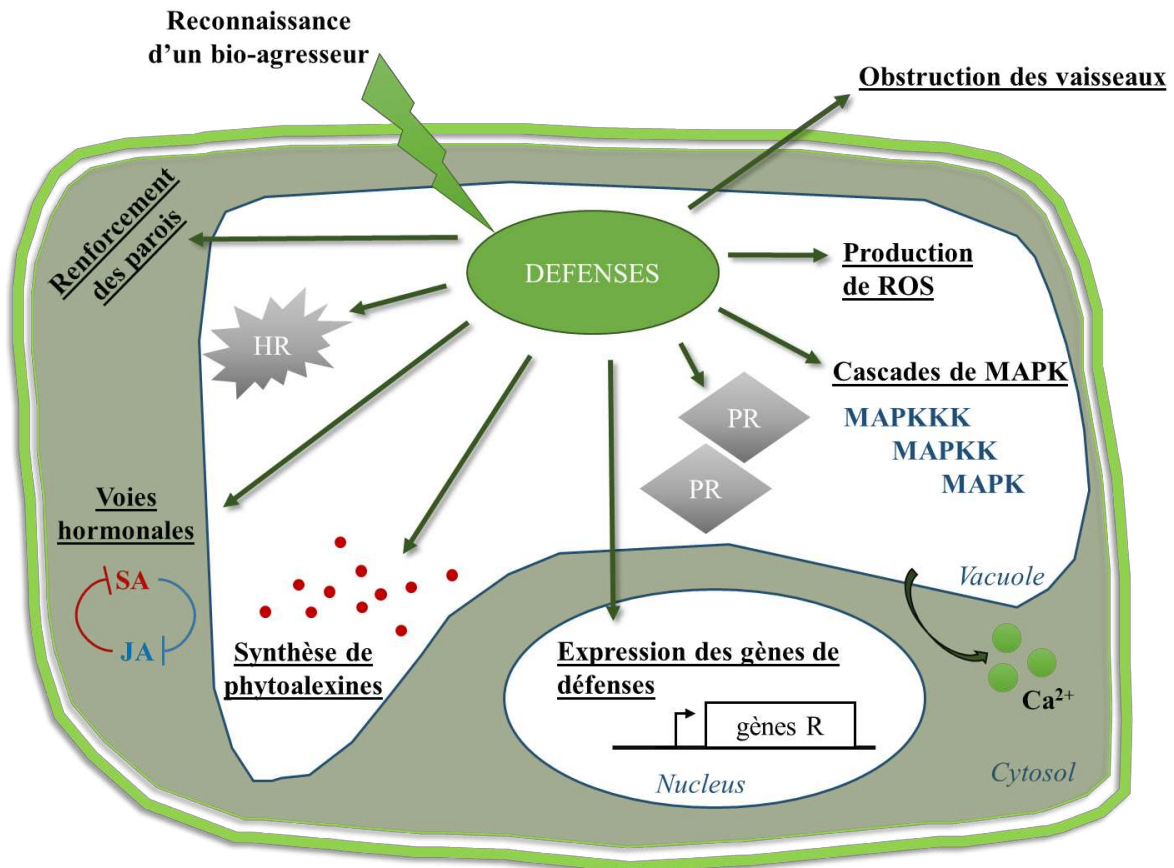


Figure 10. Induction des voies de défense de la plante suite à une attaque par un bio-agresseur

Suite à la reconnaissance d'un bio-agresseur, les plantes mettent en place différents mécanismes de défenses. Le renforcement de la paroi et l'obstruction des vaisseaux est une barrière physique essentielle pour bloquer la propagation du parasite, permis par les vagues Ca^{2+} dans le cytosol et par la production de ROS. La cascade de signalisation des MAPK permet également l'activation de facteurs de transcription et participe à la production de protéines PR, de phytoalexines et autres composés phénoliques toxiques. Dans certains cas, une mort cellulaire programmée de la cellule infectée, la HR est déclenchée. Les voies hormonales SA et JA, antagonistes, se mettent également en place. Enfin, si la plante est résistante, le bio-agresseur peut déclencher l'expression des gènes R.

HR : réaction hypersensible, JA : acide jasmonique, MAPK : *mitogen-activated protein kinase*, PR : *pathogenesis-related protein*, gènes R : gènes de résistance, ROS : espèces réactives de l'oxygène, SA : acide salicylique.

D'après Emilie Chanclud, modifié

Dans les minutes qui suivent la reconnaissance d'un PAMP par un PRR, plusieurs voies de signalisation sont déclenchées (Chinchilla and Boller, 2012) (**Fig. 10**).

- **La voie de signalisation calcique.** Les concentrations de Ca^{2+} sont élevées dans les organites réservoirs comme les mitochondries ou la vacuole (environ 1mM) et sont très faibles dans le cytosol (environ 0.1 μM soit 10.000 fois moins) (Lecourieux et al., 2006). En réponse à une attaque, ces ions sont rapidement libérés dans le cytosol via les canaux calciques (Ma and Berkowitz, 2007; Ma et al., 2009; Verret et al., 2010), créant un flux important de calcium. Celui-ci est requis pour l'induction de nombreux mécanismes de défenses des plantes comme par exemple la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou la réaction hypersensible HR (voir ci-dessous) (Boudsocq et al., 2010; Gao et al., 2014).

- **La signalisation ROS.** Une forte production de ROS est aussi déclenchée très rapidement. Ces molécules (H_2O_2 , O_2^- , OH^-), qui sont très mobiles à travers les membranes, vont avoir plusieurs fonctions telles que la synthèse de composés antimicrobiens (Mittler et al., 2011), le renforcement des parois via la synthèse de callose (Brisson et al., 1994), l'activation des MAPK (Kovtun et al., 2000), ou le déclenchement de la HR (Lamb and Dixon, 1997). Elles peuvent aussi avoir un effet toxique pour le bio-agresseur (Suzuki et al., 2011). Les ROS entraînent une accumulation de calcium, tandis que le calcium déclenche la production de ROS. Ce système de boucle de régulation entre ROS et Ca^{2+} participe à la propagation du signal aux cellules adjacentes et *in fine* à toutes les cellules de l'organisme, même à distance du site infectieux (Gilroy et al., 2014).

- **Les cascades de MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*).** Plusieurs cascades de MAPK impliquées dans les réponses immunitaires sont activées. Ces voies de signalisation sont caractérisées par le transfert successif d'un phosphate actif d'une MAP3K sur une MAP2K, puis sur une MAPK. Ces phosphorylations sont responsable de l'activation de plusieurs facteurs de transcription activateurs de gènes de défense (Zhang and Klessig, 2001).

Suite à ces réactions quasi-immédiates, un ensemble d'autres réactions de défense se mettent en place plus tardivement.

- **La production de protéines PR (*Pathogenesis-related proteins*).** Dans la demi-heure qui suit la reconnaissance d'un PAMP, une production de protéines PR est déclenchée (Van Loon et al., 2006). Ces protéines appartiennent à 17 familles classées selon leurs homologues de séquences et selon leurs propriétés antimicrobiennes. La protéine PR la plus étudiée est PR1 dont le gène correspondant est hautement surexprimé en conditions d'infection (Van Loon and Van Kammen, 1970). Elle a une forte activité antimicrobienne, liée notamment à sa capacité à interagir avec des ergostérols de la membrane plasmique de l'agent pathogène (mise en évidence sur l'oomycète *Phytophthora*) où elle cause des dommages (Gamir et al., 2017). D'autres protéines PR peuvent également participer au renforcement de la paroi via leur activité peroxydase (PR9), à la formation de ROS (PR15, PR16) ou contribuer à la mise en place de la HR comme les PR10 caractérisées par une activité ribonucléase (Edreva, 2005; Kim et al., 2007; Zubini et al., 2009).

- **La synthèse de molécules antimicrobiennes.** La plante synthétise des molécules antimicrobiennes dont la majorité d'entre elles sont des **phytoalexines** (Naoumkina et al., 2007). Plus de 350 phytoalexines appartenant à au moins 30 familles de plantes différentes ont ainsi été isolées et caractérisées en termes de structure/fonction (Ahuja et al., 2012). D'une manière générale, elles ont un effet antifongique qui peut se manifester par l'inhibition de la germination des spores, de l'élongation du tube germinatif ou de la croissance mycélienne (Skipp and Bailey, 1976). D'autres exercent également un effet antibactérien notable (Gnanamanickam and Patil, 1977). De plus, les **lectines**, des protéines qui se lient spécifiquement et de façon réversible à certains glucides, auraient aussi un rôle de défense. Une de leurs fonctions serait notamment de protéger les plantes contre certains champignons au moment de la germination et des premiers stades de développement (Etzler, 1986).

- **L'obstruction des vaisseaux.** Le dernier moyen de lutte contre une agression par un bio-agresseur concerne l'obstruction des vaisseaux et le renforcement des parois qui se fait généralement via la production de callose (Luna et al., 2010). La callose est un polymère de glucane qui est sécrété par la plante au niveau des sites d'infection afin de constituer une barrière physique. Cependant, ce dépôt de callose prend un certain temps (quelques minutes) et sert plutôt de barrière sur le long terme, tandis que des mécanismes plus rapides d'obstruction des vaisseaux permettent au contraire de réagir immédiatement. Ces mécanismes impliquent des protéines du phloème (Kehr, 2006). C'est par exemple le cas des **forisomes**, sortes de corps protéiques allongés (environ 100µm de longueur) constitués de fibrilles et retrouvés dans les vaisseaux du phloème chez les Fabacées (légumineuses). Leur changement de conformation, d'un état allongé vers un état contracté, permet de stopper très rapidement le flux de sève en obstruant les tubes criblés du phloème (Knoblauch et al., 2001, 2003). C'est aussi le cas d'une autre classe de protéines, les **protéines P**, également appelées **SEO** (*sieve elements occlusion*) (Cronshaw and Sabnis, 1990), qui existent sous deux états, obstruant ou non les vaisseaux. Leur changement de conformation est extrêmement rapide (<1 s) (Furch et al., 2010; Knoblauch et al., 2001). Enfin, les protéines **PP1** et la lectine **PP2** (*phloem protein 1* et 2), identifiées pour la première fois chez *Cucurbita maxima* mais qui semblent présentes chez toutes les dicotylédones, interagissent pour former des polymères de haut poids moléculaire obstruant les tubes criblés (Read and Northcote, 1983a, 1983b).

De nombreuses recherches ont aussi démontré qu'au moins trois phytohormones, l'**acide salicylique** (SA), l'**acide jasmonique** (JA), et l'**éthylène** (ET), jouent un rôle majeur dans la mise en place des défenses des plantes (Bari and Jones, 2009; Pieterse et al., 2012).

Le SA et le JA sont connus pour leur action antagoniste. L'interaction entre ces deux voies est en effet considérée comme le pivot de la réponse immunitaire, en permettant la régulation des réactions de défense (Pieterse et al., 2012). En général, la signalisation SA est essentielle pour les réponses de défense contre un large éventail d'agents pathogènes, tandis que les voies de signalisation JA et ET sont plutôt impliquées dans la régulation de la réponse des plantes aux insectes herbivores (Glazebrook, 2005; Howe and Jander, 2008).

4.1.2. L'ETS ou *Effector-triggered susceptibility*

Certains bio-agresseurs sont capables de contourner les réactions de défense de la PTI et ainsi infecter leur plante hôte. Une des stratégies mises en place par ces bio-agresseurs est la sécrétion dans les cellules végétales de molécules appelées **effecteurs**, qui sont impliquées dans la manipulation de la structure et/ou de la fonction de la cellule végétale, facilitant ainsi l'infection (Kamoun, 2006). Leur entrée dans la cellule peut se faire de différentes manières selon le type d'agent pathogène. Les bactéries phytopathogènes utilisent le très connu système de sécrétion de type 3 (*Type 3 Secretion System : T3SS*), une seringue moléculaire qui « injecte » directement les effecteurs à l'intérieur de la cellule végétale (Galán and Collmer, 1999). Les oomycètes quant à eux, ayant une phase biotrophe dans leur cycle de vie, développent des structures d'échanges à l'intérieur des cellules, les *haustoria*, permettant la sécrétion d'effecteurs (Chaudhari et al., 2014). Un autre exemple est celui des nématodes phytoparasites qui injectent des effecteurs dans la plante via leurs stylets. Ces effecteurs vont déclencher la formation de sites nourriciers en modulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la physiologie de la plante, dans le cycle cellulaire et dans la défense (Hewezi and Baum, 2012).

Il existe différentes stratégies de contournement des défenses de la plante, orchestrées par des effecteurs. Certains ont une localisation nucléaire et peuvent perturber l'expression de certains gènes (Bogdanove, 2014; Nissan et al., 2012). D'autres encore modulent les voies hormonales (Kyndt et al., 2016) ou dérèglent le trafic vésiculaire (Nomura et al., 2011). Néanmoins, les fonctions de ces effecteurs restent peu caractérisées pour la majorité d'entre eux, probablement parce-que leurs cibles dans les cellules végétales n'ont pas été identifiées.

4.1.3. L'ETI ou *Effector-triggered immunity*

Le deuxième niveau d'immunité, spécifique du bio-agresseur, est appelé ETI (*Effector-triggered immunity*). Certains effecteurs, qualifiés alors de protéines d'avirulence, sont reconnus par la plante, entraînant ainsi tout un ensemble de réactions de défense. La protéine d'avirulence peut soit interagir avec une protéine de résistance R pour déclencher la réaction hypersensible (HR), soit être transportée dans le noyau où elle reconnaît une protéine R pour activer la résistance.

- **Les gènes de résistance (R)**. Ils codent pour des protéines de résistance, c'est-à-dire des récepteurs membranaires qui présentent des régions homologues avec des séquences répétées riches en leucine (LRR) et des sites de liaison nucléotidique (NBS) (McHale et al., 2006). D'autres caractéristiques structurales permettent de définir plusieurs sous-groupes : domaines « leucine zipper », sérine/thréonine kinase (Ser/Thr) ou Toll/interleukine-1 (TIR).

- **La réponse hypersensible (HR)**. Elle consiste à confiner le bio-agresseur dans son aire d'inoculation via la mort programmée des cellules végétales, de manière à empêcher sa propagation (Ma and Berkowitz, 2007). Au cours d'une infection, la vacuole accumule des composés phénoliques et protéines PR. Suite

à un signal calcique, la vacuole explose, libérant ainsi ces substances et enzymes antimicrobiennes dans les cytoplasme des cellules (Bol et al., 1990).

Dans le cas où la protéine d'avirulence est reconnue, la maladie ne se développe pas, et l'interaction entre la plante et le bio-agresseur est dite « **incompatible** ». Le bio-agresseur peut alors contourner cette résistance, soit en perdant ou modifiant le gène d'avirulence (Gout et al., 2006; Huang et al., 2014; van Kan et al., 1991), soit grâce à l'action d'un autre effecteur (Mackey et al., 2003; Russell et al., 2015; Tsiamis et al., 2000). Si la protéine d'avirulence n'est pas ou plus reconnue, la maladie se développe et l'interaction est dite « **compatible** ».

4.2. Les premiers niveaux de défense contre les pucerons

Les trichomes, les poils et les cires représentent le premier niveau de défense des plantes face aux attaques de pucerons et autres insectes herbivores (Fürstenberg-Hägg et al., 2013; Hanley et al., 2007; War et al., 2012). Dans de nombreux cas, ces barrières sont insuffisantes et la plante déclenche deux formes de défense (Kogan and Ortman, 1978; Painter, 1951). La première forme est dite « **antixénose** » et a une action répulsive sur le puceron. La deuxième est dite « **antibiose** » et induit un effet toxique en augmentant la mortalité et en réduisant leur reproduction. Le modèle *A. thaliana* / *M. persicae* a particulièrement été utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires des réponses des plantes mises en place lors d'une attaque de puceron.

4.2.1. L'induction de la PTI par les plantes

L'insertion des stylets s'accompagne de la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de flux calciques. Il a en effet été démontré à plusieurs reprises que les gènes impliqués dans ces voies de signalisation étaient surexprimés chez *A. thaliana* suite à une infestation des pucerons *M. persicae* et *B. brassicae* (Foyer et al., 2015; Miller et al., 2009; Moran et al., 2002; Ren et al., 2014; Zhu-Salzman et al., 2004). La voie de signalisation calcique induite chez *A. thaliana* a aussi été étudiée *in vivo* et en temps réel, en utilisant un senseur de calcium fluorescent (Vincent et al., 2017). Il en résulte une élévation de calcium extrêmement rapide dans les plantes suite à une attaque de *M. persicae* (de la fluorescence est générée dans les 95 secondes qui suivent l'installation du puceron), uniquement autour des sites d'alimentation. Grâce à des enregistrements EPG, il a été démontré que ces vagues calciques étaient directement corrélées aux ponctions intracellulaires des pucerons dans les cellules de l'épiderme et du mésophylle. L'utilisation de mutants d'*A. thaliana* a permis de mettre en évidence le rôle du récepteur membranaire BAK1 (*Brassinosteroid insensitive 1-Associated receptor Kinase 1*), des canaux ioniques de la membrane plasmique GLR3.3 et GLR3.6 (*Glutamate receptor-like 3.3 et 3.6*), et du canal ionique vacuolaire TPC1 (*Two-pore channel 1*) dans ce processus.

D'autres gènes ont aussi été caractérisés comme impliqués dans les défenses. Par exemple, le gène **PAD4** (*Phytoalexin deficient 4*), qui code pour une lipase, contribue à la défense d'*A. thaliana* contre *M. persicae*, les pucerons se reproduisant mieux sur les mutants n'exprimant plus ce gène (Pegadaraju et al., 2007). C'est également le cas du cytochrome P450 encodé par le gène **PAD3** qui induit une augmentation de **camalexine** (une phytoalexine) (Kettles et al., 2013).

Des composés toxiques peuvent aussi s'accumuler. Les **glucosinolates**, trouvés chez toutes les *Brassicaceae* (crucifères), dont *A. thaliana*, sont en effet connus pour leur effet dissuasif contre les herbivores (Fahey et al., 2001; Halkier and Gershenzon, 2006). L'expression de gènes associés à la biosynthèse de certains glucosinolates augmente chez *A. thaliana* lorsque celle-ci est exposée à une attaque des pucerons *M. persicae* et *B. brassicae*, ce qui a pour effet de diminuer leur fécondité (Kim and Jander, 2007; Mewis et al., 2006). De même, des mutants présentant de forts taux de glucosinolates sont plus résistants aux pucerons et inversement (Kim and Jander, 2007; Kim et al., 2008).

Enfin, les tubes criblés réagissent suite à la blessure engendrée par les stylets. Par exemple, la fève (*Vicia faba*) déclenche l'obstruction de ses vaisseaux suite à la pénétration des stylets dans ses tissus, des pucerons *M. persicae* et *M. euphorbiae* (Medina-Ortega and Walker, 2015). Des enregistrements EPG ont ainsi démontré que les pucerons stoppaient leur alimentation et retiraient leurs stylets avant d'avoir pu ingérer le phloème.

4.2.2. Les voies hormonales

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'induction de gènes marqueurs de la voie SA lors de l'alimentation de *M. persicae* (De Vos et al., 2005; Kerchev et al., 2013; Moran and Thompson, 2001), tandis que d'autres montrent plutôt une activation de la voie JA (Ellis et al., 2002; Moran and Thompson, 2001). Ces résultats sont surprenants étant donné leur effet antagoniste. La fécondité de *M. persicae* est réduite chez le mutant *cev1* d'*A. thaliana*, qui exprime de manière constitutive les gènes impliqués dans la voie JA, et elle est au contraire augmentée chez le mutant insensible (Ellis et al., 2002). Cette phytohormone jouerait donc un rôle important dans la résistance aux pucerons. L'hypothèse proposée ici est que certains pucerons induisent la voie SA de manière à réprimer la voie JA (De Vos et al., 2007), comme c'est le cas de plusieurs insectes (Chung et al., 2013; Diezel et al., 2009). Toutefois, ce phénomène reste peu clair concernant les interactions plante-puceron car, malgré l'expression des gènes marqueurs, une augmentation de la concentration de ces phytohormones n'a pas été détectée (De Vos et al., 2005). Enfin, la voie de l'éthylène pourrait être impliquée car des plants de maïs produisant plus d'ET sont moins sensibles au puceron *Rhopalosiphum maidis* (Louis et al., 2015).

4.2.3. La recherche d'éliciteurs

Les éliciteurs sécrétés par les pucerons restent largement méconnus et seules quelques molécules ont été identifiées comme étant capables d'induire une réponse de type PTI. Une étude a par exemple montré que la salive du puceron *M. persicae* altérait l'expression des gènes de défense et de sénescence lorsqu'elle était infiltrée dans les feuilles d'*A. thaliana*, probablement à cause d'un composé salivaire d'une taille comprise entre 3 et 10 kDa qui n'a pas encore été identifié (De Vos and Jander, 2009).

C'est également le cas de **GroEL**, une protéine chaperonne bactérienne produite par le symbiote obligatoire *B. aphidicola* qui a été détectée dans la salive de *M. euphorbiae* (Chaudhary et al., 2014). Son infiltration dans les feuilles d'*A. thaliana* induit un pic oxydatif, un dépôt de callose et la surexpression de gènes marqueurs de la PTI (*FRK1* et *WRKY29*). De plus, la fécondité des pucerons *M. persicae* et *M. euphorbiae* diminue sur des plantes transgéniques d'*A. thaliana* et *Solanum lycopersicum* (la tomate) exprimant *groEL*. Enfin, les auteurs ont montré que l'induction de la PTI par GroEL était considérablement réduite chez le mutant bak1-5 d'*A. thaliana*, qui possède une mutation au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur transmembranaire BAK1. Ce dernier serait donc impliqué dans la reconnaissance de cette protéine chaperonne par la plante.

4.3. Rôle de la salive dans le contournement des mécanismes de défenses

Les pucerons ont dû développer des interactions intimes et complexes avec leurs plantes hôtes pour pouvoir s'alimenter durablement dans le phloème. De nombreux travaux ont mis en évidence que les composés salivaires constituaient un élément essentiel dans les interactions plante-puceron.

4.3.1. Composition en protéines des deux salives

Comme expliqué précédemment (section 1.4 de l'introduction), deux types de salive ont été décrits : la salive gélifiée et la salive aqueuse qui seraient respectivement produites par les glandes salivaires principales et accessoires (Cherqui and Tjallingii, 2000; Ponsen, 1972). La salive gélifiée a un pH compris entre 5 et 6 tandis que la salive aqueuse a un pH compris entre 8 et 9 (Miles, 1999).

La mise au point d'une méthode de prélèvement des salives a permis l'analyse de leur composition. Il est en effet possible de les séparer en laissant les pucerons s'alimenter dans un milieu artificiel contenu entre deux membranes de *Parafilm*. La salive gélifiée, insoluble, est déposée à la surface du *Parafilm* (Cherqui and Tjallingii, 2000; Miles, 1999; Will et al., 2012), tandis que la salive aqueuse est récupérée directement entre les deux couches. De cette manière, leurs propriétés et leurs fonctions enzymatiques ont d'abord été étudiées en séparant les protéines par électrophorèse ou en ajoutant différents substrats au milieu artificiel (Cherqui and Tjallingii, 2000; Madhusudhan and Miles, 1998; Will et al., 2009). Depuis une dizaine d'années, des approches haut-débit ont également permis de recenser les protéines produites

dans les glandes salivaires, qui possèdent des peptides signaux et qui sont donc potentiellement sécrétées.

Ainsi, la salive gélifiée est majoritairement composée de protéines, phospholipides et carbohydrates conjugués (Cherqui and Tjallingii, 2000; Miles, 1999; Urbanska et al., 1998). Certaines de ces protéines sont des enzymes dégradant la paroi cellulaire (pectinases, glucanases, amylases) ou des enzymes détoxifiantes qui dégradent les composés phénoliques libérés par les tissus endommagés de la plante (oxydoréductases, phénoloxydases, peroxydases) (Cherqui and Tjallingii, 2000; Ma et al., 1990; Madhusudhan and Miles, 1998). La protéine majoritaire de la salive gélifiée est une protéine de 154 kDa (ACYPI1009881-PA), renommée **SHP** pour *sheath protein*. Elle a été détectée pour la première fois dans la salive d'*A. pisum* (Carolan et al., 2009) puis plus tard dans la salive de *Sitobion avenae* et *Metopolophium dirhodum* (Rao et al., 2013). Son rôle clef pour l'alimentation du puceron a depuis été mis évidence. Une approche RNAi ciblant le gène *shp* a en effet engendré une malformation de la gaine salivaire récoltée sur milieu artificiel, qui était directement corrélée à une alimentation perturbée, une mortalité accrue et enfin une fécondité réduite des pucerons (Abdellatef et al., 2015; Will and Vilcinskas, 2015).

La salive aqueuse aurait une composition protéique beaucoup plus complexe qui varierait en fonction de l'espèce de puceron (Baumann and Baumann, 1995; Cherqui and Tjallingii, 2000; Miles, 1999; Urbanska et al., 1998). Un premier catalogue de protéines salivaires a été établi chez l'espèce *A. pisum*. Grâce à une approche combinant le séquençage des transcrits (*Expressed Sequence Tags*) et l'analyse protéomique des glandes salivaires, 324 protéines possédant un peptide signal ont été identifiées (Carolan et al., 2011). Ensuite, l'expression des gènes dans les glandes salivaires a été mesurée par RNA-seq, permettant une plus grande profondeur de séquençage et une quantification de l'expression de l'ensemble des transcrits (Boulain et al., 2018). Au total, 3603 gènes exprimés dans les glandes salivaires, codant pour des protéines potentiellement sécrétées par le puceron, ont été détectés. De plus, une analyse protéomique de la salive aqueuse d'*A. pisum* a confirmé la sécrétion de 51 protéines (Boulain et al., 2018), ce qui représente une avancée considérable par rapport aux neuf protéines initialement détectées dans une autre étude (Carolan et al., 2009). Ces approches haut-débit ont également permis d'accéder au protéome salivaire d'une dizaine d'espèces de puceron (Atamian et al., 2013; Bos et al., 2010; Cooper et al., 2010, 2011; Harmel et al., 2008; Nicholson et al., 2012; Rao et al., 2013; Vandermoten et al., 2014). La majorité des protéines identifiées n'ont pas de fonction prédite puisqu'elles n'ont pas de domaines homologues connus chez d'autres insectes. Quelques-unes ont néanmoins été caractérisées et décrites comme des effecteurs (**Fig. 11**).

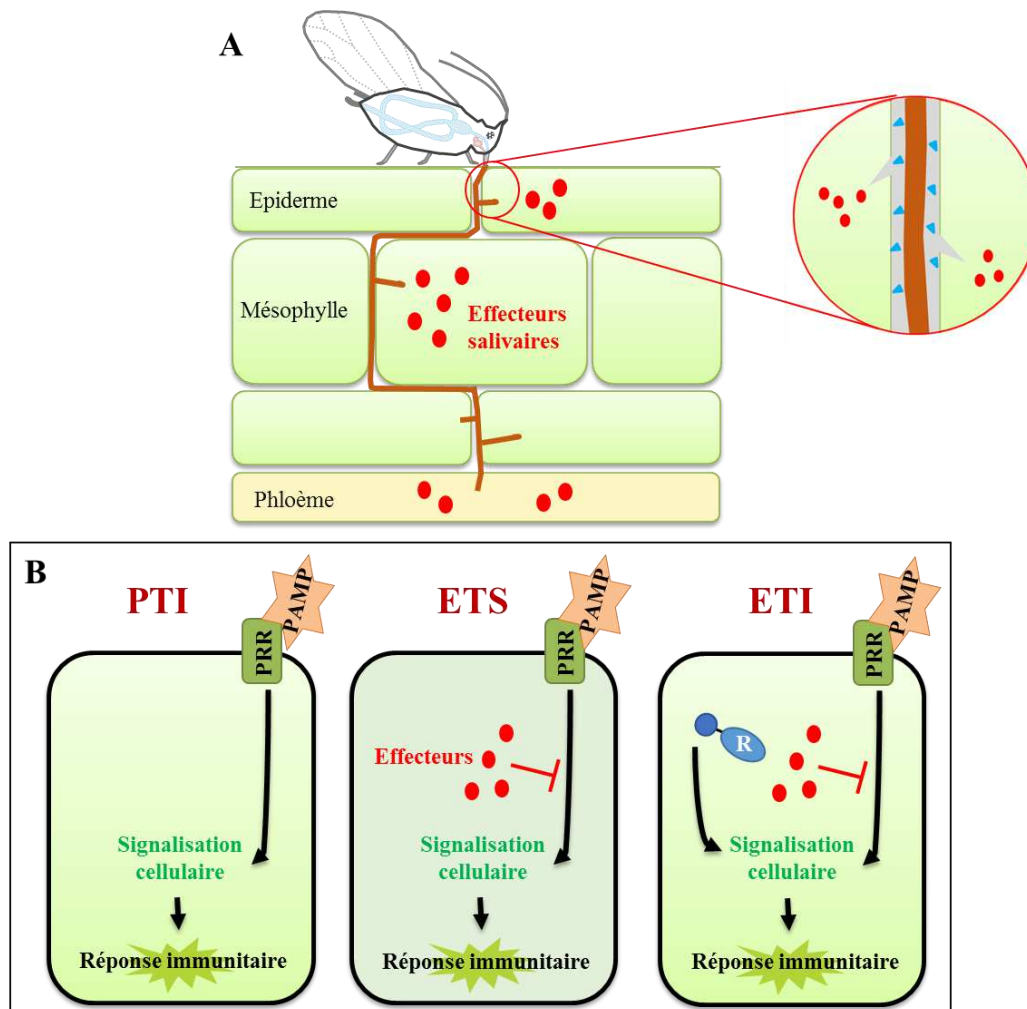


Figure 11. Modèle de l'interaction plante-puceron

A) Lorsque le puceron s'alimente, les stylets pénètrent l'apoplaste des cellules et effectuent de brèves ponctions intracellulaires dans les cellules de l'épiderme et du mésophylle, jusqu'à ce qu'ils atteignent le phloème. Tout au long du trajet, le puceron sécrète des effecteurs à la fois dans l'apoplaste (triangles bleus), retrouvés dans la gaine salivaire (en gris), et dans le cytoplasme avec la salive aqueuse (ronds rouges). **B)** La plante est capable de détecter l'arrivée du puceron via la perception des PAMP par les récepteurs PRR (**PTI**). Cette reconnaissance déclenche toute une cascade de signalisation et induit les mécanismes de défenses. Néanmoins, la salive de puceron peut également contenir des effecteurs capables de contourner ces défenses pour permettre l'alimentation durable de l'insecte sur sa plante hôte (**ETS**). Enfin, ces effecteurs peuvent être eux-mêmes reconnus et neutralisés par les protéines R lorsque la plante est résistante au puceron (**ETI**).

ETI : *Effector-triggered immunity*, ETS : *Effector-triggered susceptibility*, PAMP : *Pathogen-associated molecular patterns*, PRR : *pattern recognition receptor*, PTI : *PAMP-triggered immunity*.

Adapté de Hogenhout and Bos (2011)

4.3.2. Caractérisation fonctionnelle des effecteurs

Le rôle des effecteurs candidats a généralement été recherché soit par la méthode RNAi visant à réduire les niveaux d'expression des gènes, soit par l'obtention de plantes hôtes les exprimant transitoirement.

L'effecteur **C002** est le premier à avoir été identifié, son gène étant l'un des plus exprimés dans les glandes salivaires (Mutti et al., 2006). Il ne présente aucune fonction connue et n'a pas été détecté chez d'autres insectes. Une diminution des transcrits par RNAi a entraîné une mortalité accrue dans les populations, et des enregistrements EPG ont permis de montrer que les individus rencontraient des difficultés pour atteindre le phloème (Mutti et al., 2006, 2008). De plus, son homologue chez *M. persicae*, MpC002, favorise l'infestation du puceron sur ses hôtes *Nicotiana benthamiana* et *A. thaliana* lorsque le gène est surexprimé transitoirement (Bos et al., 2010; Pitino and Hogenhout, 2013).

D'autres effecteurs semblent requis lors de l'alimentation et contribuent ainsi aux performances du puceron *A. pisum*. C'est le cas d'**Armet** (*Arginine rich, mutated in early stage of tumors*) qui aurait la capacité de bloquer le calcium (Wang et al., 2015b), des protéines **ACE** (*Angiotensin-converting-enzymes*) (Wang et al., 2015c), ou encore de la protéine **MIF1** (*Macrophage Migration Inhibitory Factor 1*) (Naessens et al., 2015). La diminution d'expression de ces gènes par RNAi perturbe en effet l'ingestion du phloème par les insectes engendrant une forte mortalité. De plus, il a été montré que l'expression transitoire du gène codant pour la protéine **Ap25** dans des légumineuses améliore la fécondité du puceron (Guy et al., 2016).

Le fait que *M. persicae* soit capable de se développer sur des plantes modèles a grandement facilité la caractérisation des effecteurs de ce puceron. Sur les 46 candidats effecteurs identifiés à la suite d'une analyse transcriptomique des glandes salivaires (Bos et al., 2010), plusieurs d'entre eux ont été démontrés comme contribuant à améliorer les performances du puceron en supprimant les défenses de son hôte. C'est le cas des effecteurs Mp10, PintO1, PintO2 et Mp55.

Mp10 supprime la production de ROS induite par le peptide bactérien flg22 lorsque son gène est transitoirement exprimé chez *N. benthamiana* (Bos et al., 2010). Cependant, il entraîne aussi la mort cellulaire, l'activation des voies hormonales (JA, SA) et des chloroses, ainsi qu'une diminution de la fécondité des pucerons (Bos et al., 2010; Rodriguez et al., 2014). Bien que ces résultats ne reflètent pas la réalité du système biologique (concentrations trop importantes de Mp10 dans la plante), ils sont contradictoires avec les rôles attendus d'un effecteur (suppression et non induction des défenses de la plante). Le rôle de Mp10 en tant qu'éliciteur et/ou effecteur doit donc être précisé. En revanche, *M. persicae* produit davantage de descendants sur *A. thaliana* qui exprime les gènes **PintO1** (*Progeny increase to Overexpression 1*) et **PintO2** (ou *Mp1* et *Mp2*) (Pitino and Hogenhout, 2013). Grâce au criblage d'une banque d'ADNc de *Solanum tuberosum* (pomme de terre), il a été démontré que MpPintO1 ciblait une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire (VPS52) (Rodriguez et al., 2017). Une interaction a

également été observée avec l'homologue de VPS52 chez *A. thaliana*, mais pas chez *Hordeum vulgare* (orge) et *Medicago truncatula*, illustrant une interaction hôte-spécifique. Enfin, le gène **Mp55** favorise lui aussi la fécondité du puceron quand il est transitoirement exprimé chez *A. thaliana* (Elzinga et al., 2014). De plus, il apparaît comme directement impliqué dans la suppression des défenses de la plante via la diminution du dépôt de callose, ainsi que l'accumulation d' H_2O_2 et de glucosinolates.

Chez *M. euphorbiae*, 460 protéines salivaires ont été détectées via une approche transcriptomique, dont 125 avec un peptide signal (Atamian et al., 2013). Parmi elles, **Me10** et **Me23** améliorent la fécondité du puceron lorsqu'elles sont transitoirement exprimées chez le tabac (Atamian et al., 2013). C'est également le cas de Me10 chez la tomate, lorsqu'elle est délivrée via le système de sécrétion de type 3 (T3SS) de *Pseudomonas spp.* Son partenaire côté plante a aussi été identifié *in vitro* et *in planta*. Il s'agit de la protéine TFT7 qui appartient à la famille des protéines 14-3-3 déjà reconnues pour leurs rôles dans de nombreuses interactions plante-pathogène (Dubrow et al., 2018; Lozano-Durán and Robatzek, 2015). La diminution de l'expression du gène *TFT7* chez la tomate par RNAi n'a pas eu d'effet sur les performances de *M. euphorbiae*, mais a augmenté par ailleurs la longévité et la fécondité d'un autre puceron, *A. gossypii*, qui n'est pas adapté à cette espèce. Les auteurs ont émis l'hypothèse que TFT7 pourrait jouer un rôle clef dans la résistance basale de la tomate contre les espèces de pucerons non adaptées. Enfin, **Me47** présente une activité Glutathione-S-Transferase (GST) spécifique des isothiocyanates, composés impliqués dans la défense contre les herbivores (Kettles and Kaloshian, 2016). Lorsque l'effecteur est relargué via le système de sécrétion de la bactérie *Pseudomonas spp* chez la tomate, la fécondité de *M. euphorbiae* augmente et engendre une surexpression des gènes de défenses. Ce n'est pas le cas chez *A. thaliana* (espèce non hôte), indiquant que Me47 a une fonction hôte-spécifique.

Plusieurs informations importantes sur les effecteurs de pucerons peuvent être déduites de l'ensemble de ces études. Certains effecteurs ne présentent aucune similarité avec des protéines connues et sont spécifiques des pucerons (C002, Mp55 et PintO1 par exemple). D'autres, à l'inverse, sont conservés chez divers organismes. Armet est par exemple localisée dans le réticulum endoplasmique chez les mammifères et joue aussi le rôle d'un facteur neurotrophique (Apostolou et al., 2008; Mizobuchi et al., 2007), tandis que les MIF sont des cytokines importantes pour la régulation des réponses immunitaires et ont été retrouvées dans de nombreux organismes (Calandra and Roger, 2003).

Ensuite, certains sont connus pour agir de manière plante-hôte-spécifique. C'est par exemple le cas de PintO1, Me10 et Me47. Ceci suggère une interaction spécifique des effecteurs avec des protéines de la plante hôte sur laquelle chaque espèce de puceron est adaptée, comme cela a déjà été montré pour le couple PintO1-VPS52 et Me10/TFT7.

De plus, les effecteurs supposés impliqués dans l'adaptation de la plante hôte sont sous pression de sélection et évoluent rapidement (i.e. sélection purifiante plus forte), comme C002 et PintO1, tandis que d'autres évoluent plus lentement comme Mp10 et Armet (Boulain et al., 2018). L'hypothèse est que ces derniers sont probablement impliqués dans des fonctions plus générales de la plante, en supprimant des voies de défenses conservées. C'est effectivement le cas de Mp10 qui supprime la production de ROS, ou encore d'Armet qui pourrait lier le calcium responsable de l'induction de nombreuses voies de signalisation dans la plante. Enfin, les cibles des effecteurs côté plante restent encore très peu caractérisées. Seules les interactions PintO1/VPS52 et Me10/TFT7 sont connues à ce jour.

Pour terminer, les effecteurs, de manière générale, peuvent avoir un mode d'action extracellulaire (dans l'apoplaste des cellules végétales) ou intracellulaire (après entrée dans les cellules végétales) (Cambronne and Roy, 2006; Wawra et al., 2012; Zhang and Xu, 2014). Une seule étude a montré que c'était probablement aussi le cas pour les effecteurs de pucerons (Mugford et al., 2016). Des feuilles d'*A. thaliana* infestées par des pucerons *M. persicae* ont été fixées, immuno-marquées avec des anticorps spécifiques, puis observées en microscopie électronique à transmission. Les auteurs ont conclu que les effecteurs étudiés pouvaient être relargués dans des compartiments distincts et qu'ils étaient associés aux deux types de salive (Fig. 11).

4.4. Les gènes de résistance

Plusieurs gènes de résistance aux pucerons, codant pour des récepteurs cytoplasmiques NB-LRR ont été identifiés chez les plantes (Dogimont et al., 2010).

Le gène *vat* confère par exemple au melon une résistance quantitative contre certains génotypes du puceron *Aphis gossypii* : il réduit en effet sa fécondité de 80 à 90% en quelques jours seulement (Villada et al., 2009). En présence de l'allèle *Vat-1*, les densités de pucerons sont réduites dans trois bassins de production de melon qui ont été étudiés, le Sud-Est et le Sud-Ouest de la France, ainsi que les Antilles (Thomas et al., 2016). De même, les épidémies de certains virus circulants (le CABYV par exemple) et non circulants (le CMV) transmis par *A. gossypii* sont ralenties.

Un deuxième exemple est le cas du gène *Mi-1.2* qui confère à la tomate une résistance contre le puceron *M. euphorbiae* et qui peut engendrer jusqu'à 100% de mortalité dans les populations (Kaloshian et al., 1997; Rossi et al., 1998). Il confère également une résistance contre les nématodes, les aleurodes et les psylles (Casteel et al., 2006; Nombela et al., 2003).

Dans tous les cas, les effecteurs de puceron qui sont reconnus ne sont pas encore caractérisés.

5. Objectifs de la thèse

Ma thèse a été financée par l'ANR StylHook qui a été menée en parallèle d'un projet complémentaire financé par la fondation Bill et Mélima Gates ayant pris fin en septembre 2017. Ces deux programmes visaient à recenser de manière exhaustive les protéines cuticulaires de l'acrostyle par différentes approches, et à définir les motifs peptidiques accessibles en surface de l'organe. Ils avaient pour cadre général une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la transmission de virus non circulants par vecteur, l'identification des récepteurs étant une priorité en tant que cibles potentielles pour lutter contre les infections virales. Par ailleurs, l'acrostyle représentait un organe intéressant à caractériser pour son rôle éventuel dans l'alimentation du puceron. Perturber ses fonctions pourrait aussi avoir un intérêt pour lutter contre les infestations et ce deuxième volet n'avait pas encore été exploré jusque-là. Plusieurs partenaires ont été impliqués notamment dans des études transcriptomique et protéomique des stylets, le suivi du comportement alimentaire des insectes, et les études structurales des protéines d'intérêt.

C'est dans ce contexte que j'ai démarré ma thèse, co-encadrée par Marilyne Uzest et Stéphane Blanc. Son objectif était de caractériser le rôle de l'acrostyle dans la transmission des virus non circulants mais aussi de découvrir ses autres fonctions. L'hypothèse de base était qu'il pouvait être impliqué dans l'alimentation de l'insecte, via la rétention de composés de plante ou de composés salivaires à des étapes clés de l'alimentation et dans les tissus/cellules appropriés.

Plusieurs axes de recherche ont été menés durant ces trois années. Ils sont organisés en quatre chapitres distincts. Le **premier chapitre** porte sur la caractérisation du protéome des stylets. Identifier les protéines de l'acrostyle était en effet le premier objectif de la thèse. Cette étude a notamment permis de définir le répertoire minimal des protéines de l'acrostyle et de mettre en évidence cinq protéines cuticulaires, renommées Stylines, possédant au moins un peptide directement accessible en surface de l'acrostyle susceptible d'interagir avec des molécules exogènes (virus, composés de plante) ou endogènes (composés salivaires).

Le **deuxième chapitre** présente la mise en place des deux approches de validation fonctionnelle des stylines chez le puceron : la diminution transitoire de l'expression des gènes par ARN interférence, et l'obtention de lignées mutantes via la technologie CRISPR-Cas9. Cette deuxième approche a été réalisée en collaboration avec Gaël Le Trionnaire de l'UMR IGEPP (Inra, Agrocampus Ouest, Rennes), chez qui j'ai réalisé un séjour pour générer des mutants.

Le **troisième chapitre** porte sur la caractérisation du rôle des stylines dans la transmission de certains virus non circulants. J'ai été impliquée dans l'étude de trois candidats récepteurs (Stylin-01, Stylin-02 et Stylin-04) et j'ai recherché leur rôle dans la transmission de deux phytovirus: le CaMV (genre *Caulimovirus*) et le TuMV (genre *Potyvirus*).

Enfin, le **dernier chapitre** de la thèse consiste à déterminer le rôle de l'acrostyle pour l'insecte lui-même. J'ai notamment recherché les partenaires des stylines par la technique de double-hybride en levure, avec une approche gène candidat en ciblant prioritairement les protéines salivaires du puceron, complétée par des interactions sur stylets disséqués. J'ai aussi déterminé le rôle de Stylin-01 et Stylin-03 dans le comportement alimentaire du puceron par la technique de l'électropénétrographie (EPG). L'ensemble de cette étude a été réalisé sur les deux pucerons modèles *A. pisum*, le puceron du pois, et *M. persicae*, le puceron vert du pêcher, pour diverses raisons qui seront évoquées tout au long de ce manuscrit.

Chapitre 1

—

Identification et caractérisation des protéines stylines dans l'acrostyle

1. Contexte de l'étude

Identifier les protéines qui possèdent au moins un peptide en surface de l'acrostyle susceptible d'interagir avec des particules virales, des molécules de salive de puceron ou encore des composés de plante, constituait la première étape pour déterminer le rôle de cet organe particulier.

Au total, 150 protéines cuticulaires avaient été annotées chez l'espèce modèle *A. pisum*, appartenant à six familles différentes : 125 CPR (15 RR-1 et 110 RR-2), 11 CPAP1, huit CPAP3, trois TWDL, deux CPF et une CPCFC. Une approche gène candidat via la production d'une banque d'anticorps avait été utilisée avec succès pour identifier certaines de ces protéines dans les stylets (Uzest et al., 2010; Webster et al., 2017, 2018). Néanmoins, cette approche était difficilement applicable aux 150 protéines : trop d'anticorps à produire et forte homologie de séquences de certaines protéines notamment les RR-2, parfois impossible à distinguer les unes des autres par des anticorps spécifiques. Une autre approche, la plus exhaustive possible, était donc nécessaire pour obtenir le répertoire complet des protéines de l'acrostyle. Dans le cadre du projet StylHook, des analyses transcriptomique et protéomique des glandes rétortiformes qui synthétisent les stylets ont été réalisées par l'équipe d'Yvan Rahbé (Inra, Lyon). Les résultats sont en cours de valorisation. N'y ayant pas participé, ces études ne sont pas détaillées ici. En parallèle, nous avons effectué l'étude protéomique des stylets dont les résultats sont présentés ci-après.

Jusqu'à présent, les études protéomiques des cuticules d'autres insectes étaient essentiellement basées sur l'extraction et la précipitation des protéines par SDS (dodécylsulfate de sodium), et leur séparation par électrophorèse suivie d'une digestion à la trypsine (Andersen et al., 1997; Dong et al., 2016; Fu et al., 2011; He et al., 2007; Micas et al., 2016; Tang et al., 2010; Zhou et al., 2016, 2017). Ces approches présentaient cependant des limites liées au grand nombre d'étapes à accomplir, et nécessitaient une quantité importante de matériel biologique. Par exemple, entre 1000 et 1500 individus adultes ont été utilisés pour identifier les protéines constituant l'exosquelette du moustique *Anopheles gambiae* (Zhou et al., 2017). Réaliser des études protéomiques sur les stylets du puceron, qui sont des échantillons beaucoup plus petits qu'un exosquelette entier, n'était donc pas envisageable. Dans ce contexte, l'équipe de Philippe Bulet (plateforme Biopark à Archamps) a développé une nouvelle méthode pour extraire les protéines de la cuticule à partir d'une faible quantité de matériel biologique, via l'utilisation combinée d'un solvant (l'hexafluoroisopropanol-HFIP) et d'un agent surfactant (RapiGest SF) (Masson et al., 2018). Elle a d'abord été mise au point sur différentes structures cuticulaires d'autres insectes pour lesquelles des données étaient déjà disponibles dans la littérature, mais sur des échantillons plus faibles, afin de comparer les résultats obtenus à ceux publiés et valider l'efficacité de la méthode. Ils ont ensuite appliqué cette approche sur cinq mues d'*A. pisum* et détecté 100 protéines cuticulaires, dont 10 RR-1, 72 RR-2, 6 CPAP1, 8 CPAP3, 2 TWDL et 2 CPF. Ces 100 protéines représentaient 2/3 des protéines cuticulaires annotées dans les bases de données.

Cette nouvelle méthode a été appliquée sur différentes cuticules de pucerons, dont les stylets. Cette étude a fait l'objet d'un article, présenté dans le paragraphe suivant, pour lequel je suis co-première auteure, et qui sera prochainement soumis pour publication à *Molecular and Cellular Proteomics*.

2. Identification des protéines en surface de l'acrostyle

2.1. Résumé de l'étude protéomique

Une analyse protéomique a été réalisée sur quatre structures cuticulaires du puceron modèle *A. pisum* : antennes, ailes, pattes et stylets selon la méthode développée dans le contexte d'étude (Masson et al., 2018). Le but était d'obtenir le répertoire des protéines cuticulaires présentes dans les stylets de puceron, et de le comparer à ceux des autres appendices afin de distinguer celles spécifiques des stylets qui pourraient notamment jouer le rôle de récepteurs de virus. Cette étude comparative n'a toutefois pas permis de faire ressortir des candidats récepteurs, toutes les protéines identifiées dans les stylets étant également retrouvées dans les autres structures. Nous avons donc recherché les protéines présentes dans l'acrostyle parmi toutes celles identifiées dans les stylets.

Les protéines cuticulaires des stylets ont été identifiées sur la base de peptides détectés en spectrométrie de masse qui étaient soit « uniques », c'est-à-dire présents dans une seule protéine du puceron du pois, soit « partagés », c'est-à-dire présents dans plusieurs protéines. L'analyse protéomique a été réalisée en « mode groupé », c'est-à-dire qu'un peptide « partagé » a été automatiquement assigné à une seule protéine représentative de toutes celles qui possèdent ce peptide : il s'agit du listing minimal de protéines identifiées dans l'échantillon. Ce premier *listing* a été utilisé pour l'analyse comparative des protéomes totaux (Fig. 2 et 3 - article), et pour la production d'anticorps dirigés contre les protéines identifiées dans les stylets (Table 4 - article). Il comprend **15 protéines** cuticulaires : 4 RR-1, 8 RR-2 et 3 CPAP3. Néanmoins, les peptides « partagés » identifiés pouvaient être assignés à plusieurs protéines dans la famille des CPR. 23 protéines supplémentaires ont ainsi été rajoutées à ce premier listing (1 RR-1 et 22 RR-2) pour un total de **38 protéines**. Ce second listing plus exhaustif nous permettait de tenir compte de l'ensemble des protéines potentiellement localisées dans les stylets et de ne négliger aucun candidat important.

Une fois le répertoire établi, mon rôle dans cette étude était de répondre aux questions suivantes : quelle est la répartition de chaque protéine cuticulaire identifiée dans les stylets (que ce soit dans les stylets mandibulaires et maxillaires) ? Certaines sont-elles localisées au niveau de l'acrostyle ? Et si oui possèdent-elles des peptides directement accessibles en surface de l'organe ? Ceci devait permettre de sélectionner les protéines candidates à caractériser de manière approfondie au cours de ma thèse.

Nous avons produit des anticorps dirigés contre les peptides de protéines cuticulaires identifiées, pour déterminer leur localisation dans les stylets par immuno-marquages et détection en microscopie à

épifluorescence. Les stylets d'adultes étaient disséqués sous loupe binoculaire, positionnés sur lamelle de microscopie et directement incubés avec les anticorps. Nous avons produit et utilisé au minimum deux anticorps différents par protéine. Au total, 32 anticorps ont été testés dans notre étude. Certains étaient spécifiques d'une seule protéine, tandis que d'autres étaient génériques et reconnaissaient des peptides partagés présents dans plusieurs protéines. De plus, des stylets étaient systématiquement traités avec de la chitinase (plusieurs temps d'incubation testés), et les marquages étaient comparés avec des stylets non traités. Ce traitement avait pour but d'éliminer les couches de chitine en surface des stylets, afin de définir si le peptide recherché était enfoui plus ou moins profondément dans de la chitine ou s'il était directement accessible en surface de l'acrostyle. Au total, chaque anticorps a nécessité au minimum 4 lamelles de 40 stylets (au moins deux conditions d'incubation et deux répétitions). C'est au final près de 10 000 stylets qui ont été disséqués, incubés, et observés dans cette étude.

Les immuno-marquages ont permis de valider dans les stylets la totalité des protéines formellement identifiées avec des peptides uniques. Les protéines identifiées à partir de peptides partagés possèdent toutes au moins un à deux peptides détectés dans les stylets.

Cette étude montre que les différentes protéines cuticulaires ne sont pas toutes réparties de manière homogène dans les stylets. Plusieurs peptides appartenant à la sous-famille des RR-2 ont été détectés tout le long des stylets maxillaires. Ils sont faiblement accessibles en surface (**Fig. 5 - article**). Les RR-1 et CPAP3 quant à elles, n'ont été détectées qu'à la pointe des stylets maxillaires.

Nous avons établi le répertoire minimal de l'acrostyle et montré qu'au minimum neuf protéines étaient localisées dans l'acrostyle, dont **cinq** avec des peptides directement accessibles en surface de l'organe (**Fig. 8 - article**). Ce listing minimal comprend :

- **Trois RR-2** dont deux clairement identifiées avec un peptide unique, et une dont l'identité reste à déterminer. Les peptides ciblés par immuno-marquages sont tous retrouvés enfouis dans la chitine.
- **Quatre RR-1** qui possèdent toutes au moins un peptide détecté en surface de l'acrostyle. Les protéines **Stylin-01** (ACYPI009006) et **Stylin-02** (ACYPI003649) avaient déjà été identifiées par l'approche immunologique. Les deux autres ont été renommées **Stylin-03** (ACYPI001610) et **Stylin-04** (ACYPI002877). Il est intéressant de constater qu'une protéine supplémentaire, la protéine ACYPI000308, est très proche de Stylin-04 et ne possède que quelques acides aminés différents (96.5% d'identité entre les deux protéines). Celle-ci a été renommée **Stylin-04bis** et seule l'espèce *A. pisum* possède ces deux protéines quasi-identiques (**Fig. 7 - article**).
- **Deux CPAP3** dont une qui possède un peptide accessible en surface de l'acrostyle. Celle-ci a été renommée **Stylin-05** (ACYPI007911).

Au total, quatre peptides ont été détectés en surface des stylets maxillaires. Stylin-01 et Stylin-02 ont un peptide en commun, le **peptide 1-11** (détecté par l'anticorps anti-1-11), qui est accessible tout le long

de l'acrostyle. Il est impossible de dire si ce peptide traduit la présence de Stylin-01, de Stylin-02, ou des deux protéines à la surface. Le peptide reconnu par anti-1-15 présent chez Stylin-03 est lui aussi accessible tout au long de l'acrostyle. Le peptide reconnu par anti-1-16 présent dans Stylin-04, affleure sur une partie de l'acrostyle, située près du canal alimentaire et du canal salivaire. Ce peptide est également détecté en surface au niveau de l'arrête latérale à l'extrémité distale des stylets. Enfin, le peptide reconnu par anti-3-09 présent dans Stylin-05, est accessible à la surface de l'acrostyle mais seulement en des zones discontinues, le marquage étant visible sous forme de pointillés. Il est intéressant de souligner que les peptides accessibles en surface ne sont pas tous localisés au même endroit dans la séquence des protéines cuticulaires, et peuvent être présents aussi bien à l'extrémité N-terminale que C-terminale des protéines, ainsi que dans les domaines de liaison à la chitine (**Fig. 9 - article**).

2.2. Article 1 : Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the tip of maxillary stylets

Cuticular Structure Proteomics in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* Reveals New Plant Virus Receptor Candidates at the Tip of Maxillary Stylets

Maëlle Deshoux,[‡] Victor Masson,[‡] Karim Arafah, Sébastien Voisin, Natalia Guschinskaya, Manuella van Munster, Bastien Cayrol, Craig G. Webster, Yvan Rahbé, Stéphane Blanc, Philippe Bulet,^{*,‡} and Marilyne Uzest^{*,‡}

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00851>

Read Online

ACCESS |

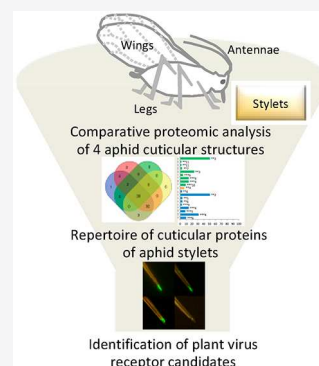
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Aphids are phloem-feeding insects known as major pests in agriculture that are able to transmit hundreds of plant viruses. The majority of these viruses, classified as noncirculative, are retained and transported on the inner surface of the cuticle of the needle-like mouthparts while the aphids move from plant to plant. Identification of receptors of viruses within insect vectors is a key challenge because they are promising targets for alternative control strategies. The acrostyle, an organ discovered earlier within the common food/salivary canal at the tip of aphid maxillary stylets, displays proteins at the cuticle–fluid interface, some of which are receptors of noncirculative viruses. To assess the presence of stylet- and acrostyle-specific proteins and identify putative receptors, we have developed a comprehensive comparative analysis of the proteomes of four cuticular anatomical structures of the pea aphid, stylets, antennae, legs, and wings. In addition, we performed systematic immunolabeling detection of the cuticular proteins identified by mass spectrometry in dissected stylets. We thereby establish the first proteome of stylets of an insect and determine the minimal repertoire of the cuticular proteins composing the acrostyle. Most importantly, we propose a short list of plant virus receptor candidates, among which RR-1 proteins are remarkably predominant. The data are available via ProteomeXchange (PXD016517).

KEYWORDS: cuticle, cuticular proteins, stylets, acrostyle, virus receptor, proteomics, aphid



INTRODUCTION

Aphids are phloem-feeding insects, well-known as major pests in agriculture. More than 5,000 aphid species have been described. They colonize countless plant species and have been reported on 300 plant families ranging from gymnosperms to angiosperms.^{1,2} Aphids have a complex life cycle alternating between sexual and asexual reproduction and seasonal host changes. They are and have long been extensively studied, not only because of interesting life traits such as reproductive and wing polyphenisms but also because they transmit numerous plant diseases.³ With more than 300 species transmitted, aphids are one of the most efficient and important vectors of plant viruses and are the best studied-model to characterize the mechanisms of vector-mediated virus transmission (recently reviewed by Whitfield and colleagues).^{4–7} Most aphid-transmitted viruses bind reversibly to retention sites on the inner cuticle of insect mouthparts to which they remain attached during transport to a new host plant.⁴ This so-called noncirculative virus transmission is particularly difficult to limit and control in field conditions, as the viruses can be acquired and inoculated by nonresident aphids mostly within a single puncture lasting only a few seconds.⁸ During this process, an intimate association occurs between viruses and their vectors. This interaction is highly

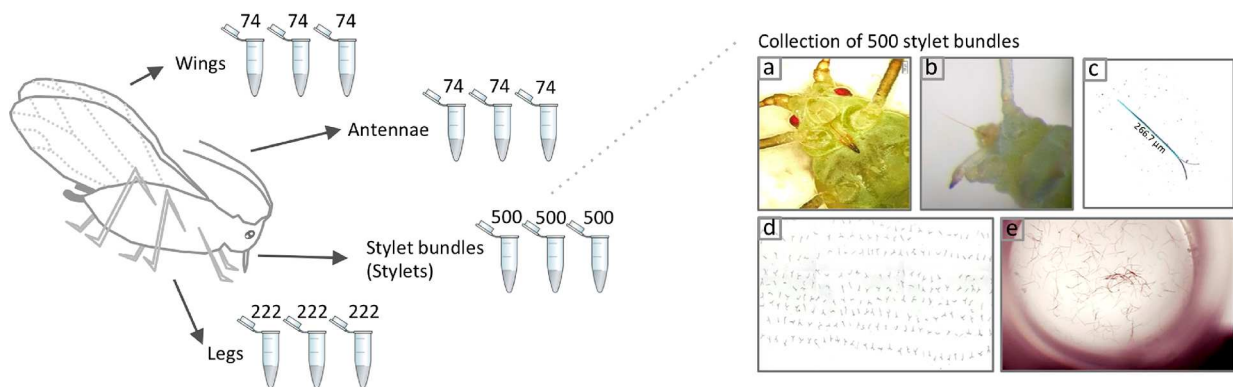
specific and involves the capsid proteins or viral-encoded proteins called helper components, together with poorly characterized molecular compounds in the insect cuticle acting as receptors.^{9–12} These vector molecules are promising targets for alternative viral control strategies, and their identification would help characterizing further the molecular mechanisms of virus–vector interaction.

Aphids have piercing-sucking mouthparts, composed of the short triangular labrum covering the base of the stylet bundle, and the labium, a segmented organ which contracts to facilitate stylets penetration into plant tissues. The stylet bundle arises in the head from its secreting glands and extends outside the head in a dorsal groove of the labium.^{13,14} A pair of external mandibular stylets innervated by two dendrites, surround two (noninnervated) inner maxillary stylets and together form the stylet bundle. Specific anatomical features are visible on both types of stylets. Barb-like ridges are present at the tip of

Received: December 20, 2019

Published: January 28, 2020

A Samples collection



B Sample preparation and trypsin digestion

C NanoLC-MS/MS proteomic analysis, protein identification

Table 1, Supporting Information

D Comparative analyses of the proteomes of the cuticular structures

GO enrichment

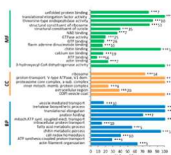


Figure 3, Supporting Information

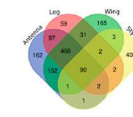
« Core Proteome »
of *A. pisum* cuticular structures

Figure 2, Supporting information

Identification of CPs in cuticular structures

Table 2, Supporting Information

E Identification of putative plant virus receptor candidates in aphid stylets

Comparative CPs profiling

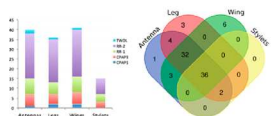
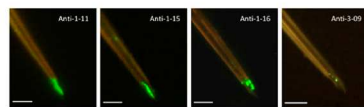


Figure 4, Table 3, Supporting Information

Proteomic composition of the surface of the acrostyle



Figures 5,6,7 & Table 4

Stylins expression profiles (acrostyle-surface proteins)

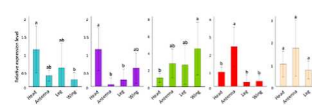


Figure 8

Phylogeny of Stylins and sequences alignments



Figure 9

Figure 1. Experimental workflow to characterize the proteomics composition of the acrostyle and identify plant virus receptor candidates within aphid stylets.

63 mandibular stylets to facilitate penetration into plant tissues.^{15,16}
 64 Maxillary stylets are tightly interlocked by a series of longitudinal
 65 ridges and grooves, which enclose the food and salivary canals
 66 formed by opposing grooves. Food and salivary canals fuse a few

micrometers from the tip, leading to the confluent common
 food/salivary canal, that has long been believed to harbor
 receptors of noncirculative viruses.^{8,17–20} The existence of such
 receptors has definitely been evidenced with *Cauliflower mosaic* 70

71 virus (CaMV), which was shown to bind to cuticular proteins
72 (CPs) accessible at the tip of maxillary stylets, at the surface of a
73 specific organ designated the acrostyle.²¹ This organ is a distinct
74 anatomical structure restricted to a region of the common canal.
75 Its surface properties are different from the rest of the stylet
76 cuticle.²² Antibodies targeting CPs from the CPR family—the
77 largest CP family widespread among arthropods and containing
78 the Rebers and Riddiford (RR) consensus sequence—allowed
79 the detection of several peptides from RR-1 and RR-2 subgroups
80 in the acrostyle.^{22–26} More specifically, two highly homologous
81 RR-1 proteins, Stylin-01 and Stylin-02, have been localized in
82 the organ with a peptide corresponding to their common C-
83 terminus sequence directly accessible at the surface. *In vitro*
84 competition assays and *in vivo* silencing approaches indicated
85 that Stylin-01 was involved in CaMV transmission.²⁶ However,
86 its role in the transmission of other noncirculative viruses could
87 not be established, and there is currently no evidence for a
88 common receptor of all noncirculative viruses. The acrostyle has
89 a complex proteomic composition and contains at least two RR-
90 1 and several RR-2 proteins which could not be specifically
91 identified.²⁵ Many RR-2 have nearly identical sequences that are
92 not distinguishable by specific antibodies, highlighting the limit
93 of an immunolabeling approach to comprehensively determine
94 the proteome of aphid stylets, and the need for larger scale
95 proteomic characterization.

96 Annotated CPs in the genome of the pea aphid *Acyrtosiphon*
97 *pisum* account for 150 proteins. They have been assigned to six
98 distinct CP families according to their conserved consensus
99 motifs: 125 CPR (15 RR-1 and 110 RR-2), 11 CPAP1, 8
100 CPAP3, 3 TWDL, 2 CPF, and 1 CPCFC proteins.²⁷ Up to now,
101 mass-spectrometry (MS)-based proteomics on stylet bundles
102 was inconceivable considering the size of these appendages.
103 Moreover, studies of the proteomic composition of larger
104 cuticular structures have not been reported for aphids. However,
105 the recent advances in MS approaches allowing the extraction of
106 CPs from small quantities of insect tissues now make stylet
107 proteomics a realistic objective.²⁷

108 Our aim in this proteomics study was to identify through a
109 bottom-up approach proteins and related peptides accessible at
110 the surface of aphid stylets that might play a key role in plant
111 virus binding. To draw-up a list of stylet-specific CPs, we first
112 developed a comparative analysis of the proteomes of four
113 distinct pea aphid tissues partially composed of cuticle:
114 antennae, legs, wings, and stylets. In a second phase, we
115 produced antibodies targeting peptides from the stylet CPs
116 identified by proteomics to refine their localization within stylets
117 through *in situ* immunolabeling. As a result, we here provide a
118 short list of plant virus receptor candidates highly conserved
119 among aphid species and characterize their expression pattern in
120 various body parts and throughout aphid developmental stages.
121 These candidate receptors, named Stylins, have a patchy
122 distribution within and along aphid stylets but are emerging at
123 the surface of the acrostyle. Most have a RR-1 type chitin-
124 binding domain, highlighting the remarkable accessibility of CPs
125 of this subgroup at the surface of the cuticle.

126 ■ EXPERIMENTAL PROCEDURES

127 The experimental design and the organization of the
128 presentation of the results are summarized in the workflow
129 shown in Figure 1.

Chemical Reagents

130

For sample preparation, all reagents were purchased from
Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) except RapiGest SF surfactant
purchased from Waters (Milford, MA). For LC-MS/MS
analysis, formic acid was obtained from Fluka (Sigma-Aldrich,
St. Louis, MO), Milli-Q water from Merck (Merck Millipore,
Billerica, MA), and all other chemicals were purchased from
Carlo-Erba Reagents (Val de Reuil, France). Modified
sequencing-grade trypsin (Promega Corporation, Madison,
WI) was used for protein digestion.

Aphid Clones

140

A colony of *Acyrtosiphon pisum* (LL01) was maintained on
Vicia faba cv Robin Hood in an environmental growth chamber
at 23/18 °C (day/night) with a photoperiod of 16/8 h (day/
night). *Myzus persicae* Sulzer was maintained on *Solanum*
melongena cv Barbantane in the same temperature/photoperiod
conditions.

Tissue Collection for Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Analyses

147

148

Alate *A. pisum* adults collected from *Vicia faba* plants were
starved for 1 h and stored at –20 °C for several hours before
dissection. Collection of antennae, legs, and wings did not
present any technical difficulties. These appendages were
collected in triplicate for each structure, each replicate
comprising antennae, wings, or legs from 37 insects. Stylet
bundles, hereafter named stylets, are approximately 700 μm in
length and 3 μm in diameter for *A. pisum* adults. They are
anchored in aphid heads in the glands from which they are
secreted, the retort organs (described by Ponsen and
Guschinskaya and colleagues).^{14,28} To extract exploitable
information from MS analysis, hundreds of stylets had to be
pooled for each trial as free as possible of other contaminating
aphid tissues. In addition, we had to reduce electrostatic charges
that too often induced stylets fly off and loss. For these reasons, a
“clean-stylet” dissection protocol compatible with MS standards
had to be specifically designed (Figure 1A). Frozen aphids were
first glued on their back onto a microscope slide using double-
sided bonding tape (Figure 1Aa). Stylets were then pulled out
from the labium under a stereomicroscope using tungsten insect
pins (Figure 1Ab), separated from the head with microscissors
(Figure 1Ac), and then transferred onto a conductive glass slide
(ITO, Bruker Daltonik, Germany), allowing secured accumu-
lation of stylets (Figure 1Ad). Dissecting tools were carefully
washed with water, followed by 70% ethanol, and finally dried on
lint-free paper after each stylet collection. Once 500 stylet
bundles had been accumulated onto the ITO-slide, they were
carefully transferred with a fine needle into a single glass
microtube, avoiding static charge effects, allowing control of the
number of appendages deposited per tube (Figure 1Ae). This
protocol was systematically used to collect three independent
batches of 500 stylets each.

Sample Preparation

181

All cuticular structures were prepared according to the same
protocol. Samples were first washed for 15 min with Milli-Q
water and 50% acetonitrile (ACN), both acidified with 0.1%
trifluoroacetic acid (TFA) (v/v, final concentration). Super-
natants were then removed after centrifugation, and the
cuticular structures dried out by centrifugation under vacuum
(Labconco, Kansas City, USA). All anatomical structures were
then treated as described previously.²⁷ Briefly, proteins were
extracted by successive incubations in pure hexafluoroisopropyl-

191 nol (HFIP) and in 50 mM ammonium bicarbonate
192 supplemented with 0.1% RapiGest. After reduction and
193 alkylation, proteins were submitted to trypsin digestion. Finally,
194 digested samples were dried out and resuspended in 2% ACN/
195 0.1% TFA (v/v) prior to mass spectrometry (MS) analysis.

196 Nano Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass 197 Spectrometry (nanoLC-MS/MS) Analysis

198 NanoLC-MS/MS was carried out using an Ultimate 3000
199 nanoHPLC (Thermo Scientific, Germany) for the separation,
200 hyphenated to a Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer
201 (Thermo Scientific). For chromatography, the digested samples
202 were loaded, concentrated, and washed at 10 μ L/min for 6 min
203 with 2% ACN and 0.05% TFA on a microconcentrating column
204 (300 μ m \times 5 mm PepMap 100, C₁₈, 5 μ m, Thermo Scientific).
205 The separation was performed on a reversed-phase column (75
206 μ m \times 250 mm Acclaim PepMap 100, C₁₈, particle size 3 μ m
207 nanoviper column from Thermo Scientific). The LC mobile
208 phases for the separation were water (A) and ACN (B), each
209 supplemented with 0.1% formic acid (v/v). Separation was
210 achieved at a flow rate of 300 nL/min using a biphasic linear
211 gradient from 2% to 32% B in 100 min and from 32% to 65% B in
212 5 min. MS analysis was carried out in positive ion and data-
213 dependent modes. The voltage applied to the nanotips (Nano
214 Objective, USA) was approximately 2.0 kV, and the header was
215 at 300 °C. Full scan (MS) spectra were obtained from 380 to
216 2,000 m/z (70,000 resolution, AGC target 3×10^6 , maximum IT
217 200 ms), and for each full-scan the most intense ions (Top 10)
218 were fragmented in MS² (17,500 resolution, AGC target 2×10^5 ,
219 maximum IT 100 ms, intensity threshold 4×10^4 , excluding
220 charge-unassigned ions, Normalized Collision Energy selected
221 at 27). Parent ions were then excluded from MS/MS for the next
222 15 s. The softwares Chromeleon Xpress (Thermo Fisher
223 Scientific) was used to control the HPLC, and Xcalibur 2.2
224 (Thermo Fisher Scientific) to control the mass spectrometer.

225 Database Searching and Protein Identification

226 The Sequest HT searching algorithm was run by Proteome
227 Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) to match the acquired
228 MS/MS spectra to a protein database, with the following
229 settings: trypsin digest with two maximum missed cleavages, 6
230 and 144 amino acids as minimum and maximum peptide length,
231 respectively, a tolerance of 10 ppm/0.02 Da for precursors and
232 fragment ions, respectively. Cysteine carbamidomethylation was
233 set as a fixed modification; C-terminal protein amidation and
234 methionine and tryptophan oxidation were set as variable
235 modifications.

236 Searches were performed against combined proteome
237 databases (Table S1) including: (i) the pea aphid proteome
238 (<http://aphidbase.com>, version 2.0 containing 33,291 protein-
239 coding sequences); (ii) an eubacterial reference proteome setup
240 for putative symbionts and aphid microbiome-related sequences
241 (116,983 sequences); (iii) a set of sequences of entomopatho-
242 genic fungi (28,431 sequences); (iv) a set of viral sequences
243 including aphid viruses and aphid-vectored broad-bean viruses
244 were also selected (6,614 sequences); (v) a mixed plant
245 proteome assembled from available *Fabaceae* proteomes
246 (66,777 sequences); and (vi) a set of common contaminants
247 (116 sequences).

248 A homemade *A. pisum* CP database comprising 150 annotated
249 CPs was constructed using the Cuticular Protein Family
250 Prediction Tool CutProtFam-Pred ([http://aias.biol.uoa.gr/
251 CutProtFam-Pred/home.php](http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/home.php)) to accurately detect and classify
252 putative CPs present in the pea aphid proteome v2.0, thanks to

known consensus and semiconsensus sequences (Table S2).²⁹ 253
Identification of CPs in cuticular structures was carried out with 254
this homemade database. 255

Data Presentation 256

To identify the proteins that are present in pea aphid cuticular 257
anatomical structures, pools of antennae, wings, legs, and stylet 258
bundles were collected in triplicate on *A. pisum* adults. Proteins 259
consistently identified in all three biological replicates with at 260
least a same peptide in each replicate, regardless of being 261
“Unique” (peptide present in only one protein) or “Shared” 262
(peptide present in multiple different proteins), were considered 263
as confidently identified and constituted whole proteomes of the 264
cuticular structures. In these first data sets, proteins sharing a 265
same identified peptide were grouped under a single protein 266
identifier (accession number corresponding to the protein with 267
the highest score and highest percentage of coverage of the 268
protein. These parameters can differ from one sample to 269
another, and a same “shared” peptide may be assigned to 270
different protein identifiers by the algorithm). Comparative 271
analyses of whole proteomes were carried out using these data 272
sets. 273

Minimal lists of CPs were then retrieved from whole 274
proteomes using homemade CP database (Table S2). *Minimal* 275
lists represent the smallest number of CPs that can explain all 276
identified MS peptides and will be used to design peptides for 277
antibodies production and immunolabeling of dissected stylets. 278
However, CPs can share high sequence similarity, particularly 279
proteins of the CPR family.^{26,30–33} Several proteins can be 280
identified with a same tryptic fragment (“shared” peptide). In 281
this case, we cannot tell how many of these proteins are actually 282
incorporated into the cuticle of the anatomical structures. To be 283
fully exhaustive in our quest for virus receptor candidates, lists of 284
CPs *potentially present* in cuticular structures were extended to 285
all proteins containing these “shared” peptides. 286

Functional Classification 287

Gene Ontology (GO) terms were assigned to AphidBase 2.0 288
([http://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/acyrthosiphon_](http://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/acyrthosiphon_pisum/downloads/)
289 [pisum/downloads/](http://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/acyrthosiphon_pisum/downloads/)) via Blast2GO software version 5.1.12 using
290 the InterProScan with the Hidden Markov Models (HMMs) 291
present in the PFAM protein family database.³⁴ The number of 292
proteins identified in each cuticular structure was compared to 293
all corresponding functionally GO annotated terms in the entire 294
pea aphid (*A. pisum*). GO term enrichment was determined via 295
Fisher's Exact test at an FDR, p-value ≤ 0.05 ; the reduced 296
enrichment was determined at an FDR, p-value ≤ 0.01 . 297

Antibodies 298

A total of 26 antibodies were used to immunolabel aphid stylets. 299
Eleven antibodies were already available from previous 300
studies.^{22,25,26} In addition, 15 peptides of 13–16 amino acids 301
length with sequences originating from peptides retrieved from 302
MS analyses (either “Unique” or “Shared” peptides), or 303
originating from the full-length sequences of the proteins 304
identified in this study were synthesized by Eurogentec ([http://](http://www.eurogentec.com)
305 www.eurogentec.com). Eurogentec also carried out the 306
production of antibodies in rabbit and the affinity purification 307
of the antisera. Alexa Fluor 488-conjugated antirabbit IgG 308
(A11070, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) were used as 309
secondary antibodies. 310

Immunolabeling of Dissected Stylets 311

A. pisum and *M. persicae* stylets were dissected and 312
immunolabeled according to Webster and colleagues, using 313

314 primary antibodies at dilutions of 1:200 and secondary Alexa
315 fluor-conjugated antibody at a dilution of 1:400.²⁵ Stylets were
316 either untreated or treated with 2 U/mL of Chitinase from
317 *Streptococcus griseus* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) before their
318 incubation with primary antibodies, as described by Uzest and
319 colleagues, to eventually reveal epitopes that could be localized
320 under the surface layers of the stylet cuticle.²¹ When no labeling
321 was observed after 15 min of digestion, the Chitinase treatment
322 was extended to 30 and 60 min. Two independent repeats were
323 performed per condition and per antibody.

324 Quantification of Stylin Transcripts in Various Tissues and 325 at Different Developmental Stages

326 Transcripts of stylins were quantified in the heads of all *A. pisum*
327 nymphal instars (N1 to N4) and adult stages and in different
328 tissues. Insect tissues (antennae, legs, wings, and antenna-free
329 heads as a proxy for stylet synthesizing glands) were collected
330 from adults under a stereomicroscope. Six pools of 10 aphids/
331 tissues were tested per condition. Total RNA was extracted from
332 whole aphids or dissected tissues using an RNeasy minikit
333 (Qiagen, Hilden, Germany). A total of 80–100 ng of RNA was
334 treated with RQ1 RNase-free DNase I (Promega Corporation,
335 Madison, WI). First-strand cDNA was synthesized using
336 Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase
337 (Promega Corporation) according to the manufacturer's
338 instructions, with oligo(dT) as primers. All RT-qPCRs were
339 performed in duplicates on a LightCycler 480 instrument
340 (Roche, Basel, Switzerland) using 1:4 diluted cDNAs and a
341 LightCycler 480 SYBR green I master mix (Roche, Penzberg,
342 Germany) according to the manufacturer's recommendations
343 with gene-specific primers (Table S3). Two internal reference
344 genes encoding actin and elongation factor 1 α (EF1 α) from *A.*
345 *pisum* were used for normalization. Amplification efficiencies
346 were analyzed with LinRegPCR free software (v. 2014.5).
347 Relative expressions were calculated using the threshold cycle
348 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method.³⁵

349 Alignments and Phylogenetic Analyses

350 Sequences encoding stylin proteins were retrieved from the
351 seven genomes available on AphidBase (<http://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/>)—*Myzus persicae* (Mp; clone G006), *Myzus*
353 *cerasi* (Mce), *Rhopalosiphum padi* (Rp), *Diuraphis noxia* (Dn),
354 *A. pisum* (Ap), *Daktulosphaira vitifoliae* (Dv), *Aphis glycines* (Ag;
355 Biotype 4)—using CutprotFam-Pred with standard set-
356 tings.^{29,36–39} Among these sequences, 17 were manually curated
357 for the present study.

358 After removal of the predicted signal peptides using the
359 SignalP-5.0 server, CPR_RR-1 mature protein sequences were
360 used in phylogenetic analyses.⁴⁰ For CPAP3 proteins, full
361 sequences were used in phylogenetic analyses. Sequences were
362 aligned using MUSCLE (v3.8.31) configured for highest
363 accuracy (MUSCLE with default settings).⁴¹ Ambiguous
364 regions (i.e., containing gaps and/or poorly aligned) were
365 removed with Gblocks (v0.91b) using the following parameters:
366 minimum length of a block after gap cleaning: 10, no gap
367 positions were allowed in the final alignment and all segments
368 with contiguous nonconserved positions bigger than eight were
369 rejected, minimum number of sequences for a flank position:
370 85%. Phylogenetic trees were reconstructed using the maximum
371 likelihood method implemented in the PhyML program (v3.1/
372 3.0 aLRT). The WAG matrix, which works as empirical amino-
373 acid substitution model to simulate the biological sequence
374 evolution with flexibility, was selected assuming an estimated
375 proportion of invariant sites (of 0.009) and four gamma-

distributed rate categories to account for rate heterogeneity
376 across sites. The gamma shape parameter was estimated directly
377 from the data ($\gamma = 3.517$). Reliability for internal branch
378 was assessed using the aLRT test (SH-Like). Graphical
379 representation and edition of the phylogenetic trees and
380 alignments were performed with TREEDYN (v. 198.3) and
381 the T-Coffee software, respectively.^{42–44} 382

383 RESULTS

384 Comparative Analyses of the Proteome of Four Cuticular 385 Structures of the Pea Aphid *A. Pisum*

386 To identify stylet-specific CPs, we first characterized and
387 compared the proteomes of four cuticular structures: two
388 muscular articulated segmented tissues, antennae and legs;
389 wings which are outgrowths of the exoskeleton; and stylet
390 bundles comprising two mandibular stylets harboring dendrites
391 and two maxillary stylets that are cell-free cuticular structures.
392 6,574 peptides were identified in antennae, 6,025 in legs, and
393 7,242 in wings, which were specifically assigned to 971, 749, and
394 910 proteins. In stylets, a smaller number of 1,118 peptides were
395 identified and assigned to 141 proteins (Table 1, Tables S4–

Table 1. Summary of Proteins Identified in *Acyrtosiphon pisum* Cuticular Structures: (A) All Peptides and Proteins Recovered from LC-MS/MS Analyses; (B) Peptides and Proteins Assigned to *A. pisum* Proteome (*A. pisum* ID) Recovered from LC-MS/MS Analysis; (C) Cuticular Proteins (CPs) Assigned to *A. pisum* Recovered from LC-MS/MS Analysis^a

		Antennae	Legs	Wings	Stylets
A	Total # of peptides identified	6590	6040	7260	1119
	Total # of unique peptides identified	6304	5786	6942	1056
	Total # of proteins identified	987	762	927	142
B	Total # of peptides identified (<i>A. pisum</i> ID)	6574	6025	7242	1118
	Total # of unique peptides identified (<i>A. pisum</i> ID)	6288	5771	6924	1055
	Total # of proteins (<i>A. pisum</i> ID)	971	749	910	141
C	Total # of CPs identified—minimal list ^b	39	36	41	15
	Total # of CPs identified—ungrouped ^c	78	77	77	38
	Ratio CPs ^c /Total # of proteins (<i>A. pisum</i> ID) %	4.0	4.8	4.5	10.6

^a#, number; CPs, Cuticular Proteins; ID, identifier. ^bSmallest number of cuticular proteins that can explain all observed peptides recovered from LC-MS/MS analysis. ^cAll cuticular proteins recovered from LC-MS/MS analysis identified with “Unique” peptides and “Shared” peptides.

396 S7). Proteins identified in legs, antennae, and wings represent
397 2.2–2.9% of the whole *A. pisum* proteome, while proteins
398 identified in stylets represent only 0.4%. Of the 1,273 proteins
399 identified in this study, 90 were found in all four cuticular
400 structures (7%) and constitute what we hereafter refer to as the
401 “core proteome” of cuticular structures. 426 proteins were found
402 to be structure-specific (33%), with 162, 59, 165, and 40
403 proteins solely identified in antennae, legs, wings, and stylets,
404 respectively (Figure 2A, Table S8).

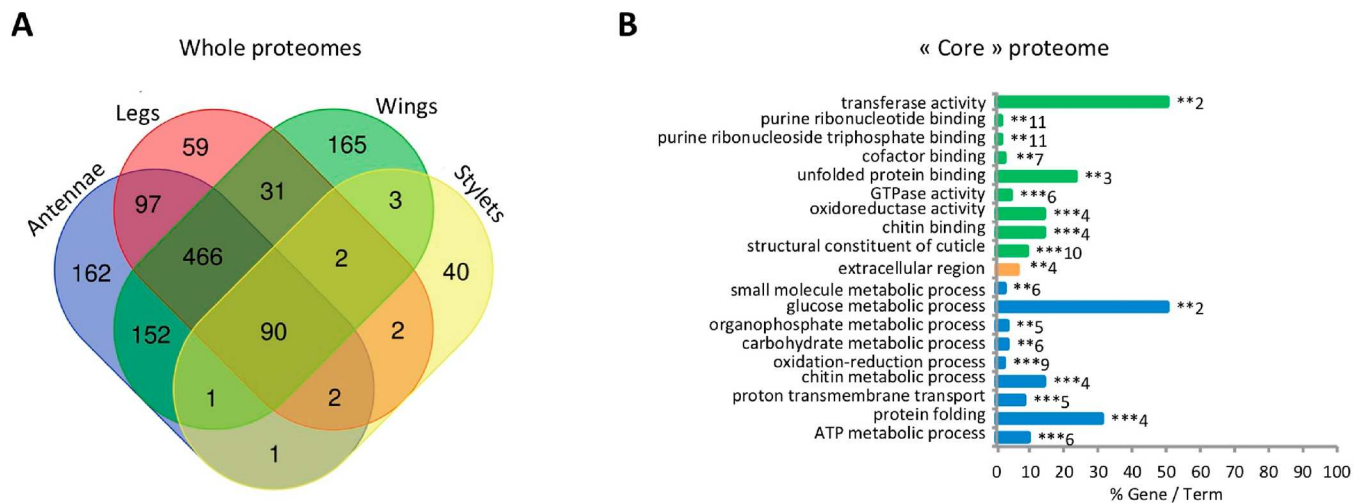


Figure 2. Core proteome of *A. pisum* cuticular structures. (A) Venn diagram showing the proteins identified in the four cuticular structures. 90 proteins found in all structures represent the “Core Proteome”. (B) GO terms enriched in the Core Proteome set. Histograms represent significantly enriched functional terms in Molecular Function (green), Cellular Component (orange), and Biological Process (blue). Bars represent the proportion of genes (%) enriched in the corresponding functional groups. Numbers of genes enriched for each functional group are displayed on the bars. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. See also Table S9.

As expected for cuticle-containing insect body parts, the GO terms overrepresented in the core proteome were related to the extracellular region and were significantly enriched in cuticle-related functions and the sclerotization process. Hence, categories such as structural constituent of cuticle, chitin binding, carbohydrate metabolic process, chitin metabolic process, oxidoreductase activity, and oxidation-reduction process were overrepresented (Figure 2B, Table S9). Other categories related to unfolded protein binding or small molecules binding, metabolic processes, proton transmembrane transport, transferase or GTPase activities were also identified. Proteomes of antennae, legs, and wings were enriched in functions related not only to the extracellular region but also to categories associated with intracellular compartments such as ribosome, proteasome, mitochondria, and vesicles (Figure 3A–C, Tables S10–S12). More categories were overrepresented in these three structures compared to aphid stylets (31–41 categories vs 16 categories, respectively; see Figure 3A–D). Notably, the chitin metabolic process category is not specially enriched in stylets (Figure 3A–D), emphasizing the strictly extracellular origin of stylet cuticle, while the other appendages contain the chitin-synthesizing epithelia and its intracellular functions. Apart from cuticle-related functions, antennae, legs, and wings contained proteins with commonly enriched functions associated with protein synthesis, protein folding, intracellular trafficking, and small molecules binding. In comparison, categories enriched in stylets were mostly related to cuticle synthesis or sclerotization pathways (Figure 3D, Table S13). Not surprisingly, our data sets highlighted differences in proteomic composition between nearly exclusively cuticle-based structures (i.e., stylets) and only partly cuticle-based tissues also including cellular machineries (i.e., antennae, legs, and wings) (Figure 3E).

Stylet-Specific Proteins

Forty stylet-specific proteins have been identified in our MS data sets (Figure 2A, Table S8), most of which were not previously annotated. Although not possible to ascertain, at least 13 of these stylet-specific proteins (32.5%) likely came from the saliva remaining in the salivary canal after dissection of stylet bundles.

Consistent with this hypothesis, 12 out of these 13 proteins have already been reported in the pea aphid sialome (Table S8), and one is a predicted secreted peroxidase, an enzyme found in aphid saliva.^{45–49} Two cuticle-related proteins were only present in the stylets data sets, one trehalase (ACYPI007462) reported to play a role in several processes, including chitin biosynthesis in other insects, and one RR-2 protein (ACYPI006670).⁵⁰ Whereas the saliva-related proteins and trehalase were identified with unique peptides not detected in the three other cuticular structures, the RR-2 protein was solely identified from two shared peptides (GSYSLEADGSTR and TVEYTADDYNGFNNAVVK), also identified in antennae, legs, and wings. Because these peptides have been assigned to ACYPI006670 in the stylets, but to other RR-2 proteins in antennae, legs, and wings by the data search program (Tables S14–S17), we cannot strictly conclude that this protein (ACYPI006670) is stylet-specific.

Distribution of the Identified CPs in the Different Investigated Cuticular Anatomical Structures

Minimal lists of CPs recovered by MS analyses comprise 39 CPs in antennae, 38 CPs in legs, 41 CPs in wings, and 15 CPs in stylets (Tables 1 and 2, Tables S14–S17). No peptides from the CPF and CPCFC families were identified in any cuticular structure. The representation of distinct CPs families was similar in antennae, legs, and wings (Figure 4A, Table 3), with proteins of the CPR (RR-1 and RR-2), CPAP1, CPAP3, and TWDL families. In stylets, only two protein families were represented, CPR (RR-1 and RR-2) and CPAP3.

RR-2 proteins were the most abundant in all structures and were often identified with shared peptides (Table 2). RR-1 and TWDL proteins were identified either with shared or with unique peptides. Finally, CPAP1 and CPAP3 were only identified with unique peptides (Table 3). The number of CPs unequivocally identified with unique peptides was 26, 26, 30, and 9 in antennae, legs, wings, stylets, respectively. Comparative analysis of CPs potentially present in cuticular structures indicated that only a few proteins were restricted to a single structure: one CPAP3 in antennae (ACYPI001579), one CPAP1 (ACYPI004632), and two RR-2 in legs (ACYPI006712 and ACYPI003698), one CPAP1 482

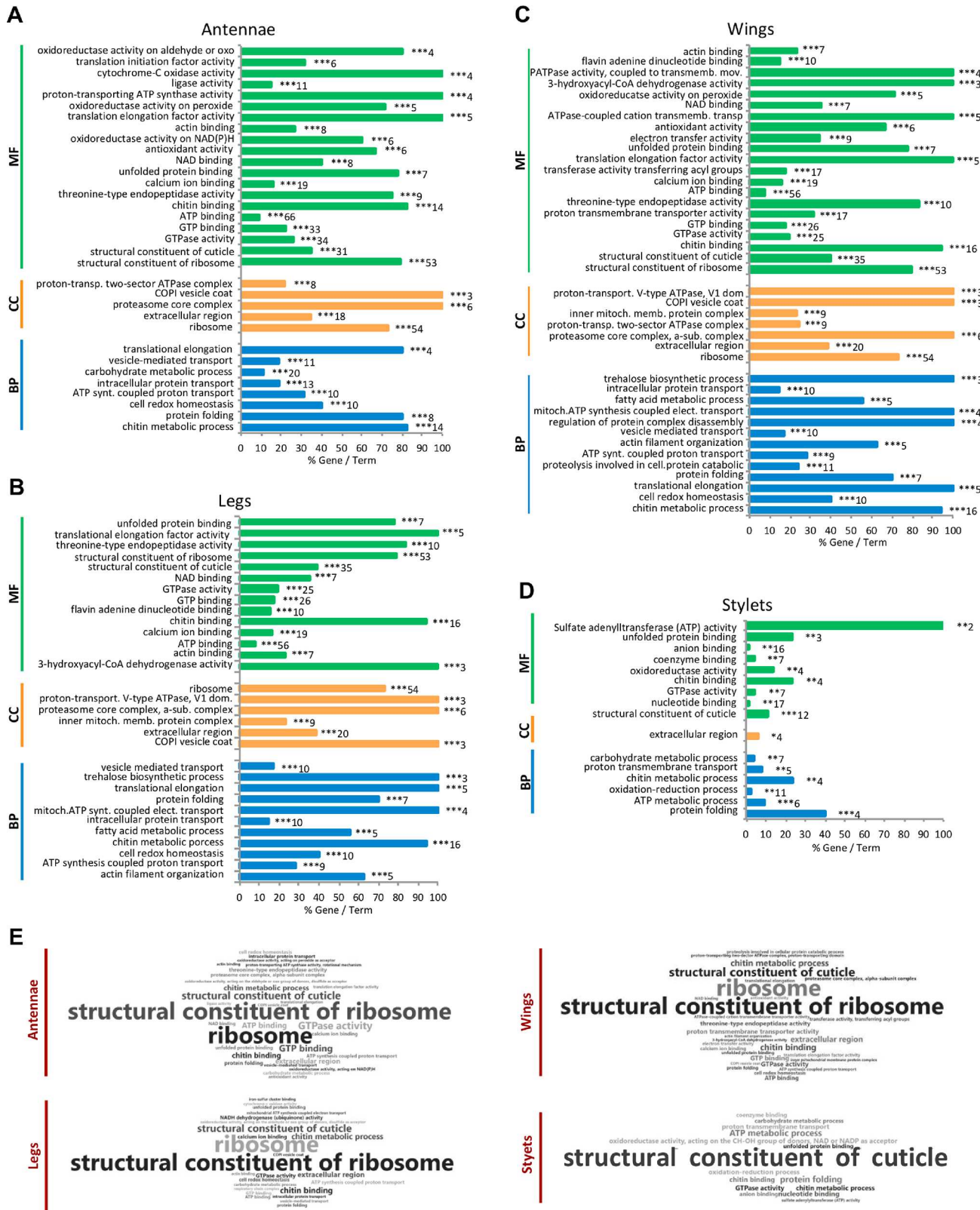


Figure 3. Comparative analysis of GO terms enriched by identified proteins in antennae, legs, wings, and stylets of *A. pisum*. (A–D) Comparison of identified proteins in the four cuticular structures for Molecular Function (MF, green), Cellular Component (CC, orange), and Biological Process (BP, blue). Histograms represent significantly enriched functional terms in antennae (A), legs (B), wings (C), and stylets (D). Bars represent the proportion of enriched genes encoding the identified proteins compared to all genes involved in the specified GO terms (%Gene/Term). Numbers of genes enriched for each functional group are displayed on the bars. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. (E) WordClouds summarize the functional profiles of each cuticular anatomical structure. See also Tables S10–S13.

Table 2. Exhaustive List of Cuticular Proteins Identified in the Four Cuticular Structures^a

Protein ID	Antennae	Legs	Wings	Stylets	Stylin ID
ACYPI000308-PA	S	S		S	Stylin-04bis
ACYPI000461-PA	S	U	S		
ACYPI000583-PA			U		
ACYPI000670-PA			U		
ACYPI000849-PA	U	U	U		
ACYPI000889-PA	U	U	U		
ACYPI000890-PA	U	U	U		
ACYPI000961-PA	S	S			
ACYPI000983-PA	S	S	S	S	
ACYPI001278-PA	U	U	U		
ACYPI001451-PA	S	S	S		
ACYPI001579-PA	U				
ACYPI001599-PA	U	U	U	U	
ACYPI001610-PA	U	U	U	U	Stylin-03
ACYPI001644-PA	S	S	S	S	
ACYPI001681-PA	S		U		
ACYPI001775-PA			U		
ACYPI002106-PA	S	S	S		
ACYPI002243-PA	S	S	S	S	
ACYPI002781-PA	U	U	U		
ACYPI002877-PA	S	S		S	Stylin-04
ACYPI002889-PA	S	S	S	S	
ACYPI003649-PA	U	U	U	U	Stylin-02
ACYPI003698-PA		S			
ACYPI004093-PA	U	U	U		
ACYPI004114-PA	S	S	U	S	
ACYPI004632-PA		U			
ACYPI004810-PA	S	S	S	S	
ACYPI004893-PA	S	S	S	S	
ACYPI004943-PA	S	S	S	S	
ACYPI005387-PA	S	S	S	S	
ACYPI006015-PA			U		
ACYPI006031-PA	U	U	U	U	
ACYPI006045-PA	S	S	S	S	
ACYPI006175-PA	S	S	S		
ACYPI006519-PA	U	S	U		
ACYPI006670-PA	S	S	S	S	
ACYPI006712-PA		U			
ACYPI006791-PA	S	S	S		
ACYPI007858-PA	U	U	U	U	
ACYPI007860-PA	U	U	U	U	
ACYPI007911-PA	U	U	U	U	Stylin-05
ACYPI007927-PA	S	S	S	S	
ACYPI008113-PA	U		U		
ACYPI008534-PA	S	S	S	S	
ACYPI008570-PA	U	U	S	S	
ACYPI008661-PA	S	S	S		
ACYPI009006-PA	U	U	U	U	Stylin-01
ACYPI009152-PA	U	U	U		
ACYPI009260-PA	S	S	S		
ACYPI009356-PA	U	U	U		
ACYPI009491-PA	U	U	U		
ACYPI009786-PA	U	U	U		
ACYPI009803-PA	S	S	S	S	
ACYPI009804-PA	S	S	S	S	
ACYPI009812-PA	S	S	S		
ACYPI009832-PA	S	S	S	S	
ACYPI0060836-PA	S	S	S		
ACYPI0060840-PA	S	S	S	S	
ACYPI0062590-PA	S	S			
ACYPI0064288-PA	U	U	U	S	
ACYPI0064297-PA	S	S	S	S	
ACYPI0064298-PA	S	S	S		
ACYPI0065206-PA	S	S	S	S	
ACYPI0065224-PA	S	S	S		
ACYPI0066081-PA	S	S			
ACYPI0066082-PA	S		S		
ACYPI0066095-PA	U	U	U	U	
ACYPI0070504-PA	S	S	S		
ACYPI0071344-PA	S	S	S	S	
ACYPI0071387-PA	S	S	S	S	
ACYPI0072004-PA	S	S	S		
ACYPI0072111-PA	S	S	S		
ACYPI0073031-PA	S	S	S	S	
ACYPI0073034-PA	S	S	S		
ACYPI0073043-PA	S	S	S		
ACYPI0073896-PA	S	S	S	S	
ACYPI26371-PA	S	S	S	S	
ACYPI35881-PA	S	S	S		
ACYPI45536-PA			U		
ACYPI48369-PA	U	U			
ACYPI56614-PA	S	S	S		
ACYPI56619-PA	S	S	S		
ACYPI56617-PA	S	S	S		
ACYPI56620-PA	S	S	S	S	
ACYPI56622-PA	S	S	S	S	
ACYPI56625-PA	U	U	U		

CPR_RR-1	Green
CPR_RR-2	Grey
CPAP1	Yellow
CPAP3	Orange
TWDL	Blue

(ACYPI45536), one CPAP3 (ACYPI000583), one RR-1 483 (ACYPI001775), three RR-2 in wings (ACYPI000670, 484 ACYPI001681, ACYPI006015), and none in the stylets (Figure 4B, Table 2, Table S18). 485

Localization of RR-1 Proteins in the Stylets

To confirm the presence of the 38 CPs identified by MS in aphid 488 stylets and to give information on their localization and 489 accessibility, *A. pisum* stylets were dissected and immunolabeled 490 with antibodies targeting peptides from these proteins (Table 4). All CPs located in the acrostyle with peptides directly 491 t4 accessible at its surface will be renamed stylins. 492 t4

Four to five RR-1 proteins were identified in our MS analyses 493 (Table S17) including Stylin-01 (ACYPI009006) and Stylin-02 494 (ACYPI003649). These two stylins have previously been 495 detected in *A. pisum* stylets using specific antibodies.²⁶ 496

A third RR-1 protein, ACYPI001610, was identified with a 497 unique peptide of 13 AA covering 10.8% of the mature protein 498 (Table 4, Table S17). This peptide could not be detected with 499 an anti-1-03 specific antibody in our experimental conditions 500 despite extensive Chitinase digestion treatment (Figure 5A). 501 Three additional antibodies targeting distinct peptides of 502 ACYPI001610, anti-1-04, anti-1-15, and anti-1-17 were then 503 used to detect this protein in aphid stylets (Table 4). Anti-1-04 504 and anti-1-17 antibodies revealed their corresponding peptides 505 at the tip of aphid maxillary stylets in the common canal and on 506 the lateral edge of the stylet. Labeling was only observed after 507 preincubation of stylets with Chitinase, indicating that these two 508 peptides were embedded in the chitin matrix (Figure 5A). A 509 stronger labeling was observed when using anti-1-15 antibody, 510 which labeled evenly the acrostyle without the need for 511 Chitinase treatment. Noticeably, the targeted peptide VEGGY- 512 SYTAPDGTPI is part of the RR-1 chitin-binding domain, and 513 its labeling decreased upon Chitinase digestion (Figure 5A). 514 The protein ACYPI001610 is thus accessible at the surface of the 515 acrostyle and was renamed Stylin-03. 516

The fourth RR-1 protein, ACYPI002877, was identified by 517 MS analyses with two shared peptides also found in 518 ACYPI000308 (Table 4, Table S17). These two proteins are 519 96.5% identical and cannot be distinguished by immunolabeling. 520 Anti-1-14 antibody, which targets the peptide GSYTFGYQ- 521 SADGTQR, labeled the acrostyle and the lateral edge tip of 522 maxillary stylets of the stylet tip after a Chitinase treatment. The 523 other identified peptide detected in our MS data sets (Table 4, 524 Table S17) and present within the N-terminus of the two 525 proteins was directly accessible at the surface of the upper part of 526 the acrostyle in close vicinity of the food canal and on a lateral 527 edge by anti-1-16 antibody (Figure 5A). At least one of these 528 two RR-1 proteins is thus present in the acrostyle, and they have 529 consequently been renamed Stylin-04 and Stylin-04bis. 530

Localization of RR-2 Proteins in the Stylets

Eight to 30 RR-2 proteins have been identified in stylets, among 531 which only three were identified by unique peptides. Due to high 532 sequence similarities, even unique peptides were sometimes 533 nearly identical to others present in distinct RR-2 proteins and 534 could not be distinguished by immunological approaches. 535

Solely two RR-2 proteins were unambiguously detected in the 536 acrostyle. ACYPI0066095, identified with four peptides, was 537 detected with anti-2-16 specific antibody. The unique peptide 538 targeted by this antibody was found embedded in the acrostyle, 539 only revealed after Chitinase treatment (Figure 5B, Table 4). 540 The second RR-2 protein, ACYPI007858, was identified by MS 541 with a single peptide of 11 AA covering 2% of the mature protein 542

^aU = unique peptide found in protein. S = peptide shared among different proteins. The 15 CPs identified by mass spectrometry in aphid stylets are indicated in red (see also Table S17). RR-1 proteins are highlighted in green, RR-2 in grey, CPAP1 in yellow, CPAP3 in orange, and Tweedle in blue. ID, identifier.

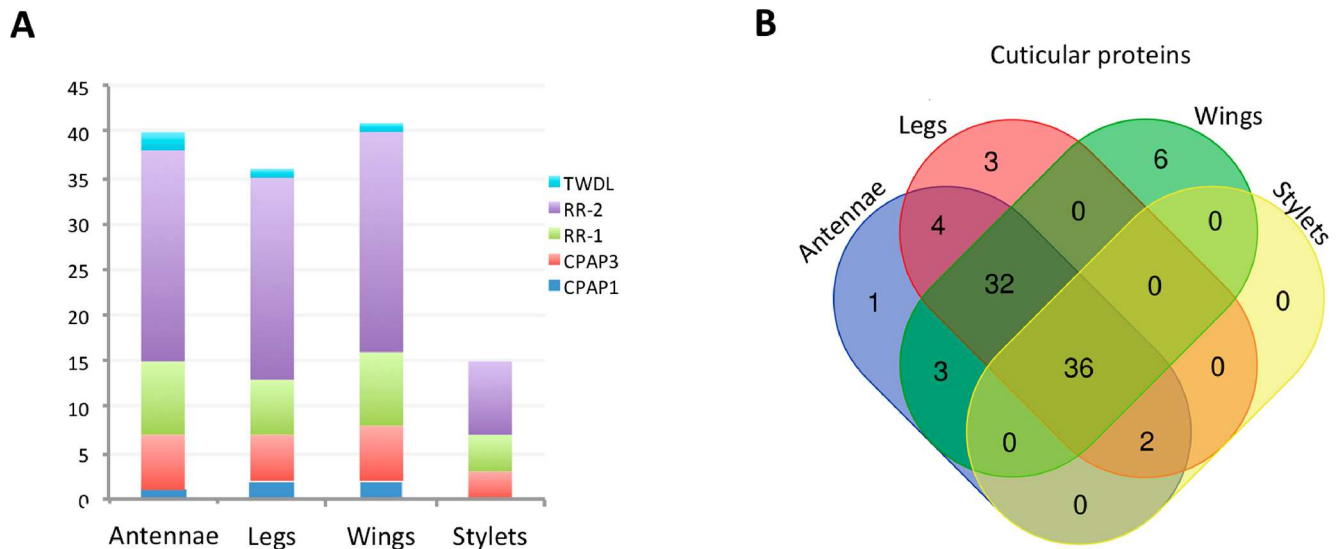


Figure 4. Comparative CP profiling in *A. pisum* cuticular structures. (A) Distribution of the different CPs from minimal lists in antennae, legs, wings, and stylets. (B) Venn diagram indicates the number of all cuticular proteins potentially present in antennae, legs, wings, and stylets.

Table 3. Classification of Cuticular Proteins of the Different Structures^a

	CPAP1	CPAP3	CPR_RR1 ^b	CPR_RR-2 ^b	TWDL ^b	Total ^b
Antennae	1	6	(8)-10	(22)-59	2	(39)-78
Legs	2	5	(6)-7	(22)-61	(1)-2	(36)-77
Wings	2	6	(8)-9	(24)-58	(1)-2	(41)-77
Stylets	0	3	(4)-5	(8)-30	0	(15)-38
Whole genome	11	8	15	110	3	147

^aNumber of proteins with peptides identified by MS analyses assigned in the different CP families for each cuticular structure. Total number of CPs identified in the structures is indicated. ^bThe smallest numbers of CPs that can explain all observed peptides recovered from MS analysis (minimal list) are indicated in parentheses.

545 and targeted by anti-2-13 antibody. This peptide was also
546 embedded in the acrostyle, as well as in the lateral edge of the
547 stylets (Figure 5B, Table 4). Attempts to detect another unique
548 peptide of this CP with anti-2-14 antibody failed whatever the
549 conditions used. A third RR-2 protein, ACYPI001599 was
550 detected by MS with a unique peptide, but no specific antibody
551 could be produced.

552 Four peptides included in the chitin-binding domain and
553 common to several identified RR-2 proteins have earlier been
554 reported as embedded within the acrostyle—pepL, pepS, Ap2-
555 05, and Ap2-08.^{22,25} We here extend the listing of RR-2 protein
556 peptides detectable in stylets with four additional antibodies.
557 Anti-Ap2-04, anti-Ap2-06, and anti-Ap2-07 are directed against
558 peptides of the conserved RR-2 chitin-binding domain, whereas
559 anti-2-10 targets one peptide present in the C-terminus of a few
560 proteins. All four antibodies labeled maxillary stylets after
561 extended Chitinase treatments. Strong fluorescent labeling
562 appeared as dots along maxillary stylets when using anti-2-06
563 and anti-2-10 antibodies, indicating that RR-2 proteins are
564 widely present under the surface (Figure 5B, Table 4).

565 ACYPI066095 and ACYI007858 formally detected within the
566 acrostyle with antibodies targeting unique peptides lack several
567 shared peptides detected in the organ, among which pepL, pepS,
568 and Ap2-08. Therefore, another RR-2 protein containing these
569 shared peptides may be present in the organ. We can conclude
570 that at least three RR-2 proteins are detected in the acrostyle
571 (Figure 5B).

Localization of CPAP3 Proteins in the Stylets

572

573 Three CPAP3 have been identified in the stylet data sets. With
574 the set of antibodies produced and used against these proteins,
575 the labeling was generally weak and visible as dots at the tip of
576 maxillary stylets (Figure 5C, Table 4). ACYPI007860 was only
577 barely revealed in the acrostyle after Chitinase treatment with a
578 single antibody, anti-3-02, targeting a peptide that was not
579 detected by MS. No labeling could be visualized when using
580 anti-3-01 antibody targeting one unique MS-identified peptide
581 of this protein. Its location within aphid stylets could therefore
582 not be definitely stated. ACYPI006031 and ACYPI007911 were
583 detected in the acrostyle, each with two distinct antibodies. Two
584 peptides of ACYPI006031, respectively targeted by anti-3-06
585 and anti-3-07 were found embedded within the cuticle. For
586 ACYPI007911, the peptide targeted by anti-3-03 was detected
587 only after Chitinase treatment, whereas that targeted by anti-3-
588 09 antibody was detected directly at the surface of the acrostyle
589 (Figure 5C). This protein was renamed Stylin-05.

Repertoire of Cuticular Proteins Present in the Acrostyle

590

591 Of the 15 CP groups identified in stylet bundles, nine proteins
592 were unambiguously detected in the acrostyle. These proteins
593 belong to two CP families, including seven CPR proteins (4 RR-
594 1 and 3 RR-2) and two CPAP3 (Figure 6). Four peptides have
595 been shown to be directly accessible at the surface: three of them
596 are found in RR-1 proteins and are either part of the chitin-
597 binding domain (Stylin-03) or present at the N-terminus and C-
598 terminus of the proteins (Stylin-04/-04bis and Stylin-01/-02,
599 respectively), and one belongs to a CPAP3 protein and is part of

Table 4. Correspondence between Peptides/Proteins Identified in *A. pisum* Stylets by MS Analysis and Peptides Used for Antibody Production^a

CP ID	Peptides identified by MS or present in the CP	Peptides used for immunization	Antibody ID	Labeling / Accessibility
ACYPI001599	- VVEYTADNYGFNAEVK - APYSAPAPAYK - GSYLLEADGSTR - FEYSVNDPSTYDVKS	n.d. n.d. GSYSLLEADGSTRTVE FEYSVNDPHTYDVKS	N/A N/A Anti-pepL ²² Anti-pepS ²²	N/A N/A + / Em + / PAc
ACYPI001610 (Stylin-03)	- YENDGVNFDGSYK - QAQESGSVQPAQNP - VEGGYSYTPADGTPI - QNPNESVLNVEG	YENDGVNFDGSYK QAQESGSVQPAQNP VEGGYSYTPADGTPI QNPNESVLNVEG	Anti-1-03 Anti-1-04 Anti-1-15 Anti-1-17	- + / Em + / Ac + / PAc
ACYPI001644	- EGTPSYSSAPAYKPAYK - IVEYTADDYNGFVAEVK - GSYSLVEPDGTRK - KSQSEYSDGNGYVVK	KEGTPSYSSAP TRTVEYTADDYNG EYTADDYNGFNAV ND KSQSEYSDGNGYVVK	Anti-Ap2-10 ²⁵ Anti-Ap2-06 ²⁵ Anti-Ap2-07 ²⁵ N/A Anti-Ap2-04 ²⁵	+ / Em + / Em + / Em N/A + / Em
ACYPI002877 (Stylin-04)	- FYNNGQNPAYNGQFVPIQQSF - DLSPEGSYTFGYQSADGTQR - YPAVQGYPPVMAVQGSYAITPEGIP - IEVSYVADENGYQPTGPGV HP AIQR - FNGFRPNGAYPQQYI	n.d. GSYTFGYQSADGTQR FNGFRPNGAYPQQYI	N/A Anti-1-16	N/A + / Ac
ACYPI003649 (Stylin-02)	- AVILSQEQEVNFDGNFK - KLLASLPSTPEPQYQ	SQEQEVNFDGNFKNK RYLASLPSTPEPKYQ	Anti-1-07 ²⁶ Anti-1-11 ²⁶	+ / PAc + / Ac
ACYPI004943	- APYSAPAPAYK - KSQSEYSDGNGYVVK - EYTADDYNGFNAE - FEYSVNDPSTYDVKS	ND KSQSEYSDGNGYVVK EYTADDYNGFNAV FEYSVNDPHTYDVKS	N/A Anti-Ap2-04 ²⁶ Anti-Ap2-07 ²⁶ Anti-pepS ²²	N/A + / Em + / Em + / PAc
ACYPI006031	- DALTDGFTCPDGDVVGPNGR - GQRTVQQEPKPSKG	DGDVVGPNGRILPH GQRTVQQEPKPSKG	Anti-3-06 Anti-3-07	+ / Em + / Em
ACYPI006670	- TVEYTADDYNGFNAVVK - GSYLLEADGSTR - FEYSVNDPHTYDVKS	TRTVEYTADDYNG EYTADDYNGFNAV GSYSLLEADGSTRTVE FEYSVNDPHTYDVKS	Anti-Ap2-06 ²⁵ Anti-Ap2-07 ²⁵ Anti-pepL ²² Anti-pepS ²²	+ / Em + / Em + / Em + / PAc
ACYPI007858	- LPLQGATAPAR - NAGRPKPKKNRPTTT	LPLQGATAPARQPL NAGRPKPKKNRPTTT	Anti-2-13 Anti-2-14	+ / Em -
ACYPI007860	- ENCDYLHNVDCCGAR - SQLEPAIGGPHCPR - YYICMEGTAR - RYQCSPLAYDRE	ENCDYLHNVDCCGAR n.d. n.d. RYQCSPLAYDRE	Anti-3-01 N/A N/A Anti-3-02	- N/A N/A + / Em
ACYPI007911 (Stylin-05)	- SELQNPQPSYLCPR - EQGCSTGEVFNESQK - GQNVAHPVFAHPDDCQK - CPKDKAFNSRQGNVAH	GERSELQNPQPSYL n.d. CPKDKAFNSRQGNVAH CPKDKAFNSRQGNVAH	Anti-3-03 N/A Anti-3-09 Anti-3-09	+ / Em N/A + / Ac (dots) + / Ac (dots)
ACYPI009006 (Stylin-01)	- AAILVQDSAPNADGSFK - YIADENGYQPYGAHL - RYLASLPSTPEPKYQ - LPTPPPIPAEIQESLRY	ILVQDSAPNADGSFK YIADENGYQPYGAHL RYLASLPSTPEPKYQ & LPTPPPIPAEIQESL	Anti-1-01 ²⁶ Anti-1-10 ²⁶ Anti-1-11 ²⁶ Anti-1-13 ²⁶	+ / PAc + / Em + / Ac + / Em
ACYPI066095	- APAYAAPAYSAPAYK - EGTPSYSSAPAYKPAYK - APYSAPYSAPAYK - GSYSLVEADGTRK - NFDYSVHDDSTYD - KSQSEYSDGNGYVVK	n.d. KEGTPSYSSAP n.d. n.d. NFDYSVHDDSTYD KSQSEYSDGNGYVVK	N/A Anti-Ap2-10 ²⁵ N/A N/A Anti-2-16 Anti-Ap2-04	N/A + / Em N/A N/A + / Em + / Em
ACYPI071387	- SQNEYADANGYVK - KRTVEYTADDYNG - EYTADDYNGFNAE	n.d. TRTVEYTADDYNG EYTADDYNGFNAV	N/A Anti-Ap2-06 ²⁵ Anti-Ap2-07 ²⁵	N/A + / Em + / Em
ACYPI26371	- GSYLLEADGSTR - EYTADDYNGFNAE - FEYSVNDPHTYDVKS	GSYSLLEADGSTRTVE EYTADDYNGFNAV FEYSVNDPHTYDVKS	Anti-pepL ²² Anti-Ap2-07 ²⁵ Anti-pepS ²²	+ / Em + / Em + / PAc

^aAA, amino acid; CP, Cuticular protein; ID, identifier; n.d., not done; N/A, not applicable; (+): labeling detected; (-): no labeling observed under our experimental conditions; Ac, epitope exposed at the surface and directly accessible; PAc, epitope poorly accessible (labeling visible as dots without Chitinase treatment); Em, epitope embedded, not accessible at the surface of the stylets. CP identified with unique peptides are in red; peptides not identified by LC-MS/MS for which antibodies were already available in our laboratory are in italics. Differences in the AA sequence are indicated in blue. Antibody ID is followed by a reference number when the corresponding antibody was described in a previous study.

600 one of its chitin-binding domain (Figure 7). Noticeably, no RR-
601 2 protein (the most numerous CP class) was detected at the
602 untreated surface of the acrostyle.

603 Spatial and Temporal Expression of Stylin in *A. pisum*

604 None of the five proteins detected at the surface of the acrostyle
605 was found to be stylet-specific. They have been identified in all
606 four cuticular structures characterized in this study, except for

Stylin-04/-04bis which was/were absent from the wing's
proteome (Table 4). To characterize possible difference in
stylin genes expression in different tissues, we compared their
transcript levels in antennaless-heads containing the stylet-
synthesizing glands, and in antennae, legs, and wings by real-
time RT-qPCR analyses using stylin-specific primers for Stylin-
01, -02, -03, and -05 (Table S3). For Stylin-04/-04bis, we could

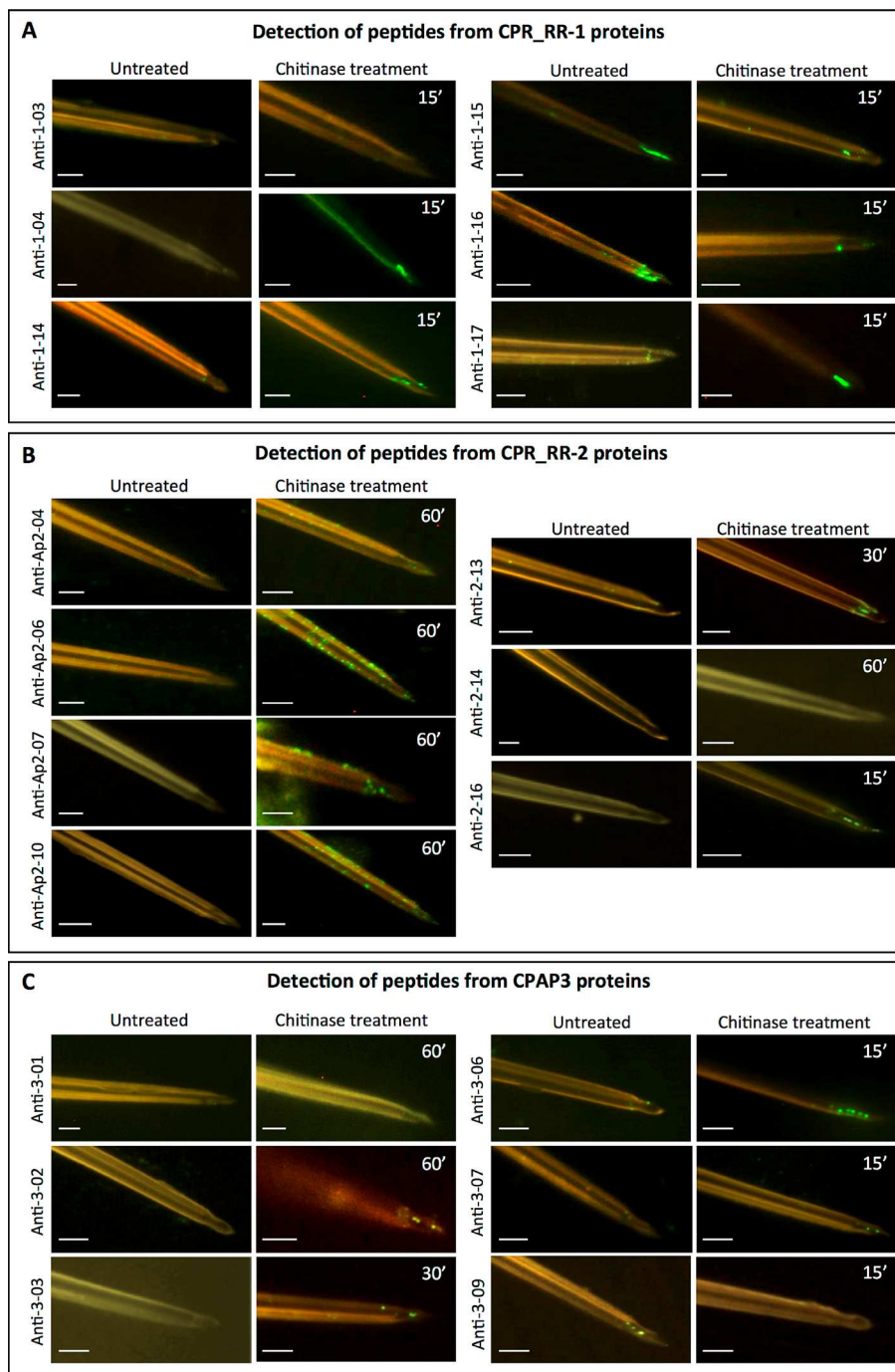


Figure 5. Detection of cuticular proteins in *A. pisum* stylets by immunolabeling. Immunolabeling of *A. pisum* maxillary stylets with antibodies targeting peptides of cuticular proteins identified by the LC-MS/MS analyses. Representative images of labeling observed for antibodies targeting peptides from CPR-RR-1 proteins (A), CPR-RR2 proteins (B), and CPAP3 proteins (C) are shown for untreated stylets and stylets treated with Chitinase prior to immunolabeling. Incubation times with Chitinase ranging from 15 to 60 min are indicated on the top right of images. Scale bars of 5 μm are included.

not design primers able to specifically amplify a single transcript. The observed patterns are thus difficult to interpret and provided for information purposes only.

Consistent with the proteomic data, *stylin-01*, *-02*, *-03*, and *-05* were expressed not only in the head but also in other body parts. They exhibited different expression patterns, with *stylin-01* and *stylin-02* transcripts being more expressed in the head, whereas *stylin-03* was less expressed and *stylin-05* highly variably but equally expressed in all four tissues (Figure 8A).

Stylin expression profiles were also analyzed during *A. pisum* development at five different time-points: during the four larval stages and in adults. *rr-1 stylin* genes showed similar expression patterns with an increase in successive larval stages peaking at the fourth instar (8 to 20 times higher than the expression level in the first instar) and then decreasing in adults. Noticeably, expression levels were highly variable in the fourth instar, the developmental stage of longest duration in *A. pisum*.⁵¹ Expression levels of *stylin-05* gene were comparable in the four larval stages and were significantly lower in adults (Figure 8B).

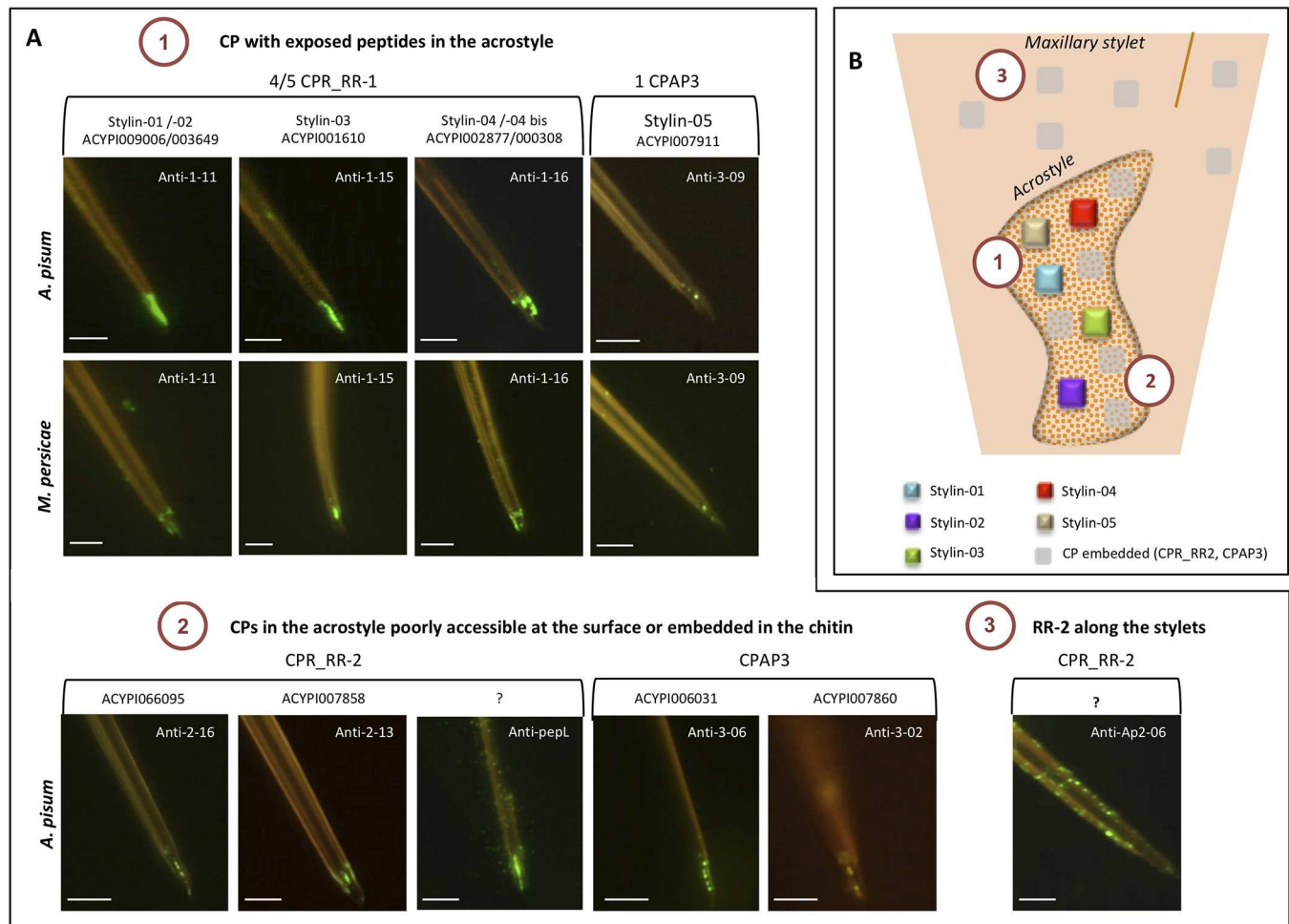


Figure 6. Repertoire of cuticular proteins in the acrostyle. (A) Summary of peptides and proteins detected in *A. pisum* maxillary stylets at the surface of the acrostyle (1), embedded in the organ (2), or distributed all along the stylets (3). (B) Schematic representation of the distribution of the CPs identified in maxillary stylets. Scale bars of 5 μm are included.

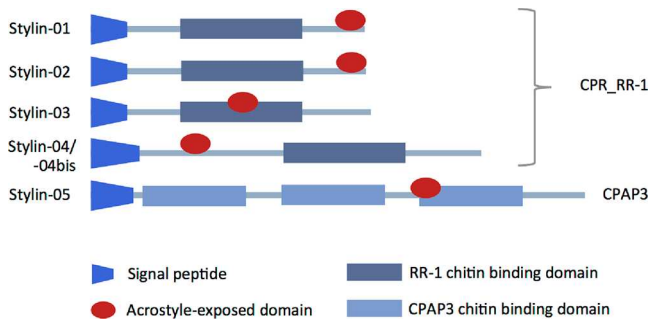


Figure 7. Domain organization of stylins. Schematic representation of stylin domains with predicted signal peptide, and RR-1 or type 2 chitin-binding domains. Acrostyle-surface exposed domains are indicated in red.

633 Stylins are Conserved among Aphid Species

634 We constructed two phylogenetic trees for RR-1 and CPAP3
635 protein sequences identified in the six genomes of aphids and in
636 the phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*, all available in
637 AphidBase (Figure 9A,B). The phylloxera belongs to Phyllox-
638 eroidea, a superfamily considered to be the nearest sister taxon
639 of the Aphidoidea, which probably diverged 250 My ago.⁵² The
640 homologues of each Stylin grouped in a separated clade, except
641 for homologues of Stylin-01 and Stylin-02 which were already

shown to group in a single clade.²⁶ Noticeably, only one protein
642 of *D. vitifoliae* grouped with Stylin-01 and Stylin-02 homologues,
643 probably reflecting gene duplication in aphids after their
644 divergence with phylloxerids. Regarding Stylin-04 and Stylin-
645 04bis found in *A. pisum* genome, phylogenetic analyses showed
646 that only one of these two proteins was present in other aphid
647 species and in *D. vitifoliae*. A gene duplication of *stylin-04* gene
648 likely occurred only in *A. pisum*, as previously described in other
649 conserved gene families in this species.³⁶ 650

Stylins are highly conserved among aphid species. Remark-
651 ably, the domains exposed at the surface of the acrostyle are
652 nearly identical in the six aphid species (Figure 9C). The most
653 divergent sequences were *D. vitifoliae* homologues of Stylin-04/-
654 04 bis and Stylin-05. In addition, as previously shown in *A.*
655 *pisum*, and so suggesting a high conservation of their function, all
656 five stylins were detected at the tip of the maxillary stylets of
657 *M. persicae*, the most important vector of plant viruses (Figure 6A). 658

659 DISCUSSION

The aphid stylets are composed of a biomaterial with unique
660 surface properties ensuring binding, retention, and release of
661 plant viruses during their journey from one host to another. This
662 transport of viruses is driven at least by cuticular proteins
663 emerging at the surface of the cuticle, in direct contact with
664 endogenous and exogenous compounds flowing in and out 665

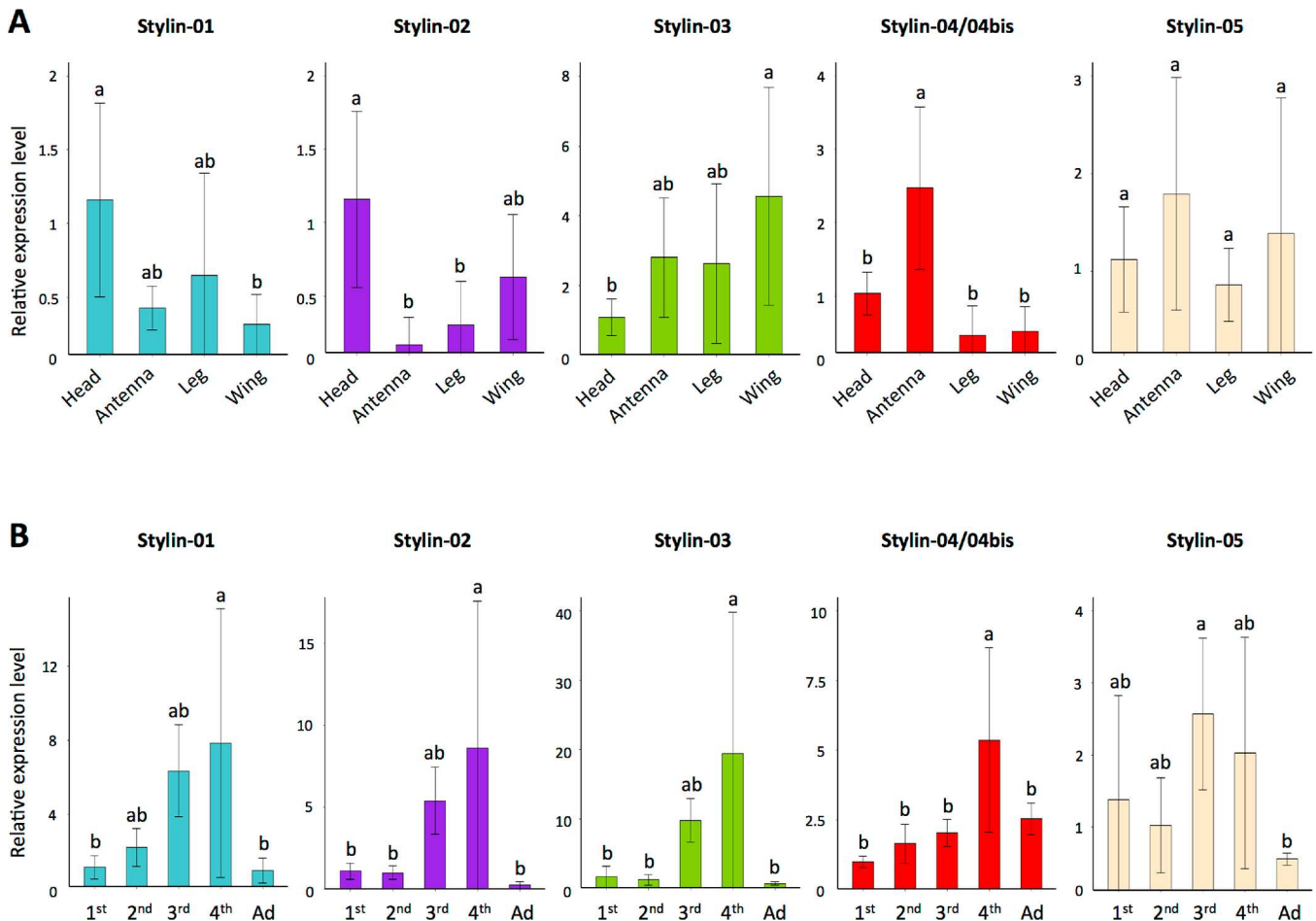


Figure 8. Stylin relative expression patterns in different *A. pisum* body parts and in different nymphal instars. (A) Stylin genes expression quantified by qRT-PCR in head, antenna, leg, and wing relative to stylins expression in Heads. (B) Stylin genes expression quantified by qRT-PCR in first (1st), second (2nd), third (3rd), and fourth (4th) nymphal stages and in adults (Ad) relative to stylins expression in first instars. *actin* and *EF1 α* genes were used for data normalization. Results are reported as means \pm SD for 3 independent biological replicates. Lowercase letters indicate significant differences between samples (TukeyHSD, $p < 0.005$).

666 maxillary stylets. Although not characterized when we started
 667 our study, we could speculate that various processes might
 668 specifically functionalize the cuticular surface at the tip of
 669 maxillary stylets in the region described as the acrostyle. These
 670 speculated processes could be, for example, the local protein
 671 composition of the cuticle or the degree of protein
 672 sclerotization. We thus initially presumed that some cuticular
 673 proteins would be specific to the stylets, even to the tip of the
 674 maxillary stylets, and absent from other anatomical structures.
 675 Our comparative proteomics analysis was designed to identify
 676 these stylet-specific CPs if there were any, because they
 677 represent prime candidate receptors of plant viruses.

678 Common Set of CPs to Form Aphid Cuticles

679 We have here experimentally generated the first proteome of
 680 four cuticular structures (antennae, legs, wings, and stylets)
 681 of the pea aphid. These four proteomes contain multiple CPs
 682 which a shared subset likely represents the building blocks of all
 683 aphid cuticles, as suggested for the common subset of CP genes
 684 identified in a comparative analysis of seven anatomical
 685 structures of the mosquito *Anopheles gambiae*.^{33,53} The pea
 686 aphid proteome profiles were globally similar in antennae, legs,
 687 and wings, with higher complexity/depth than the stylets
 688 proteome. However, a few CPs were specifically found in
 689 antennae, legs, or wings, and whether or how they contribute to

specific cuticular properties/functions in these respective
 anatomic structures has not been investigated.

Fewer CPs Identified in Stylets

The repertoire of CPs identified in aphid cuticles was half in
 stylets compared to in other structures, reflecting either the
 absence of some CPs, their significantly reduced accumulation,
 or extractability. It is notable that the cuticle of antennae, legs,
 and wings originates from epithelial cells, while that of the stylets
 is synthesized by the highly specialized retort glands entirely
 dedicated to cuticle production.^{13,14,54} This sole ontology
 difference may lead to cuticles with different degrees of protein
 complexity. However, a recent characterization of transcripts in
 the retort glands revealed a more complex set of expressed CP
 genes than in other previously characterized cuticular trans-
 criptomes.²⁸ Our MS data show that over 50% of the stylet CPs
 were identified by a single peptide, sometimes covering less than
 2% of the mature protein, suggesting that CPs are hardly
 extractable from this organ and perhaps explaining the low
 complexity of the corresponding proteome.

CPs Are Not Evenly Distributed in Aphid Stylets

Our labeling experiments showed a variable distribution of CPs
 within maxillary stylets. Several RR-2 peptides were displayed
 under the superficial layers of the cuticle all along maxillary

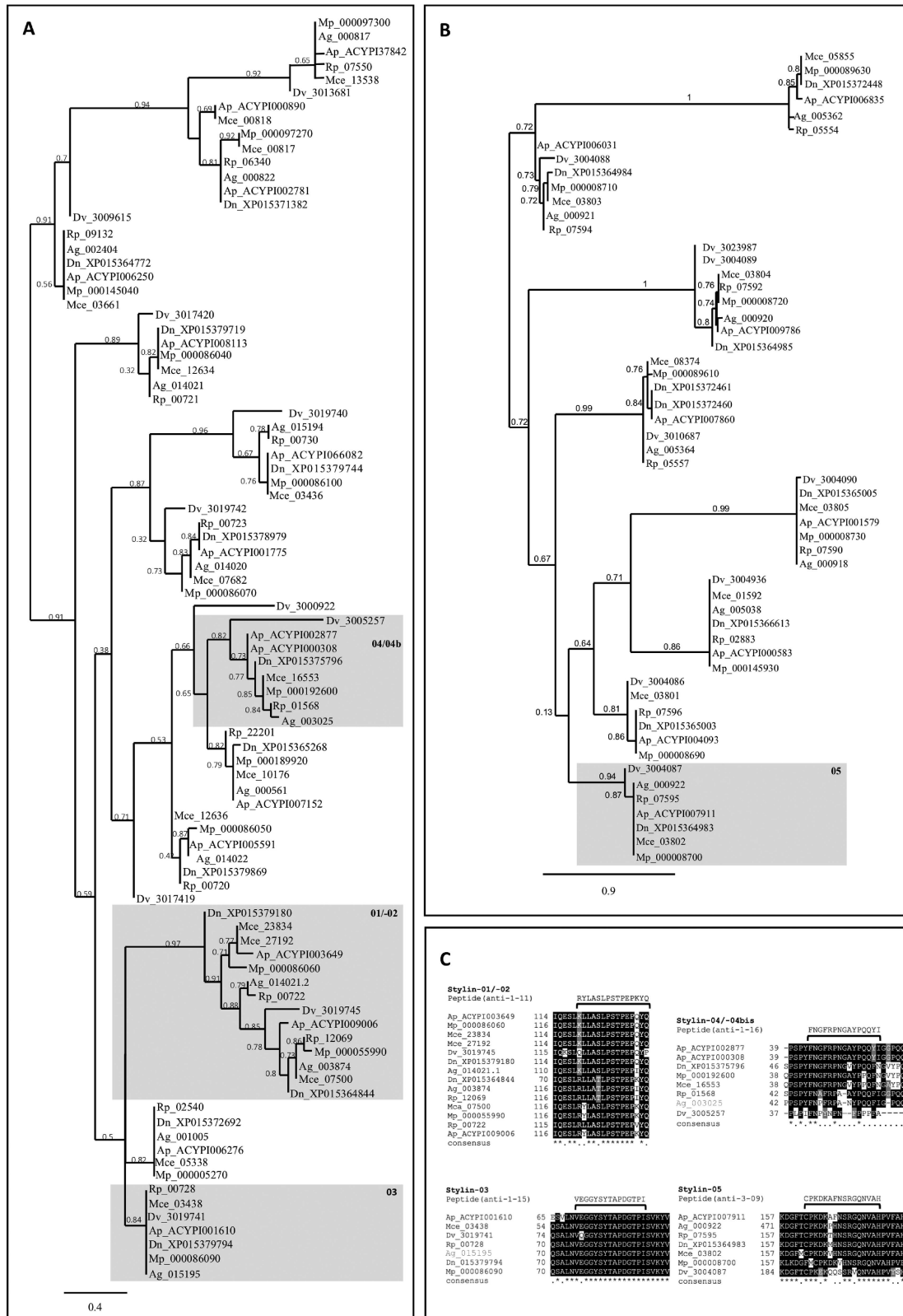


Figure 9. Stylins and acrostyle surface peptides are conserved in aphid vectors. Phylogenetic relationships of (A) CPR_RR-1 proteins with trimmed signal peptides and (B) full CPAP3 proteins of *Acyrtosiphon pisum* (Ap), *Aphis glycines* (Ag), *Daktulosphaira vitifoliae* (Dv), *Diuraphis noxia* (Dn), *Myzus cerasi* (Mce), *Myzus persicae* (Mp), *Rhopalosiphum padi* (Rp). AphidBase accession numbers for each gene are indicated on the right of the species abbreviation. It is noteworthy that to retrieve *M. persicae* sequences from AphidBase, numbers should be preceded by MYZPE13164_G006_v1.0_. Branch support values are indicated at the node, and the scale bar represents probabilities of change from one amino acid to another in terms of a unit, which is an expected 1% change between two amino acid sequences. Shaded portions represent stylin clusters and are numbered from 01 to 05 according to corresponding stylin names. (C) Conservation of exposed domains of the five stylins identified in *M. persicae* (Mp), *A. pisum* (Ap), *M. cerasi* (Mce), *R. padi* (Rp), *A. glycines* (Ag), *D. noxia* (Dn), and *Daktulosphaira vitifoliae* (Dv). Alignments were performed

Figure 9. continued

using T-Coffee software. Shading was done with BOXSHADE 3.21 software. Identical residues are shaded in black; similar residues are shaded in gray. The consensus sequence is shown at the bottom, with periods indicating conserved substitutions and asterisks indicating identities.

713 stylets. Some of them were also detected under the surface of the
714 acrostyle. With the antibodies used here and in previous studies,
715 we could not evidence their direct accessibility at the surface of
716 the cuticle.^{22,25} However, we cannot strictly rule out such a
717 possibility. Actually, repeat-rich sequences containing alanine,
718 proline, tyrosine, and serine residues commonly found in aphid
719 RR-2 proteins and present in several MS-detected peptides are
720 poorly immunogenic and could not be considered for peptide
721 synthesis and antibody production.²⁵ Therefore, their accessi-
722 bility in stylet cuticle could not be assessed. By contrast, all RR-1
723 and CPAP3 have been exclusively detected at the distal
724 extremity of maxillary stylets (Figure 6), with the strongest
725 labeling being observed for RR-1, that likely decorates the entire
726 surface of the acrostyle. Despite their apparent specific
727 localization, we must consider that RR-1 and CPAP3 peptides
728 may also be evenly distributed all over the stylets because these
729 protein families do not seem to be overrepresented in the core
730 stylet material when compared to other aphid cuticular
731 anatomical structures (Figure 4, Table 3), and so are likely
732 generally present in any cuticle. In this hypothesis, what would
733 appear specific would be their accessibility at the surface of the
734 acrostyle, and this could reveal a general property of the cuticle
735 that would be locally functionalized by surface modifications
736 allowing access to normally embedded CPs.

737 Intriguingly, no labeling was ever observed on mandibular
738 stylets in our experimental conditions. This striking observation
739 suggests that proteins in this structure may be tightly cross-
740 linked and no longer detectable with our antibodies or, as
741 hypothesized above, that these stylets have surface properties
742 that do not give access to the embedded cuticular proteins. Both
743 hypotheses assume a comparable protein constitution for
744 maxillary and mandibular stylets, consistent with their
745 undistinguishable transcript profiles reported earlier.²⁸

746 Receptor Candidates

747 As expected for structural components of arthropod cuticle,
748 stylins are highly conserved in all aphid species where sequence
749 data are available. Receptors of plant viruses may also be
750 conserved in vectors because the same viral species can
751 sometimes be transmitted by dozens of different aphid
752 species.^{55,56} Our results indicate that the protein domains
753 accessible at the surface of the acrostyle share high degrees of
754 identity with their homologues in other aphid species (Figure
755 9C). Interestingly, the most divergent protein sequences were
756 those of *D. vitifoliae*, the grapevine pest species, for which
757 transmission of plant viruses or of other pathogens has not been
758 reported so far.^{57,58}

759 RR-1 proteins are largely represented at the surface of the
760 acrostyle. Proteins from RR-1 subgroup are generally found in
761 soft cuticle, but a few of them have also been described in hard
762 cuticle.^{24,59–61} Their role in virus transmission has recently
763 emerged in the literature, and they are associated with both
764 circulative and noncirculative virus transmission.^{26,62,63} CPR1, a
765 RR-1 protein of the small brown planthopper *Laodelphax*
766 *striatellus*, was first shown to interact with pc3, a viral
767 nucleocapsid protein of rice stripe virus (RSV) (62). RSV is a
768 tenuivirus transmitted in a circulative propagative manner.⁶⁴ By
769 contrast with noncirculative viruses, these viruses are not

retained on their vector mouthparts. They are internalized in
insect body, transit through the hemolymph to different internal
tissues, and reach the salivary glands from which they can be
inoculated together with egestion of saliva into a new host
plant.⁴ Knockdown of CPR1 transcripts resulted in a decrease in
RSV transmission. The authors proposed that CPR1 could assist
viral movement within the insect body, a totally unexpected
function for cuticular protein.⁶² For noncirculative viruses, *in vitro*
competition experiments and transmission phenotypes
associated with *stylin* genes knockdown demonstrated the role of
Stylin-01 in CaMV transmission by its aphid vector. Decreasing
Stylin-01 transcripts in *M. persicae* resulted in a reduced CaMV
transmission capacity.²⁶ In an independent study, Stylin-01,
named previously Mpcp4 in *M. persicae*, was shown to interact in
yeast with the coat protein of *Cucumber mosaic virus* (CMV),
another aphid-transmitted noncirculative virus.⁶⁵ However, its
role in CMV transmission still lacks direct evidence.⁶⁶ In
addition to Stylin-01, Stylin-02, -03, and -04/-04bis, distributed
over the surface of the acrostyle, now stand as prime candidate
receptors of plant viruses.

CPAP3 are Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins,
previously known as “*gasp*” or “*obstructor*” family.^{67,68} They have
been described in all insect, and possess three type 2 chitin-
binding domains (ChtBD2).⁶⁹ They have been detected in
different tissues. However, they were missing from the list of CPs
identified in the proboscis of *An. gambiae*.³³ They have never
been reported associated with virus transmission so far and are
described here for the first time in aphid stylets. They are
involved in cuticle formation and in structural integrity of
cuticles.^{69–71} Antibodies produced in our study target less than
7% of their amino acid sequences and further effort will be
required to determine if some CPAP3 domains could be better
exposed at the surface of aphid stylets. Determining if they play a
role in virus transmission would also warrant further
investigation. As they belong to a distinct structural class of
chitin-binding proteins relative to CPR (harboring cysteine-
bridged Chitin-Binding Domain vs cysteine-free Chitin-Binding
Domains for CPR), their functional properties might be distinct
from the canonical CPR proteins identified so far as *stylins* and as
active players in plant virus transmission.

The RR-2 proteins represent the great majority of CPs
identified in *A. pisum* stylets. These proteins are generally found
in hard and rigid cuticles, and some of them have been shown to
be essential for cuticle integrity, integument structure, insect
development and could be involved in cuticle formation.^{24,72–77}
RR-2 distribution within aphid stylets suggests that they likely
constitute the main building blocks of this type of cuticle.
Evidence of their accessibility at the surface of aphid stylets is
still lacking.^{22,25} So, although not prime candidates, the role of
RR-2 proteins in virus transmission cannot be discarded. They
have been cited in several studies as interacting molecules of
both noncirculative and circulative viruses.⁷⁸ For noncirculative
viruses, three RR-2 of *M. persicae* were shown to interact *in vitro*
with HC-Pro, the ligand protein of a potyvirus *Zucchini yellow*
mosaic virus.⁶⁵ One of these proteins is homologous to
ACYPI006670 that contains four peptides detected in maxillary
stylets (Table 4). Another one has been characterized recently
which reduction of transcripts correlated with a decrease in

828 *Potyvirus Y* transmission.⁷⁹ However, its putative ortholog in *A.*
829 *pisum* was not in our MS data set, and its presence within *M.*
830 *persicae* stylets, embedded in the chitin or at the surface of the
831 cuticle, remains to be confirmed.

832 ■ CONCLUSIONS

833 We provide through this study the first comparative proteomics
834 analysis of four aphid cuticular anatomical structures, namely
835 antennae, legs, wings, and stylets. Our data gives preliminary
836 evidence that a great number of CP proteins are common to
837 antennae, legs, and wings, while a few CP proteins seem specific
838 to each appendage. The stylet, which was of main interest to
839 better understand the vector/virus interaction was found to be
840 distinct in composition compared to the other three studied
841 appendages. We determined the repertoire of CPs of aphid
842 stylets and precisely mapped their accessibility in maxillae at the
843 surface of the acrostyle. Further characterization for this short
844 list of proteins showed that they are highly conserved in aphid
845 species and thus all represent good candidate receptors of plant
846 viruses. These data contribute to a better characterization of
847 aphid mouthparts, a crucial insect feeding appendage, but also
848 point out at the surface specificities of the cuticle and at the
849 distribution of cuticular protein accessibility, which may be
850 relevant for local functionalization of this tissue. Beyond feeding
851 appendage and virus receptor candidates, our proteomic data
852 sets may contribute to future investigations of other important
853 physiological functions in aphids such as chemoreception and
854 sensory system.

855 ■ ASSOCIATED CONTENT

856 SI Supporting Information

857 The Supporting Information is available free of charge at
858 <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.9b00851>.

859 Table S1. Database generated for protein identification
860 including 252,212 entries. Table S2. Home-made *A. pisum*
861 CP database identified using CutProtFamPred. Table S3.
862 List of oligonucleotides used in this study. Table S4. *A.*
863 *pisum* proteins identified in antennae. Table S5. *A. pisum*
864 proteins identified in legs. Table S6. *A. pisum* proteins
865 identified in wings. Table S7. *A. pisum* proteins identified
866 in stylets. Table S8. Proteins distribution in *A. pisum*
867 cuticular structures. Table S9. Analysis of GO terms
868 enrichment for proteins identified in the Core Proteome
869 of antennae, legs, wings, and stylets. Table S10. GO terms
870 enrichment in antennae. Table S11. GO terms enrichment
871 in legs. Table S12. GO terms enrichment in wings.
872 Table S13. GO terms enrichment in stylets. Table S14.
873 Cuticular proteins identified in antennae. Table S15.
874 Cuticular proteins identified in legs. Table S16. Cuticular
875 proteins identified in wings. Table S17. Cuticular proteins
876 identified in stylets. Table S18. Cuticular protein
877 distribution in *A. pisum* cuticular structures. (ZIP)

878 Accession Codes

879 The mass spectrometry proteomics data have been deposited to
880 the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner
881 repository with the data set identifier PXD016517.⁸⁰

882 ■ AUTHOR INFORMATION

883 Corresponding Authors

884 **Philippe Bulet** – Plateforme BioPark d'Archamps, 74160
885 Archamps, France; CR University of Grenoble-Alpes, Institute for

Advances Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, 38058
Grenoble, France; Phone: +(33) 450 432 521;
Email: philippe.bulet@univ-grenoble-alpes.fr
Marilyne Uzest – BGPI, University of Montpellier, INRAE,
34000 Montpellier, France; orcid.org/0000-0002-7459-8434;
Phone: +(33) 499 624 857; Email: marilyne.uzest@inra.fr

893 Authors

Maëlle Deshoux – BGPI, University of Montpellier, INRAE,
34000 Montpellier, France
Victor Masson – Plateforme BioPark d'Archamps, 74160
Archamps, France; CR University of Grenoble-Alpes, Institute for
Advances Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, 38058
Grenoble, France
Karim Arafah – Plateforme BioPark d'Archamps, 74160
Archamps, France
Sébastien Voisin – Plateforme BioPark d'Archamps, 74160
Archamps, France
Natalia Guschinskaya – INRAE, INSA Lyon, UMR5240 MAP
CNRS-UCBL, 69622 Villeurbanne, France
Manuella van Munster – BGPI, University of Montpellier,
INRAE, 34000 Montpellier, France
Bastien Cayrol – BGPI, University of Montpellier, INRAE,
34000 Montpellier, France
Craig G. Webster – BGPI, University of Montpellier, INRAE,
34000 Montpellier, France
Yvan Rahbé – BGPI, University of Montpellier, INRAE, 34000
Montpellier, France; INRAE, INSA Lyon, UMR5240 MAP
CNRS-UCBL, 69622 Villeurbanne, France; University of Lyon,
69007 Lyon, France
Stéphane Blanc – BGPI, University of Montpellier, INRAE,
34000 Montpellier, France

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.9b00851>

920 Author Contributions

‡M.D. and V.M. contributed equally to this study. P.B. and M.U.
jointly supervised this work. All authors contributed to the work
and the manuscript presented here. All authors have approved
the final version of the manuscript.

925 Funding

This work was supported by grants from the Bill and Melinda
Gates Foundation (GCEag, OPP1130147) and the French
National Research Agency (ANR15-CE20-0011). Funding for
the sequencing of *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi* was
provided by ERC Starting Grant APHIDHOST-310190
awarded to Jorunn Bos at the James Hutton Institute, United
Kingdom. Funding for *Daktulosphaira vitifoliae* clone Pcf
genomic sequencing was provided by Inra (AIP Bioressources)
and BGI Biotech in the frame of iSk initiative. Parts of the
transcriptomic resources were obtained within the 1KITE
projects (Bernhard Misof, Bonn, Germany).

937 Notes

The authors declare no competing financial interest.

939 ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Association Plateforme BioPark d'Archamps
(France) for its technical facilities through its Research &
Development program and Mr. Hervé Breton from the society
Chromoptic for providing us with the glass microtubes.

944 ■ ABBREVIATIONS

945 AA, amino acid(s); ACN, acetonitrile; CaMV, cauliflower
946 mosaic virus; ChtBD2, type 2 chitin-binding domains; CMV,
947 cucumber mosaic virus; CP, cuticular proteins; CPR, cuticular
948 proteins with the Rebers and Riddiford consensus sequence;
949 CPAP3, cuticular protein analogous to peritrophins 3; FDR,
950 false discovery rate; GO, gene ontology; h, hour; HFIP,
951 hexafluoroisopropanol; HMMs, Hidden Markov Models;
952 HPLC, high-performance liquid chromatography; ID, identifier;
953 ITO, Indium–Tin Oxide; LC-MS/MS, Liquid chromatography
954 coupled to tandem mass spectrometry; min, minutes; MS, mass
955 spectrometry; RR, Rebers and Riddiford consensus sequence;
956 RSV, rice stripe virus; TFA, trifluoroacetic acid; v/v, volume/
957 volume; U, Unit

958 ■ REFERENCES

- 959 (1) Dixon, A. F. G. K.; Leps, P. J.; Holman, J. Why there are so few
960 species of aphids, especially in the tropics. *Am. Nat.* **1987**, *129* (4),
961 580–592.
- 962 (2) Favret, C. 2017, Aphid species file. <http://aphid.speciesfile.org>.
- 963 (3) Ogawa, K.; Miura, T. Aphid polyphenisms: trans-generational
964 developmental regulation through viviparity. *Front. Physiol.* **2014**, *5*, 1.
- 965 (4) Hogenhout, S. A.; Ammar, el, D.; Whitfield, A. E.; Redinbaugh, M.
966 G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu.*
967 *Rev. Phytopathol.* **2008**, *46*, 327–359.
- 968 (5) Katis, N. L.; Tsitsipis, J. A.; Stevens, M.; Powell, G. Transmission of
969 Plant Viruses. In *Aphids as Crops pests*; van Emden, H. F., Harrington,
970 R., Eds.; CABI, Wallingford, United Kingdom, 2007; pp 353–390.
- 971 (6) Nault, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: a new
972 synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1997**, *90*, 521–541.
- 973 (7) Whitfield, A. E.; Falk, B. W.; Rotenberg, D. Insect vector-mediated
974 transmission of plant viruses. *Virology* **2015**, *479–480*, 278–289.
- 975 (8) Martin, B.; Collar, J. L.; Tjallingii, W. F.; Fereres, A. Intracellular
976 ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and
977 inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.*
978 **1997**, *78* (10), 2701–2705.
- 979 (9) Perry, K. L.; Zhang, L.; Palukaitis, P. Amino acid changes in the
980 coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission
981 by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* **1998**, *242*
982 (1), 204–210.
- 983 (10) Moreno, A.; Hebrard, E.; Uzest, M.; Blanc, S.; Fereres, A. A single
984 amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic
985 virus can change the spectrum of transmitting vector species. *J. Virol.*
986 **2005**, *79* (21), 13587–13593.
- 987 (11) Chen, B.; Francki, R. I. B. Cucumovirus transmission by the
988 aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *J.*
989 *Gen. Virol.* **1990**, *71*, 939–944.
- 990 (12) Pirone, T. P.; Blanc, S. Helper-dependent vector transmission of
991 plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1996**, *34*, 227–247.
- 992 (13) Davidson, J. The structure and biology of *Schizoneura lanigera*
993 Hausmann or Woolly Aphis of the Apple tree. I. The Apterous
994 viviparous female. *Q. Jl. microsc. Sci.* **1913**, *58*, 653–702.
- 995 (14) Ponsen, M. B. The site of potato leafroll virus multiplication in its
996 vector, *Myzus persicae*: an anatomical study. *Meded. Landbouwhoges.*
997 *Wageningen.* **1972**, *72* (16), 1–147.
- 998 (15) van Hoof, H. A. An investigation of the biological transmission of
999 a non-persistent virus. Doctoral thesis. Wageningen Agr. Univ. Meded.
1000 Inst. plziektenk, Onderz 161, van Putten, Ortmeijer, Alkmaar, the
1001 Netherlands, 1958, 96 pp.
- 1002 (16) Forbes, A. R. Electron microscope evidence for nerves in the
1003 mandibular stylets of the green peach aphid. *Nature* **1966**, *212*, 726.
- 1004 (17) Forbes, A. R. The stylets of the green peach aphid, *Myzus*
1005 *persicae* (Homoptera: Aphididae). *Can. Entomol.* **1969**, *101*, 31–41.
- 1006 (18) Bradley, R. H.; Ganong, R. Y. Evidence that potato virus Y is
1007 carried near the tip of the stylets of the aphid vector *Myzus persicae*
1008 (sulz.). *Can. J. Microbiol.* **1955**, *1* (9), 775–782.
- (19) Berger, P. H.; Pirone, T. P. The effect of helper-component on
the uptake and localization of Potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology*
1986, *153*, 256–261.
- (20) Powell, G. Intracellular salivation is the aphid activity associated
with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *J. Gen. Virol.*
2005, *86* (Pt 2), 469–472.
- (21) Uzest, M.; Gargani, D.; Drucker, M.; Hébrard, E.; Garzo, E.;
Candresse, T.; Fereres, A.; Blanc, S. A protein key to plant virus
transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*
S. A. **2007**, *104* (46), 17959–17964.
- (22) Uzest, M.; Gargani, D.; Dombrovsky, A.; Cazevieuille, C.; Cot, D.;
Blanc, S. The “acrostyle”: a newly described anatomical structure in
aphid stylets. *Arthropod Struct. Dev.* **2010**, *39* (4), 221–229.
- (23) Rebers, J. E.; Riddiford, L. M. Structure and expression of a
Manduca sexta larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle
genes. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203* (2), 411–423.
- (24) Willis, J. H. Structural cuticular proteins from arthropods:
annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the
genomics era. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40* (3), 189–204.
- (25) Webster, C. G.; Thillier, M.; Pirolles, E.; Cayrol, B.; Blanc, S.;
Uzest, M. Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to
identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions. *Insect*
Sci. **2017**, *24* (6), 990–1002.
- (26) Webster, C. G.; Pichon, E.; van Munster, M.; Monsion, B.;
Deshoux, M.; Gargani, D.; Calevro, F.; Jimenez, J.; Moreno, A.; Krenz,
B.; Thompson, J. R.; Perry, K. L.; Fereres, A.; Blanc, S.; Uzest, M.
Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their
Aphid Vectors. *J. Virol.* **2018**, *92* (14), DOI: 10.1128/JVI.00432-18
- (27) Masson, V.; Arafah, K.; Voisin, S.; Bulet, P. Comparative
Proteomics Studies of Insect Cuticle by Tandem Mass Spectrometry:
Application of a Novel Proteomics Approach to the Pea Aphid
Cuticular Proteins. *Proteomics* **2018**, *18* (3–4), 1700368.
- (28) Guschinskaya, N.; Ressnikoff, D.; Arafah, K.; Voisin, S.; Bulet, P.;
Uzest, M.; Rahbé, Y. Insect mouthpart transcriptome unveils extension
of cuticular protein repertoire and complex organization. *iScience.* **2020**,
23, 100828.
- (29) Ioannidou, Z. S.; Theodoropoulou, M. C.; Papandreou, N. C.;
Willis, J. H.; Hamodrakas, S. J. CutProtFam-Pred: detection and
classification of putative structural cuticular proteins from sequence
alone, based on profile hidden Markov models. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
2014, *52*, 51–59.
- (30) He, N.; Botelho, J. M. C.; McNall, R. J.; Belozarov, V.; Dunn, W.
A.; Mize, T.; Orlando, R.; Willis, J. H. Proteomic analysis of cast cuticles
from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochem.*
Mol. Biol. **2007**, *37* (2), 135–146.
- (31) Cornman, R. S.; Togawa, T.; Dunn, W. A.; He, N.; Emmons, A.
C.; Willis, J. H. Annotation and analysis of a large cuticular protein
family with the R&R Consensus in *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics*
2008, *9*, 22.
- (32) Cornman, R. S.; Willis, J. H. Extensive gene amplification and
concerted evolution within the CPR family of cuticular proteins in
mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *38* (6), 661–676.
- (33) Zhou, Y.; Badgett, M. J.; Bowen, J. H.; Vannini, L.; Orlando, R.;
Willis, J. H. Distribution of cuticular proteins in different structures of
adult *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *75*, 45–57.
- (34) Conesa, A.; Götz, S. Blast2GO: A Comprehensive Suite for
Functional Analysis in Plant Genomics. *Int. J. Plant Genomics* **2008**,
2008, 619832.
- (35) Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene
Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$
Method. *Methods* **2001**, *25* (4), 402–408.
- (36) Mathers, T. C.; Chen, Y.; Kaithakottil, G.; Legeai, F.; Mugford, S.
T.; Baa-Puyoulet, P.; Bretaudeau, A.; Clavijo, B.; Colella, S.; Collin, O.;
et al. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables
a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome*
Biol. **2017**, *18* (1), 27.
- (37) Nicholson, S. J.; Nickerson, M. L.; Dean, M.; Song, Y.; Hoyt, P.
R.; Rhee, H.; Kim, C.; Puterka, G. J. The genome of *Diuraphis noxia*, a
global aphid pest of small grains. *BMC Genomics* **2015**, *16* (1), 429.

- (38) Gallot, A.; Rispe, C.; Leterme, M.; Gauthier, J. P.; Jaubert-Paussamai, S.; Tagu, D. Cuticular proteins and seasonal photoperiodism in aphids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 235–240.
- (39) Wenger, J. A.; Cassone, B. J.; Legeai, F.; Johnston, J. S.; Bansal, R.; Yates, A. D.; Coates, B. S.; Pavinato, V. A. C.; Michel, A. Whole genome sequence of the soybean aphid, *Aphis glycines*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *18* (1), 27.
- (40) Almagro Armenteros, J. J.; Tsirigos, K. D.; Sønderby, C. K.; Petersen, T. N.; Winther, O.; Brunak, S.; von Hejine, G.; Nielsen, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37* (4), 420–423.
- (41) Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (5), 1792–1797.
- (42) Chevenet, F.; Brun, C.; Banuls, A. L.; Jacq, B.; Christen, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinf.* **2006**, *7*, 439.
- (43) Notredame, C.; Higgins, D. G.; Heringa, J. T-coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. Edited by J. Thornton. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302* (1), 205–217.
- (44) Di Tommaso, P.; Moretti, S.; Xenarios, I.; Orobítg, M.; Montanyola, A.; Chang, J. M.; Taly, J. F.; Notredame, C. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (suppl_2), W13–W17.
- (45) Carolan, J. C.; Fitzroy, C. I. J.; Ashton, P. D.; Douglas, A. E.; Wilkinson, T. L. The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *Proteomics* **2009**, *9* (9), 2457–2467.
- (46) Carolan, J. C.; Caragea, D.; Reardon, K. T.; Mutti, N. S.; Dittmer, N.; Pappan, K.; Cui, F.; Castaneto, M.; Poulain, J.; Dossat, C.; Tagu, D.; Reese, J. C.; Reeck, G. R.; Wilkinson, T. L.; Edwards, O. R. Predicted Effector Molecules in the Salivary Secretome of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*): A Dual Transcriptomic/Proteomic Approach. *J. Proteome Res.* **2011**, *10* (4), 1505–1518.
- (47) Vandermoten, S.; Harmel, N.; Mazzucchelli, G.; De Pauw, E.; Haubruge, E.; Francis, F. Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species. *Insect Mol. Biol.* **2014**, *23* (1), 67–77.
- (48) Boulain, H.; Legeai, F.; Guy, E.; Morlière, S.; Douglas, N. E.; Oh, J.; Murugan, M.; Smith, M.; Jaquiéry, J.; Peccoud, J.; White, F. F.; Carolan, J. C.; Simon, J. C.; Sugio, A. Fast Evolution and Lineage-Specific Gene Family Expansions of Aphid Salivary Effectors Driven by Interactions with Host-Plants. *Genome Biol. Evol.* **2018**, *10* (6), 1554–1572.
- (49) Madhusudhan, V. V.; Miles, P. W. Mobility of salivary components as a possible reason for differences in response of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomol. Exp. Appl.* **1998**, *86*, 25–39.
- (50) Nardelli, A.; Vecchi, M.; Mandrioli, M.; Manicardi, G. C. The Evolutionary History and Functional Divergence of Trehalase (treh) Genes in Insects. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 62.
- (51) Febvay, G.; Delobel, B.; Rahbé, Y. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* **1988**, *66*, 2449–2453.
- (52) Heie, O. E. Paleontology and phylogeny. In *Aphids: their biology, natural enemies, and control*; Minks, A. A. K., Harrewijn, P., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1987; Vol. 2a, pp 367–391.
- (53) Zhou, Y.; Badgett, M. J.; Orlando, R.; Willis, J. H. Proteomics reveals localization of cuticular proteins in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *104*, 91–105.
- (54) Moussian, B. Molecular model of skeletal organisation and differentiation. In *Extracellular composite matrices in arthropods*; Cohen, E., Moussian, B., Eds.; Springer: Switzerland, 2016; pp 67–87.
- (55) Blackman, L. M.; Eastop, V. F. Taxonomic Issues. In *Aphids as Crop Pests*; van Emden, H. F., Harrington, R., Eds.; CABI: Wallingford, United Kingdom, 2007; pp 1–29.
- (56) Uzest, M.; Blanc, S. Non circulative virus-vector interactions. In *Microbe-Arthropode vector interactions*; Brown, J., Ed.; USA: Academic Press: San Diego, 2010; pp 59–72.
- (57) Rispe, C.; Legeai, F.; Papura, D.; Bretaudeau, A.; Hudaverdian, S.; Le Trionnaire, G.; Tagu, D.; Jaquiéry, J.; Delmotte, F. De novo transcriptome assembly of the grapevine phylloxera allows identification of genes differentially expressed between leaf- and root-feeding forms. *BMC Genomics* **2016**, *17* (1), 219.
- (58) Wistrom, C. M.; Blaisdell, G. K.; Wunderlich, L. R.; Botton, M.; Almeida, R. P. P.; Daane, K. M. No evidence of transmission of grapevine leafroll-associated viruses by phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*). *Eur. J. Plant Pathol.* **2017**, *147*, 147.
- (59) Andersen, S. O. Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *28* (5–6), 421–434.
- (60) Vannini, L.; Willis, J. H. Localization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins within the cuticle of *Anopheles gambiae*. *Arthropod Struct. Dev.* **2017**, *46* (1), 13–29.
- (61) Noh, M. Y.; Muthukrishnan, S.; Kramer, K. J.; Arakane, Y. *Tribolium castaneum* RR-1 cuticular protein TcCPR4 is required for formation of pore canals in rigid cuticle. *PLoS Genet.* **2015**, *11* (2), e1004963.
- (62) Liu, W.; Gray, S.; Huo, Y.; Li, L.; Wei, T.; Wang, X. Proteomic Analysis of Interaction between a Plant Virus and Its Vector Insect Reveals New Functions of Hemipteran Cuticular Protein. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (8), 2229–2242.
- (63) Badillo-Vargas, I. E.; Chen, Y.; Martin, K. M.; Rotenberg, D.; Whitfield, A. E. Discovery of Novel Thrips Vector Proteins That Bind to the Viral Attachment Protein of the Plant Bunyavirus Tomato Spotted Wilt Virus. *J. Virol.* **2019**, *93* (21), e00699–00619.
- (64) Falk, B. W.; Tsai, J. H. Biology and molecular biology of viruses in the genus *Tenuivirus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1998**, *36*, 139–163.
- (65) Dombrovsky, A.; Gollop, N.; Chen, S.; Chejanovsky, N.; Raccach, B. In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88* (Pt 5), 1602–1610.
- (66) Liang, Y.; Gao, X. W. The Cuticle Protein Gene MPCP4 of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) Plays a Critical Role in Cucumber Mosaic Virus Acquisition. *J. Econ. Entomol.* **2017**, *110* (3), 848–853.
- (67) Barry, M. K.; Triplett, A. A.; Christensen, A. C. A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29* (4), 319–327.
- (68) Behr, M.; Hoch, M. Identification of the novel evolutionary conserved obstructor multigene family in invertebrates. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (30), 6827–6833.
- (69) Jasarapura, S.; Specht, C. A.; Kramer, K. J.; Beeman, R. W.; Muthukrishnan, S. Gene families of cuticular proteins analogous to peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* have diverse functions. *PLoS One* **2012**, *7* (11), e49844.
- (70) Petkau, G.; Wingen, C.; Jussen, L. C. A.; Radtke, T.; Behr, M. Obstructor-A Is Required for Epithelial Extracellular Matrix Dynamics, Exoskeleton Function, and Tubulogenesis. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (25), 21396–21405.
- (71) Pesch, Y. Y.; Riedel, D.; Behr, M. Obstructor A Organizes Matrix Assembly at the Apical Cell Surface to Promote Enzymatic Cuticle Maturation in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (16), 10071–10082.
- (72) Andersen, S. O. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2000**, *30* (7), 569–577.
- (73) Arakane, Y.; Lomakin, J.; Gehrke, S. H.; Hiromasa, Y.; Tomich, J. M.; Muthukrishnan, S.; Beeman, R. W.; Kramer, K. J.; Kanost, M. R. Formation of Rigid, Non-Flight Forewings (Elytra) of a Beetle Requires Two Major Cuticular Proteins. *PLoS Genet.* **2012**, *8* (4), e1002682.
- (74) Dittmer, N. T.; Hiromasa, Y.; Tomich, J. M.; Lu, N.; Beeman, R. W.; Kramer, K. J.; Kanost, M. R. Proteomic and Transcriptomic Analyses of Rigid and Membranous Cuticles and Epidermis from the Elytra and Hindwings of the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Proteome Res.* **2012**, *11* (1), 269–278.

- 1214 (75) Noh, M. Y.; Kramer, K. J.; Muthukrishnan, S.; Kanost, M. R.;
1215 Beeman, R. W.; Arakane, Y. Two major cuticular proteins are required
1216 for assembly of horizontal laminae and vertical pore canals in rigid
1217 cuticle of *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *53*, 22–
1218 29.
- 1219 (76) Qiao, L.; Xiong, G.; Wang, R. X.; He, S. Z.; Chen, J.; Tong, X. L.;
1220 Hu, H.; Li, C. L.; Gai, T. T.; Xin, Y. Q.; Liu, X. F.; Chen, B.; Xiang, Z. H.;
1221 Lu, C.; Dai, F. Y. Mutation of a cuticular protein, BmorCPR2, alters
1222 larval body shape and adaptability in silkworm, *Bombyx mori*. *Genetics*
1223 **2014**, *196* (4), 1103–1115.
- 1224 (77) Pan, P. L.; Ye, Y. X.; Lou, Y. H.; Lu, J. B.; Cheng, C.; Shen, Y.;
1225 Moussian, B.; Zhang, C. X. A comprehensive omics analysis and
1226 functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *Proc.*
1227 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (20), 5175–5180.
- 1228 (78) Deshoux, M.; Monsion, B.; Uzest, M. Insect cuticular proteins
1229 and their role in transmission of phytoviruses. *Curr. Opin. Virol.* **2018**,
1230 *33*, 137–143.
- 1231 (79) Bahrami-Kamangar, S.; Christiaens, O.; Taning, C.; De Jonghe,
1232 K.; Smagghe, G. The cuticle protein MPCP2 is involved in Potato virus
1233 Y transmission in the green peach aphid *Myzus persicae*. *J. Plant Dis.*
1234 *Prot.* **2019**, *126*, 1–7.
- 1235 (80) Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.;
1236 Hewapathirana, S.; Kundu, D. J.; et al. The PRIDE database and related
1237 tools and resources in 2019: improving support for quantification data.
1238 *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D442–D450.

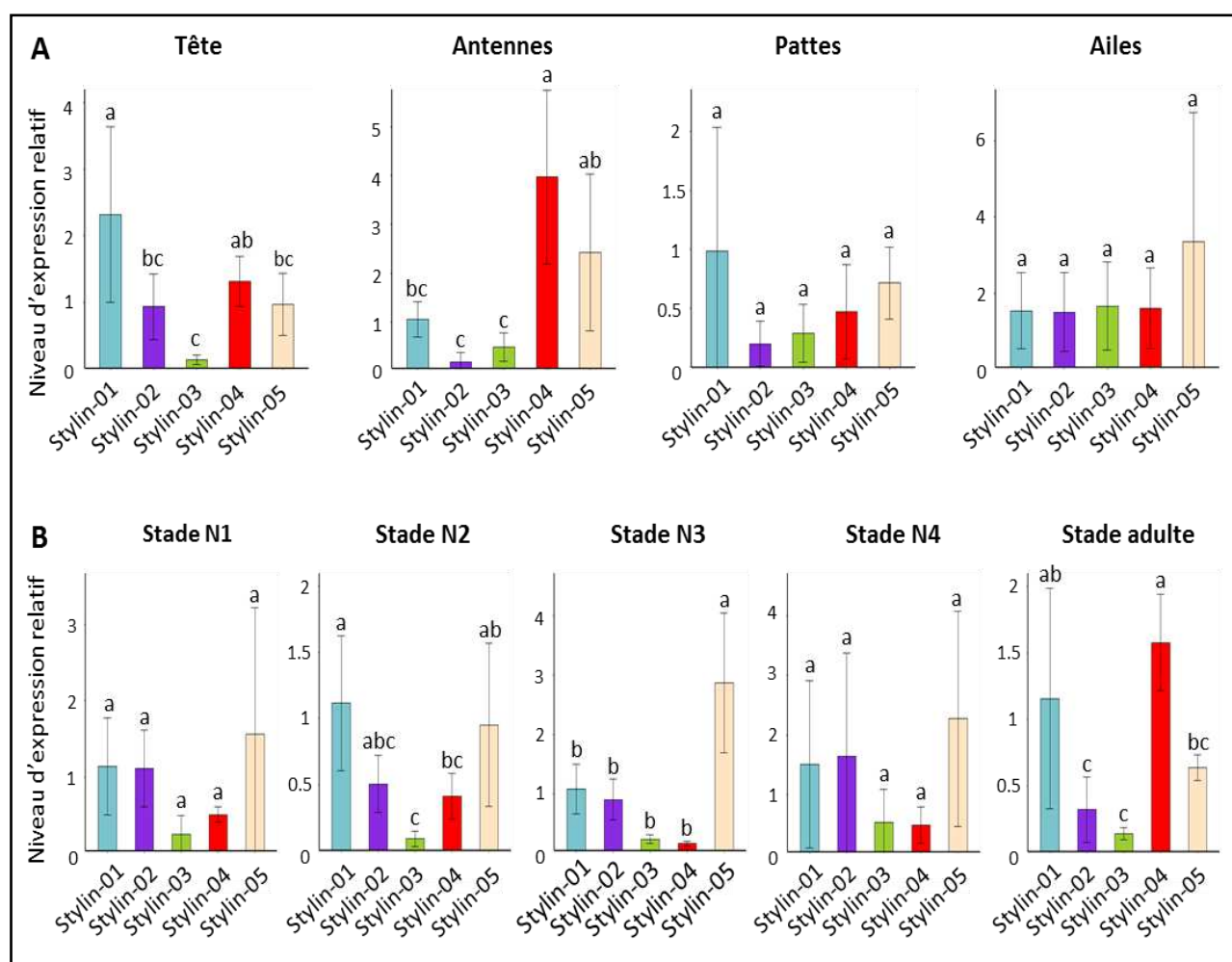


Figure 12. Niveaux d'expression relatifs des gènes *stylins* dans différents tissus du puceron *A. pisum*, et à tous les stades de développement

A) Expression des gènes *stylins* mesurés par PCR quantitative dans les antennes, la tête, les pattes et les ailes par rapport au niveau d'expression du gène *stylin-01*. **B)** Expression des gènes *stylins* mesurés par PCR quantitative aux stades N1, N2, N3, N4 et adulte par rapport au niveau d'expression du gène *stylin-01*. Les gènes *actine* et *EF1 α* ont été utilisés pour la normalisation des données. Les résultats sont représentés sous la forme « moyenne \pm écart-type », calculée pour 3 répliques biologiques indépendants. Les lettres minuscules indiquent des différences significatives entre les échantillons (test de TukeyHSD).

3. Caractérisation des propriétés des stylines

Une première caractérisation a été d'étudier la spécificité d'expression des cinq stylines dans différents tissus du puceron et au cours du développement de l'insecte. En plus des résultats figurant dans l'article, des analyses complémentaires sont exposées dans ce paragraphe. Nous avons aussi recherché les protéines dans l'exosquelette du puceron via des immuno-marquages de mues.

3.1. Niveaux d'expression des gènes *stylins*

Les niveaux d'expression des gènes *stylin-01*, *-02*, *-03*, *-04* et *-05* chez *A. pisum*, rapportés à deux gènes de ménage (*actin* et *EFl α*), ont été obtenus en PCR quantitative et calculés selon la méthode développée par Livak and Schmittgen (2001). Ils sont présentés ci-après. Il faut cependant préciser que les résultats associés à *Stylin-04* ne sont donnés qu'à titre indicatif. *Stylin-04* et *Stylin-04bis* étant très proches, nous n'avons pas été capables de discriminer leurs transcrits avec une telle approche (amorces non spécifiques).

Expression des gènes stylins dans différents tissus

Dans l'article, nous présentons les niveaux d'expression relatifs de chaque gène *stylin* dans les antennes, les pattes et les ailes, en comparaison avec la tête entière (sans les antennes) (Fig. 6-A - article). Ces résultats peuvent être aussi représentés d'une autre manière, en comparant cette fois les niveaux d'expression avec le gène *stylin-01*, structure par structure (Fig. 12-A).

De cette manière, nous constatons que *stylin-01* est le gène le plus exprimé au niveau de la tête et *stylin-03* le moins exprimé. Dans les antennes, *stylin-04* puis *stylin-05* sont plus exprimés que les trois autres. Ces résultats ne sont pas cependant pas soutenus statistiquement. Enfin, dans les pattes et les ailes, il n'y a pas de différence significative entre les niveaux d'expression des cinq gènes.

Expression des stylins au cours du développement

Dans l'article, nous présentons les résultats des niveaux d'expression des cinq gènes *stylins* dans la tête du puceron (antennes comprises), à chaque stade de développement, en comparaison avec le stade N1 (Fig. 6-B - article). Nous pouvons aussi comparer chaque gène avec *stylin-01*, stade par stade (Fig. 12-B). Les seules différences significatives d'expression des différents gènes sont observées aux stades N2, N3 et adulte. Ainsi, nous constatons qu'au stade N2 les gènes *stylin-01* et *stylin-05* sont les plus exprimés. Au stade N3, il s'agit de *stylin-05* et enfin au stade adulte, c'est *stylin-04* et *stylin-01* qui sont les plus exprimés.

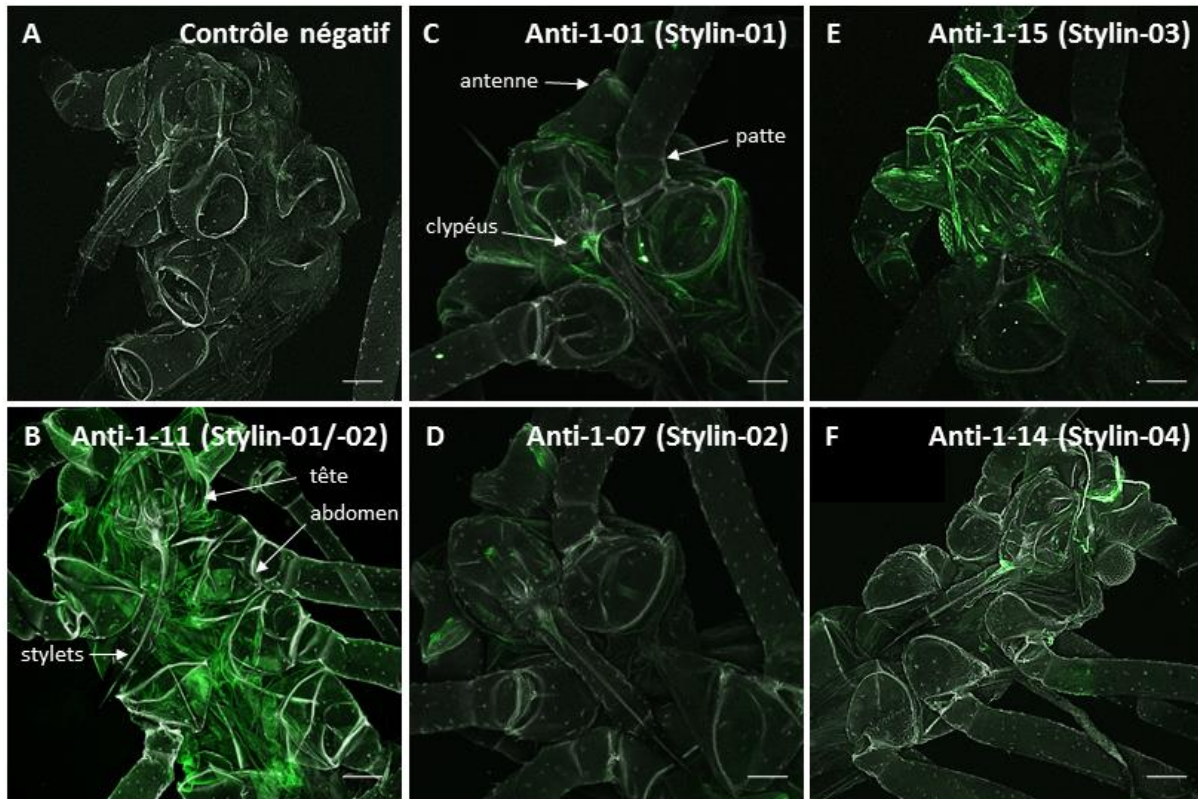


Figure 13. Détection par immuno-marquages des stylines RR-1 dans les mues d'*A. pisum*

A) Contrôle négatif, mue incubée avec un anticorps secondaire uniquement. B-F) Mues incubées avec différents anticorps primaires : B) anti-1-11 dirigé contre le peptide 1-11, commun à Stylin-01 et Stylin-02, C) anti-1-01 dirigé contre le peptide 1-01 de Stylin-01, D) anti-1-07 dirigé contre le peptide 1-07 de Stylin-02, E) anti-1-15 dirigé contre le peptide 1-15 de Stylin-03, F) anti-1-14 dirigé contre le peptide 1-14 de Stylin-04. Toutes les mues ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire, couplé à un fluorochrome (AlexaFluor®488). La fluorescence a été observée en microscopie confocale (ZEISS, laser 488nm, BP 450-490, LP515). Les images correspondent à une projection maximale d'un ensemble d'images prises à différentes profondeurs. Les échelles représentent 100 μm.

Conclusion

Les gènes *stylins* sont exprimés dans la tête, mais pas uniquement : ils le sont également dans d'autres appendices tels que les antennes, les pattes et les ailes. Ils sont ensuite exprimés à tous les stades de développement, avec un pic d'expression aux stades N3 et surtout N4.

De manière générale, il existe une grande variabilité d'expression au sein d'un même tissu et tout le long du développement de l'insecte, principalement au stade N4 qui est aussi le stade le plus long chez *A. pisum* (55 h) (Febvay et al., 1988).

3.2. Détection des stylines dans les mues de puceron

En complément des analyses *in situ* sur stylets disséqués, des immuno-marquages ont été réalisés sur des mues du puceron *A. pisum*. Nous les avons incubées avec quelques-uns de nos anticorps dirigés contre les stylines, puis avec un anticorps secondaire lié à un fluorochrome pour pouvoir réaliser des observations en microscopie confocale (voir matériel et méthodes pour le protocole détaillé).

Nous avons pu observer que le peptide 1-11, commun à Stylin-01 et Stylin-02, est également accessible dans tout l'exosquelette, aussi bien dans la tête que dans l'abdomen, et à la pointe des stylets (**Fig. 13-B**). A l'inverse, les peptides uniques 1-01 (Stylin-01, **Fig. 13-C**) et 1-07 (Stylin-02, **Fig. 13-D**) ne sont accessibles que dans certaines zones : au niveau de l'intersection des segments antennaires, parfois à la base des pattes ou encore dans le clypéus (un des sclérites qui composent la tête des arthropodes). C'est également le cas du peptide 1-14 appartenant à Stylin-04, détecté surtout dans le clypéus (**Fig. 13-F**). En ce qui concerne Stylin-03, le peptide 1-15 est détecté dans toute la tête, tandis qu'il n'est pas détecté dans l'abdomen (**Fig. 13-E**). Il est intéressant de noter que les peptides ne sont pas accessibles de manière homogène dans les mues de l'insecte. Les marquages, qui n'ont pas été réalisés avec de la chitinase, présentent parfois une fluorescence assez faible (cas du peptide 1-07 par exemple).

4. Conclusion

La première partie de mon travail de thèse a permis d'identifier cinq protéines cuticulaires possédant des peptides directement accessibles en surface de l'acrostyle. Elles sont toutes susceptibles d'interagir avec des composés de plante, de salive, ou encore des particules virales. Nous nous focaliserons en priorité sur les quatre RR-1 (Stylin-01 à -04) dans la suite de mon travail de thèse, c'est-à-dire sur les quatre protéines pour lesquelles nous avons identifié les peptides les plus accessibles en surface de l'acrostyle. Stylin-05 n'a pas encore été suffisamment caractérisée : peu d'anticorps ont été testés et nous devons d'abord en produire d'autres pour savoir si d'autres peptides seraient plus accessibles.

En plus d'avoir un rôle dans l'acrostyle qui reste à déterminer, les stylines entrent dans la composition de la cuticule au niveau de l'exosquelette. Elles pourraient donc avoir, là aussi, un rôle prépondérant dans les propriétés physiques et l'intégrité de la structure de la cuticule. Ceci a déjà été démontré chez *T. castaneum* pour la protéine RR-1 TcCPR4, pour qui la diminution d'expression du gène entraîne des malformations de la cuticule, particulièrement au niveau des élytres (Noh et al., 2015).

Par ailleurs, le fait que les stylines ne soient pas uniquement présentes dans l'acrostyle et que leurs gènes soient très variables au cours du développement, va grandement complexifier les études de validation fonctionnelle qui font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2

—

Mise au point d'outils de validation fonctionnelle des stylines

1. Contexte de l'étude

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié cinq protéines avec des peptides directement accessibles dans l'acrostyle : les stylines. La mise en place d'approches de validation fonctionnelle est désormais l'objectif de ce nouveau chapitre. Elle représente en effet une étape indispensable pour la compréhension du rôle des stylines à la surface de l'organe.

L'étude fonctionnelle d'un gène consiste notamment à inhiber ou supprimer, *in vivo*, son expression, puis à analyser les phénotypes associés. Durant ma thèse, deux approches de validation fonctionnelle ont été développées dans l'équipe.

La première est la technique de l'**ARN interférence** (ou RNAi) qui vise à diminuer l'expression d'un gène en réduisant le nombre de transcrits. Elle a d'abord été mise au point sur les gènes *stylin-01* et *stylin-02* (dont les protéines ont été identifiées en premier dans les stylets) puis sur *stylin-03* et *stylin-04*, tandis que nous n'avons pas encore démarré d'essai avec *stylin-05*. Cette mise au point a été fastidieuse et a nécessité au total plus de deux années de travail au cours desquelles de nombreuses méthodes ont été testées. Elle a ainsi sollicité plusieurs membres de l'équipe (Elodie Pichon, Bastien Cayrol et Craig Webster), et j'ai moi-même participé à ce projet lors de mon stage de master 2, puis tout au long de ma thèse.

La seconde approche est la **technique CRISPR-Cas9**, développée pour la toute première fois chez le puceron par l'équipe de Gaël Le Trionnaire (UMR IGEPP, Inra, Rennes) avec qui nous collaborons. Le gène codant pour Stylin-01 a été choisi suite à la découverte de son potentiel rôle dans la transmission d'un virus ([voir chapitre 3](#)). Là encore, presque deux ans de mise au point auront été nécessaires, avant la naissance des premières lignées *A. pisum* pour lesquelles le gène *stylin-01* a été muté.

Nous avons fait le choix de présenter ces deux approches dans un chapitre à part entière, car elles sont indispensables pour la compréhension de la suite de la thèse. Cependant, ce chapitre n'est pas à proprement parlé un chapitre « résultats ». Il a plutôt pour vocation de présenter les contextes dans lesquelles ces études ont été réalisées, ainsi que les contraintes auxquelles nous nous sommes heurtées. La mise au point de l'ARN interférence et la méthode désormais utilisée en routine au laboratoire, seront décrites dans ce chapitre. Concernant l'obtention des lignées KO via le système CRISPR-Cas9, le protocole détaillé, qui a fait l'objet d'une publication dont je suis co-auteur, sera également présenté. La recherche des phénotypes associés sera, quant à elle, décrite au cours des [chapitres 3 et 4](#).

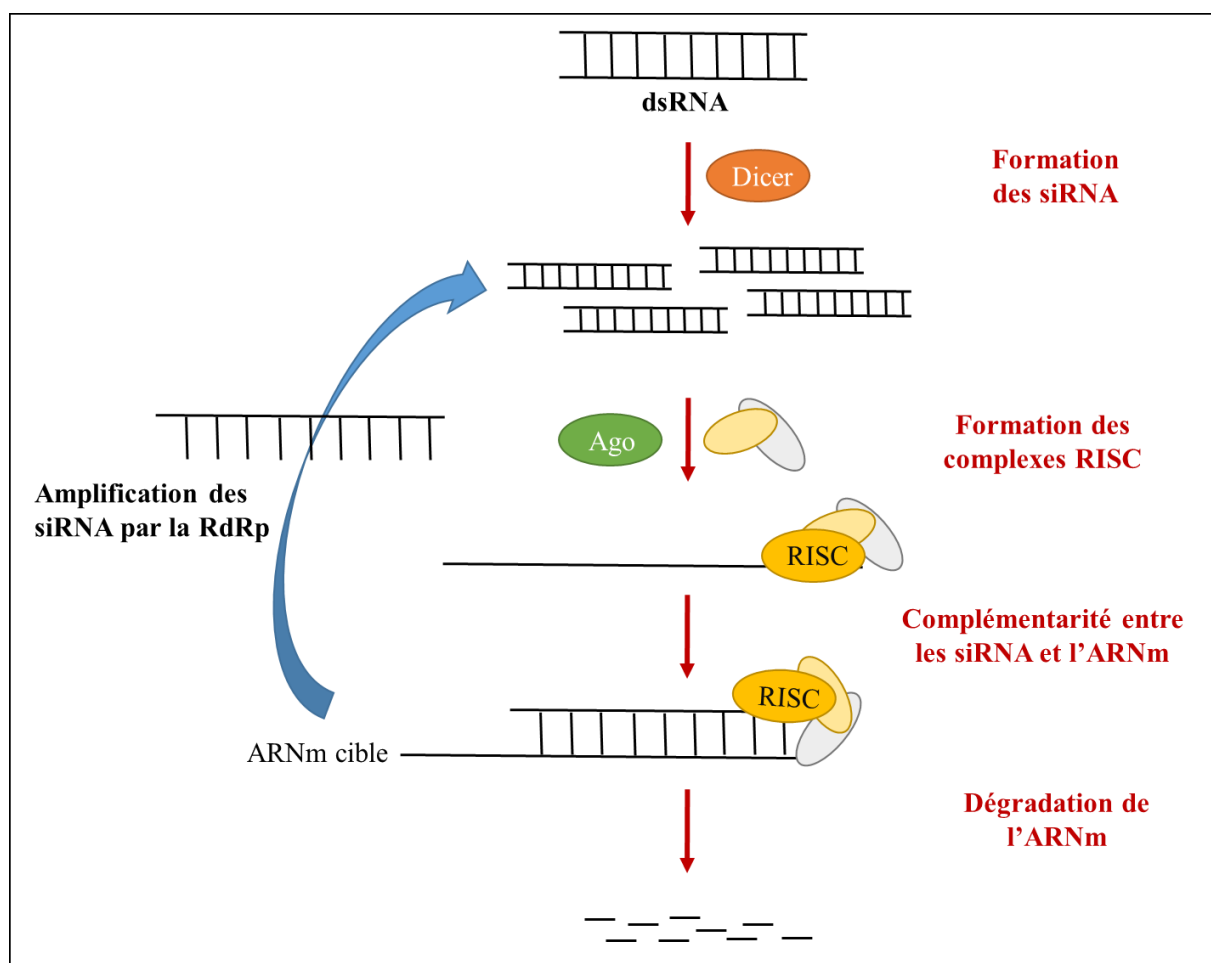


Figure 14. Schéma de la voie RNAi chez les eucaryotes

Le mécanisme de l'ARN interférence repose sur un ARN guide présent sous une forme double brin. L'ARN double brin va être clivé via une ribonucléase de type III appelée Dicer, amenant à la formation de petits ARN interférents (siRNA) et microRNA (miRNA), de 18 à 24 nucléotides. Ces derniers vont eux-mêmes être recrutés par les protéines Argonaute (AGO) pour former les complexes RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ces complexes déclenchent alors l'inhibition de l'expression d'un ou plusieurs gènes qui possèdent une complémentarité de séquence avec l'ARN guide. Ces mécanismes se déroulent à deux niveaux. Au niveau post-transcriptionnel (*PTGS : post-transcriptional gene silencing*), les RISC dégradent les ARN ou inhibent leur traduction. Ils ont également une action au niveau transcriptionnel (*TGS : transcriptional gene silencing*) via des modifications de l'ADN ou des histones menant à la formation d'hétérochromatine permettant ainsi l'inhibition de la synthèse d'ARN. De plus, un mécanisme d'amplification ou de diffusion du signal qui se propage de cellule en cellule, est en général induit par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). Cette enzyme utilise les siRNA issus du découpage des dsRNA comme amorces pour produire des siRNA secondaires.

Adapté de Majumdar et al. (2017)

2. Mise au point de l'approche ARN interférence

2.1. Présentation de l'ARN interférence

Chez le puceron, une des méthodes de validation fonctionnelle est la technique de l'**ARN interférence**, plus communément appelée *silencing* (Fig. 14). Elle consiste à inhiber l'expression d'un gène via de petits ARN double brin non codants qui entraînent une réduction spécifique de ses transcrits. Les phénotypes induits par la diminution ou l'absence totale de la protéine associée sont alors observés.

Une efficacité variable chez le puceron

Le *silencing* peut être initié dans les cellules du puceron via l'administration d'ARN double brin (dsRNA) produits *in vitro*, ou directement de siRNA synthétisés chimiquement. Les siRNA peuvent également être obtenus *in vitro* après clivage de dsRNA par l'enzyme Dicer. Différentes techniques d'administration des dsRNA/siRNA existent : par injection dans l'hémolymphe de l'insecte, par ingestion sur un milieu artificiel ou sur plantes transgéniques (arabette ou tabac) produisant des siRNA, ou encore, plus récemment, par pulvérisation directe des pucerons avec des siRNA associés à des nanoparticules (Kanakala and Ghanim, 2016; Thairu et al., 2017).

Le *silencing* a été mise au point pour la toute première fois chez *A. pisum*, sur le gène *c002*, c'est-à-dire sur le gène le plus exprimé dans les glandes salivaires (Mutti et al., 2006). Les auteurs ont injecté des siRNA spécifiques du gène *c002* directement dans des pucerons adultes. Ils ont alors observé une diminution des transcrits dans les têtes d'environ 40 %, 72 h après injection. Depuis, cette approche a été appliquée à de nombreuses reprises pour étudier les fonctions de différents gènes, codant aussi bien pour des protéines salivaires que des protéines à activité enzymatique, ou encore des protéines impliquées dans le métabolisme et le développement (Kanakala and Ghanim, 2016). Le RNAi représente ainsi un outil intéressant pour identifier et neutraliser les gènes clés du puceron. Il est par ailleurs développé dans certains laboratoires dans le but de cibler des gènes essentiels chez l'insecte et pouvoir ainsi réduire des populations de ravageurs.

Les études ont néanmoins rapporté des efficacités de *silencing* extrêmement variables, atteignant parfois 0 % (pas de diminution des transcrits). C'est par exemple le cas du gène *c002* dont l'expression n'a pas toujours été diminuée avec succès (Christiaens et al., 2014), malgré l'application des mêmes conditions dans différents laboratoires (Mutti et al., 2006). La meilleure efficacité de *silencing* rapportée dans la littérature s'élève à 90 % (Xiao et al., 2015), tandis que des phénomènes de surexpression ont parfois été observés (jusqu'à 80 %) (Will et al., 2017).

L'efficacité dépend en effet de nombreux critères : l'espèce, l'état physiologique du puceron, la nature et l'expression du gène ciblé, la méthode d'administration et la concentration du traitement (Mulot et al., 2016; Sapountzis et al., 2014), et sûrement beaucoup d'autres non élucidés. De plus, chez le puceron et les

insectes en général, la preuve de l'existence des protéines RdRp n'a encore pas été apportée et le mécanisme d'amplification ou de diffusion du signal RNAi n'est toujours pas caractérisé (Tijsterman et al., 2002; Zong et al., 2009). Des études ont démontré la persistance d'ARN double brin fluorescents ou marqués avec des colorants, 24 à 72 h après ingestion sur milieu artificiel, et ceci chez plusieurs espèces (Bilgi et al., 2017; Wang et al., 2015a).

Application aux gènes cuticulaires

Peu d'études ont employé l'approche RNAi pour valider la fonction de protéines cuticulaires chez le puceron (Shang et al., 2019; Kamangar et al., 2019; Guo et al., 2014; Liang and Gao, 2017; notre étude décrite dans l'article chapitre 3). De plus, elles ont presque toutes ciblé les mêmes gènes, chez la même espèce *M. persicae*. En effet, avant l'étude de Masson et al. (2018) qui a détecté une centaine de protéines cuticulaires dans l'exosquelette d'*A. pisum*, et avant notre analyse protéomique (voir chapitre 1), seules cinq protéines cuticulaires avaient été décrites chez *M. persicae* : trois RR-2 (MPCP1, MPCP2 et MPCP3) et deux RR-1 (MPCP4, qui est en fait l'homologue de Stylin-01, et MPCP5) (Dombrovsky et al., 2007a).

Dans une étude, les auteurs ont cherché à générer des plantes transgéniques qui cibleraient des gènes clés pour le puceron. Pour cela, ils ont mesuré les taux de fécondité de pucerons s'alimentant sur des plantes (*Nicotiana tabacum*) synthétisant des ARN double brin contre plusieurs gènes. L'un d'entre eux est le gène codant pour la protéine cuticulaire B-CPRR1 qui n'est autre que MPCP4/Stylin-01 (Guo et al., 2014). Ils n'ont cependant pas observé de diminution des transcrits et aucun phénotype associé au traitement n'a été rapporté.

Ces protéines ont aussi été étudiées afin d'évaluer leur rôle dans la transmission de certains virus de plante. Une première étude a recherché leur implication dans la transmission du CMV (Liang and Gao, 2017). Suite à une interaction dans le système double-hybride en levure entre MPCP4/Stylin-01 et la capsid du CMV, les auteurs ont laissé des pucerons s'alimenter sur un milieu artificiel contenant des ARN double brin ciblant *stylin-01*, et comparé différentes durées d'acquisition (24, 48 et 72 h). Ils ont observé une réduction efficace des transcrits à 48 h uniquement, avec une diminution moyenne d'environ 50 %. Plus récemment, une autre étude a ciblé les cinq gènes (*mcp1* à *mcp5*) pour déterminer leur rôle dans la transmission du PVY (Kamangar et al., 2019). Les ARN double brin ont aussi été délivrés oralement sur milieu artificiel pendant 48 h et le traitement a cette fois été administré à des larves N2. Il a permis de réduire significativement les transcrits des gènes *mcp1* et *mcp2* de 63 % et 75 %, mais aucun effet du traitement n'a été observé pour les trois autres (dont *stylin-01*).

Ces études exposent très bien la difficulté d'éteindre un gène cuticulaire. Comme pour *c002*, l'efficacité du *silencing* s'est révélée extrêmement variable pour un même gène considéré, comme illustré ici avec le gène *mcp4/stylin-01* : deux études différentes n'ont pas réussi à diminuer son expression alors que la troisième y est parvenue.

2.2. Application aux gènes *stylins*

Des études préliminaires étaient indispensables pour déterminer la méthode la plus efficace pour éteindre les gènes *stylins*. Une difficulté à laquelle nous nous sommes heurtés est que les stylets sont des structures dépourvues de cellules et leur composition ne peut changer au cours d'un même stade. Le traitement RNAi n'aura donc aucun effet sur la quantité de stylines déjà présentes dans l'acrostyle des stylets formés. Ceci impose de se placer dans une fenêtre de temps où l'insecte produit des transcrits, c'est-à-dire avant la mue, lorsqu'il synthétise ses nouveaux stylets. Mettre en place le RNAi à un stade larvaire précoce ou intermédiaire devrait ainsi permettre d'observer un phénotype au(x) stade(s) suivant(s).

Pour répondre au mieux à nos questions de recherche, nous avons travaillé au départ avec deux espèces différentes, *A. pisum* et *M. persicae*. Etant donné qu'il était impossible de prédire quelle méthode serait la plus adaptée à nos conditions, nous avons testé différents paramètres comme (i) **le type de molécule** (dsRNA ou siRNA) ainsi que **la concentration** utilisés, les séquences ayant été définies avec l'outil en ligne, E-RNAi (<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3/>) ; (ii) **la méthode d'administration**, nous avons testé l'injection dans le corps de l'insecte, l'ingestion sur milieu artificiel ou à partir de plantes transgéniques *A. thaliana* synthétisant des siRNA spécifiques des gènes *sylin-01*, *-02* et *-03* de manière constitutive ; (iii) **le stade auquel administrer le traitement** ; et enfin (iv) **la durée du traitement**.

Par ailleurs **le choix des contrôles** s'est avéré compliqué. Nous avons rapidement rencontré des difficultés avec les dsRNA/siRNA contrôles qui engendraient parfois des taux de mortalité anormalement élevés dans nos populations, ou avaient un impact sur l'expression des gènes étudiés (cas des dsRNA EGFP et des dsRNA LacZ pourtant utilisés en routine dans d'autres laboratoires).

Pour évaluer l'efficacité du traitement, la quantité de transcrits était systématiquement vérifiée par PCR quantitative, selon la méthode développée par Livak and Schmittgen (2001), sur les têtes (*A. pisum*) ou sur les pucerons entiers (*M. persicae*). Deux gènes de ménages (Actine et EF1 α) étaient mesurés en parallèle pour calculer les niveaux d'expression relatifs des gènes *stylins*.

Dès les premières études, le *silencing* des gènes *stylins* s'est révélé très compliqué et continue aujourd'hui de nous poser des problèmes. Les cinétiques d'expression ont malheureusement révélé une très grande variabilité dans la diminution des transcrits au cours du temps, avec un manque de répétabilité d'une expérience à l'autre. Les traitements ont très souvent été inefficaces, et ont même parfois engendré une surexpression importante des gènes. De plus, nous avons quelquefois obtenu un *silencing* « non-spécifique » d'autres stylines lorsque nous avons nourri les pucerons sur plantes transgéniques. Cette méthode, qui s'est déjà révélée inefficace dans une autre étude (Guo et al., 2014), a été abandonnée par l'équipe.

Nous pensons que la grande variabilité d'expression des gènes *stylin* au cours du temps (voir chapitre 1), notamment aux stades N3 et N4 pourrait expliquer en partie ces problèmes. Natalia Guschinskaya, une de nos collaboratrices, a précisément mesuré l'expression de plusieurs gènes cuticulaires, dont *stylin-01* et *stylin-02* dans la tête du puceron *A. pisum* et ceci à 12 temps différents au cours du stade N4. Elle a constaté que l'expression des gènes n'était pas constante au cours du temps, mais qu'il y avait un pic d'expression quelques heures seulement avant la mue. Le fait que les pucerons n'aient pas tous strictement le même âge au moment des prélèvements (synchronisation des pucerons sur plusieurs heures, décalage accentué par les vitesses de développement de chaque individu, etc.) peut probablement impacter fortement nos analyses.

Malgré des efficacités de *silencing* pas toujours optimales, et ce même après plusieurs années de mise au point, nous avons préféré allouer du temps à la recherche des phénotypes, déjà conséquente, plutôt qu'à une amélioration sans fin du protocole de *silencing*. Finalement, nous avons choisi d'administrer à des larves *M. persicae* des **siRNA** à une concentration de **1 μ M**, contenus dans un milieu artificiel, le milieu AP3 (Febvay et al., 1988), durant **72 h**. En parallèle d'autres larves étaient mises en acquisition sur milieu contenant des siRNA contrôles, fournis par une compagnie privée (NC-siRNA).

Leur diffusion à l'intérieur de l'organisme du puceron a été observée en utilisant des siRNA couplés à un fluorochrome (**Fig. 15**).

Finalement, nous avons réussi à diminuer l'expression des gènes *stylin-01* et *stylin-02* en moyenne de 66% et 28%. Ces protocoles ont ensuite été appliqués à plusieurs reprises sur les gènes *stylin-01* à *-04* pour rechercher les phénotypes associés (transmission de virus, comportement alimentaire ou traits d'histoire de vie) qui seront décrits dans les chapitres 3 et 4.

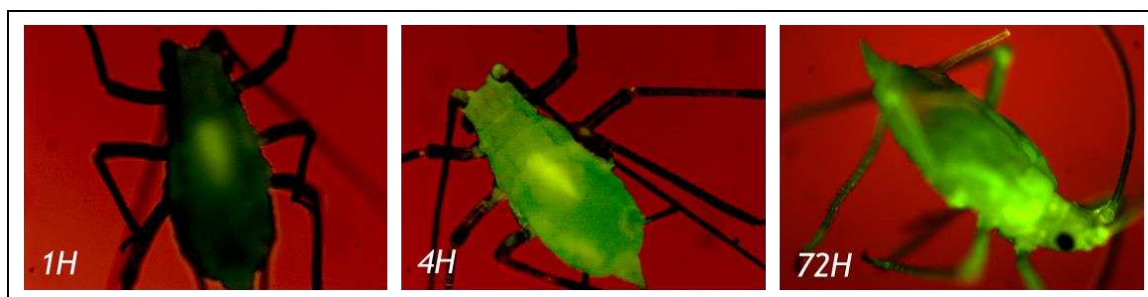


Figure 15. Administration de siRNA fluorescents aux pucerons

Des pucerons *M. persicae* ayant ingéré des siRNA couplés à un fluorochrome Alexa-488 ont été observés au microscope à épifluorescence. De la fluorescence est visible après une heure au niveau de l'intestin puis de manière diffuse dans tout le corps du puceron après 4 h et 72 h.

Cliché E. Pichon

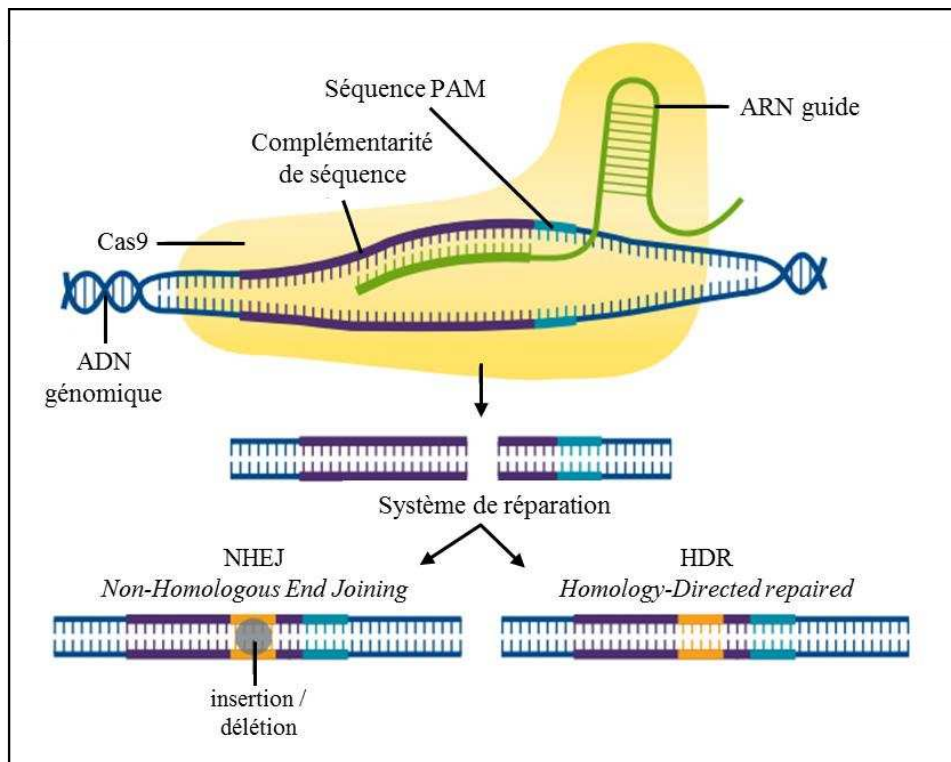


Figure 16. Schéma du système CRISPR-Cas9

La coupure de l'ADN repose sur un ARN guide monobrin et sur une nucléase Cas9. L'ARN guide contient une séquence de 20 nucléotides complémentaires à la séquence d'ADN ciblée, et une séquence universelle de 120 nucléotides qui présente une structure en épingle à cheveux nécessaire à la formation du complexe ARN guide-Cas9. Une fois ce complexe délivré dans l'organisme d'intérêt, la Cas9 se fixe sur une séquence consensus 5-NGG-3' appelée PAM (*Protospacer adjacent motif*). Ce motif constitue un déterminant critique de la liaison du complexe à l'ADN cible puisqu'il induit la séparation ultérieure des brins de la double hélice d'ADN. La Cas9 reconnaît ensuite la complémentarité ADN /ARN et clive précisément chaque brin via son activité lytique qui génère une cassure double brin à bout franc à une position située 2 à 5 bases en amont de la séquence PAM. L'ADN est ensuite réparé par un système cellulaire endogène tel que le système NHEJ (*Non homologous end joining*) ou HDR (*Homology-directed repair*). Le système NHEJ est connu pour son taux d'erreur important, causant parfois des erreurs telles que des insertions ou des délétions d'un ou plusieurs nucléotides, provoquant ainsi de lourdes mutations génomiques de l'ADN.

Adapté de Charpentier and Doudna (2013)

3. Obtention de mutants CRISPR-cas9 pour le gène *stylin-01*

Ne disposant pas à l'heure actuelle d'une technique efficace et reproductible pour valider la fonction d'un gène chez le puceron, il apparaissait crucial de poursuivre la recherche de nouvelles stratégies. Le système CRISPR-Cas9 représentait une bonne alternative. Il a fait ses preuves chez de nombreux insectes mais n'avait pas encore été développé chez le puceron jusqu'à aujourd'hui.

3.1. Présentation du système CRISPR-Cas9

Avant que la technologie CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated 9*) soit développée, les méthodes utilisées pour modifier le génome de différents organismes reposaient sur l'utilisation de ZFNs (*Zinc Finger Nucleases*), des nucléases en doigt de zinc, et de TALENs (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*), des nucléases effectrices de type activateur de transcription (Gaj et al., 2013). Ces deux systèmes d'édition du génome ont depuis été remplacés par le système CRISPR-Cas9 dont la mise en place est plus rapide et efficace (Lander, 2016; Mohanraju et al., 2016; Wang et al., 2016a; Westra et al., 2016) (Fig. 16). Il s'agit d'un système de coupures ciblées du génome découvert chez les bactéries, leur permettant de se protéger contre l'invasion d'acides nucléiques étrangers, comme ceux des virus ou des phages (Fineran and Charpentier, 2012; Horvath and Barrangou, 2010). Souvent comparé à des « ciseaux moléculaires », il est utilisé en génie génétique pour modifier facilement et rapidement le génome des cellules animales et végétales (Cho et al., 2013; Feng et al., 2013).

Le système CRISPR-Cas9 présente plusieurs avantages par rapport au RNAi. Ici, l'expression du gène ciblé est totalement supprimée, contrairement au RNAi où elle est seulement réduite. Ensuite, les modifications du génome sont stables et héréditaires, alors que le RNAi est un processus transitoire.

CRISPR-Cas9 chez les insectes

Le système CRISPR-Cas9 est appliqué en routine chez la drosophile (Bassett and Liu, 2014) et a fait ses preuves chez les Diptères (*Aedes aegypti* ou *Anopheles gambiae* par exemple), les Lépidoptères (*Spodoptera littoralis* ou *Bombyx mori*), les Orthoptères (*Locusta migratoria*), les Coléoptères (*T. castaneum*), les Hyménoptères (*Nasonia vitripennis*) et autres arthropodes (Cui et al., 2017; Sun et al., 2017; Taning et al., 2017). Il a été utilisé pour caractériser les gènes associés à de nombreux processus physiologiques, tels que le développement embryonnaire (Bi et al., 2016; Huang et al., 2016; Li et al., 2017b; Liu et al., 2017), la perception des phéromones sexuelles (Zhu et al., 2016), la détermination du sexe et la durée de vie (Xu et al., 2017; Zhang et al., 2017), la formation des yeux et des pigments (Khan et al., 2017; Perry et al., 2016; Zhang and Reed, 2016), ou encore le comportement migratoire (Markert et al., 2016). La résistance des insectes aux insecticides a également été analysée à l'aide de ce système (Bajda et al., 2017; Douris et al., 2017; Ngai et al., 2017; Wang et al., 2016b; Zimmer et al., 2016). De plus, il représente une

stratégie intéressante pour le contrôle et la régulation des ravageurs des cultures (Awata et al., 2015; Douris et al., 2017; Khan et al., 2017; Koutroumpa et al., 2016; Li et al., 2016; Wang et al., 2016b).

L'ADN plasmidique (source de Cas9 et ARN guide) était initialement injecté directement dans les œufs des insectes afin de cibler les cellules germinales. Étant donné qu'ils sont petits, fragiles, et qu'ils présentent un taux d'éclosion relativement faible, l'efficacité des mutagénèses étaient globalement très inférieures à celles des mammifères (Sun et al., 2017). Afin de l'améliorer, une première étude a injecté non pas des œufs mais des embryons de drosophile, augmentant drastiquement l'efficacité de la mutagénèse qui a atteint 88 % (Bassett et al., 2013). De plus, injecter directement l'ARN guide et l'enzyme Cas9 dans des œufs de *Nasonia vitripennis*, une guêpe parasitoïde, a grandement facilité le processus expérimental (Li et al., 2017a). Depuis, la méthode principale couramment employée repose sur l'injection de l'ARN guide et de l'enzyme Cas9 directement dans des cellules uniques, ou bien des embryons précoces.

3.2. Mise au point chez le puceron

La mise en œuvre du système CRISPR-Cas9 paraissait plus complexe chez le puceron, pour de nombreuses raisons. Une première étude avait tenté d'administrer l'ARN guide et l'enzyme Cas9 par électroporation dans des femelles vivipares d'*A. pisum* afin d'éteindre le gène *tor* responsable de la pigmentation de la cuticule (Jamison et al., 2018). Les auteurs ont cependant observé un taux de mutation égal à zéro, indiquant que l'injection d'embryons dans des femelles parthénogénétiques (comme cela a été fait chez d'autres insectes) ne semble pas être une approche envisageable chez le puceron.

L'injection d'œufs de pucerons présente l'avantage de pouvoir maintenir, par la suite, les lignées stables qui auront éclos via une reproduction asexuée. Néanmoins, la production d'œufs n'est pas chose aisée. Elle nécessite, dans un premier temps, de réussir à générer des mâles et femelles sexués (nous ne possédons que des femelles vivipares dans nos élevages au laboratoire qui se multiplient par parthénogénèse). Ensuite, l'apparition de morphes sexués est un événement annuel unique, obligatoirement déclenché par une diminution de la photopériode. Le nombre d'œufs pondus par femelle est de plus relativement faible en comparaison à d'autres insectes (une dizaine par femelle chez le puceron *A. pisum* contre plusieurs centaines, voire milliers, pour le moustique ou la drosophile). Enfin, les œufs fécondés subissent une période de diapause de trois mois, ce qui allonge considérablement la durée des expériences envisagées.

Malgré ces contraintes, l'équipe de Gaël Le Trionnaire a réussi à mettre au point le système CRISPR-Cas9 chez *A. pisum*, sur le gène *stylin-01*. Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est présentée dans la section suivante. J'ai participé à la prise en charge des lignées dès leur arrivée dans notre laboratoire, à l'analyse des transcrits, ou encore à la recherche de leurs phénotypes.

Par ailleurs, étant donné certains résultats très encourageants obtenus au début de ma thèse (voir chapitre 4), nous avons décidé de générer d'autres mutants. J'ai cette fois-ci participé à la mutagenèse du gène *stylin-03* chez *A. pisum* (choix des ARN guide, design des amorces pour les génotypages, injection de centaines d'œufs, etc.), notamment lors d'un séjour à l'UMR IGEPP. Malheureusement, aucune des lignées que nous avons engendrées lors de cette expérience n'était mutée, à cause d'un dysfonctionnement de l'enzyme. Nous n'avons pas répété l'expérience dans le cadre de ma thèse par manque de temps.

3.2.1. Résumé de l'étude

L'objectif de cette étude était de générer des lignées mutées (ou *knock-out*, KO) du puceron *A. pisum*, c'est-à-dire des lignées pour lesquelles la protéine Stylin-01 est totalement absente.

Dans un premier temps, l'équipe de Gaël Le Trionnaire a mis en place un protocole pour générer des morphes sexués et a testé plusieurs croisements de clones différents afin d'évaluer la production des œufs et le taux d'éclosion. Trois jours après accouplement, les femelles ovipares commencent à pondre des œufs, qui doivent être injectés entre 0 et 4 h après la ponte c'est-à-dire au stade 8 à 16 noyaux, pour limiter au maximum le mosaïcisme au niveau des allèles. **Quatre ARN guides différents**, ciblant les trois exons du gène *stylin-01*, ont été injectés avec l'enzyme cas9 par micro-injection dans une zone bien précise (pôle antérieur de l'œuf pour ne pas blesser les bactériocytes). Plus de **2000 œufs** ont été injectés au total (**Fig. 17**). Ces œufs ont été transférés dans une chambre à 15°C pendant 3-4 jours jusqu'à leur **mélanisation** (processus normal du développement embryonnaire, indiquant que l'injection n'a pas été destructive). Ils ont ensuite été transférés à 4°C sur des plants de fève pendant 85 jours (temps de **diapause obligatoire**). Après la diapause, les plantes ont été déplacées à 18°C pour induire l'éclosion des femelles fondatrices (femelles vivipares). Au total, **31 femelles fondatrices** ont éclos, parmi lesquelles 17 ont produit des descendants (soit 17 **nouvelles lignées clonales**). L'ADN génomique *stylin-01* de chaque lignée a été amplifié par PCR, cloné puis séquencé pour détecter les mutations éventuelles sur les deux allèles parentaux. Six lignées (sur 17) se sont avérées au final mutées et ont été maintenues en élevage. En parallèle, nous avons conservé six lignées contrôles provenant des mêmes croisements, dont les œufs n'ont pas été injectés.

Plus de deux ans ont été nécessaires pour mettre au point ce protocole. Les étapes sont maintenant bien définies et la totalité du processus pour générer des lignées mutantes devrait prendre sept mois environ.

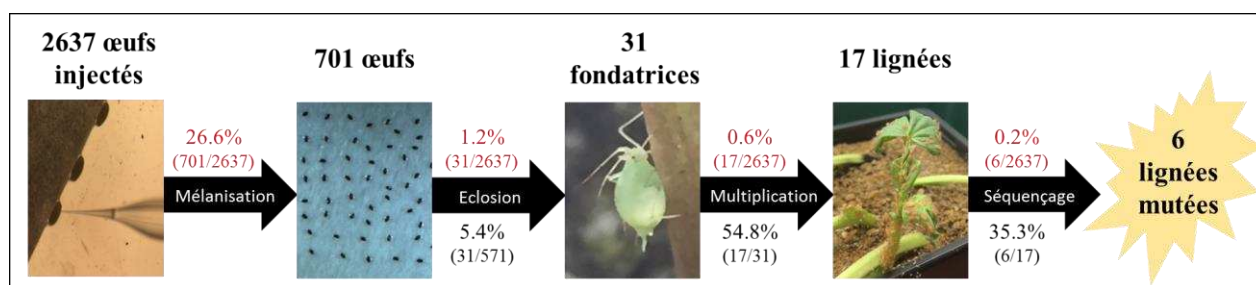


Figure 17. Obtention de lignées *A. pisum* mutées pour le gène *stylin-01*

Au total, 2637 œufs ont été injectés suite aux trois expériences successives, parmi lesquels 701 œufs ont mélanisé. Sur les 571 restants (40 œufs ont été utilisés pour calculer les taux de mutation), 31 femelles fondatrices ont éclos. 17 d'entre elles ont été capables de produire des descendants par parthénogénèse, engendrant ainsi une lignée. Suite aux analyses de séquençage, six lignées étaient mutées.

Les pourcentages de réussite à chaque étape par rapport au nombre d'œufs injectés au départ sont indiqués en rouge. Les pourcentages de réussite, cette fois par rapport à l'étape précédente, sont indiqués en noir.

3.2.2. Article 2 : An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid



An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid

G. Le Trionnaire^{a,*}, S. Tanguy^a, S. Hudaverdian^a, F. Gleonnec^a, G. Richard^a, B. Cayrol^b, B. Monsion^b, E. Pichon^b, M. Deshoux^b, C. Webster^b, M. Uzest^b, A. Herpin^c, D. Tagu^b

^a UMR 1349 IGEPP (INRA, University Rennes 1, Agrocampus Ouest), Rennes, France

^b UMR BGPI (University Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro), Montpellier, France

^c INRA LPGP, Rennes, France

ABSTRACT

CRISPR-Cas9 technology is a very efficient functional analysis tool and has been developed in several insects to edit their genome through injection of eggs with guide RNAs targeting coding sequences of genes of interest. However, its implementation in aphids is more challenging. Aphids are major pests of crops worldwide that alternate during their life cycle between clonality and sexual reproduction. The production of eggs after mating of sexual individuals is a single yearly event and is necessarily triggered by a photoperiod decrease. Fertilized eggs then experience an obligate 3-month diapause period before hatching as new clonal colonies. Taking into consideration these particularities, we developed in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* a step-by-step protocol of targeted mutagenesis based on the microinjection within fertilized eggs of CRISPR-Cas9 components designed for the editing of a cuticular protein gene (*stylin-01*). This protocol includes the following steps: i) the photoperiod-triggered induction of sexual morphs (2 months), ii) the mating and egg collection step (2 weeks), iii) egg microinjection and melanization, iv) the 3-month obligate diapause, v) the hatching of new lineages from injected eggs (2 weeks) and vi) the maintenance of stable lineages (2 weeks). Overall, this 7-month long procedure was applied to three different crosses in order to estimate the impact of the choice of the genetic combination on egg production dynamics by females as well as hatching rates after diapause. Mutation rates within eggs before diapause were estimated at 70–80%. The hatching rate of injected eggs following diapause ranged from 1 to 11% depending on the cross and finally a total of 17 stable lineages were obtained and maintained clonally. Out of these, 6 lineages were mutated at the defined sgRNAs target sites within *stylin-01* coding sequence, either at the two alleles (2 lineages) or at one allele (4 lineages). The final germline transmission rate of the mutations was thus around 35%. Our protocol of an efficient targeted mutagenesis opens the avenue for functional studies through genome editing in aphids.

1. Introduction

The CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 system has emerged in the last few years as a very powerful genome editing tool allowing the generation of precise and targeted mutational events within the DNA sequence of various metazoans. This technology is derived from a bacterial “adaptive” immune system dedicated to the recognition and the cleavage of invasive viral or plasmid DNA. The unique properties of this mechanism have been used to engineer the “CRISPR-Cas9” system for mediating targeted mutagenesis. This system relies on the use of a single-guide RNA (sgRNA) and a Cas9 nuclease (Doudna and Charpentier, 2014). In short, the sgRNA contains a sequence of 20 nucleotides (nt) corresponding to the genomic region to be targeted, and a universal sequence of 120 nucleotides. The folding capacity of the latter allows the formation of the sgRNA-Cas9 ribonucleoprotein complex. Once delivered to the cells of the organism of interest, the Cas9-sgRNA complex first scans the genome until the targeted sequence is recognized by the sgRNA specific 20-nt motif through RNA-DNA complementarity. This then promotes

the nuclease activity of the Cas9 protein at that site, which also depends on the presence on the genomic DNA of a 3-nt Protospacer Adjacent Motif (PAM) at the end of the 20-nt recognition site. After this recognition event, the endonucleolytic activity of the Cas9 generates a double-strand break (DSB) of the DNA that is then repaired by endogenous cellular systems such as the Non Homologous End Joining (NHEJ) or the Homology-Directed Repair (HDR) system. NHEJ is considered to be error-prone since the reparation sometimes generates mistakes such as insertions or deletions (InDels) of one to several nucleotides, thus causing genomic DNA mutations. These InDels can potentially generate frame shift mutations resulting in premature stop codons or altered proteins. CRISPR-Cas9 technology is commonly used in a wide range of organisms including animal and plant models. In insects, such a system has proved to be efficient in models such as *Drosophila melanogaster* (Bassett et al., 2013), *Aedes aegypti* (Kistler et al., 2015), *Bombyx mori* (Wang et al., 2013) or *Tribolium castaneum* (Gilles et al., 2015). Recently, it was also successfully implemented in a wide range of non-model insects ranging from Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hymenoptera and other arthropods (for

* Corresponding author.

E-mail address: gael.le-trionnaire@inra.fr (G. Le Trionnaire).

detailed reviews, see Sun et al., 2017, Cui et al., 2017 and Taning et al., 2017). The main delivery method for this technology in insects (and in most animal models) now relies on the microinjection of a ribonucleoprotein (RNP) complex - containing the sgRNAs and purified Cas9 protein - within single cells or early embryos.

Implementation in non-model insect organisms remains challenging, therefore we aimed to optimize the CRISPR-Cas9 technology in aphids, which are hemipteran phloem-sap feeding insects known as major pests of most crops worldwide. Their life cycle is quite singular since they develop by clonal reproduction (viviparous parthenogenesis) during spring and summer. When summer ends, aphids can perceive photoperiod shortening and integrate this signal towards their developing embryos that in turn switch to a sexual reproductive mode, resulting in the production of males and sexual oviparous females. Sexual individuals then mate and females lay fertilized eggs on plants during the autumnal period. Then these eggs must experience an obligate diapause of three months over winter, before they hatch in the next spring as new parthenogenetic colonies (Le Trionnaire et al., 2013). Aphids display other life history traits (host plant adaptation mechanisms, endosymbiosis, phenotypic plasticity) that allow them to efficiently cope with biotic and abiotic stresses or increase damages on crops (especially as vectors of plant viruses). Deciphering the molecular mechanisms controlling these traits and especially identifying master regulator genes could potentially provide new molecular targets for specific aphid control strategies. Understanding and validating the function of these genes is thus a necessary pre-requisite. So far the peculiarities of the aphid model have made the development of functional analysis tools particularly complex. RNA interference (RNAi) is used to transiently silence the expression of aphid transcripts (Jaubert-Possamai et al., 2007). However, silencing lasts only for a few days in most cases and its efficiency depends on the targeted tissue and rarely exceeds 50% (Mulot et al., 2016). EMS mutagenesis is another alternative to generate stable mutants (Tagu et al., 2014). The availability of an efficient genome editing tool in aphids would thus be a major breakthrough in the aim of understanding gene functions in such an important crop pest.

Taking into consideration all the constraints inherent to the model, a step-by-step protocol for targeted mutagenesis with the CRISPR-Cas9 system was optimized in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*), one of the model species used commonly in the aphid research community, and for which genomic resources are available (IAGC, 2010 and Legeai et al., 2010). In this study, the candidate gene for developing and validating the efficiency of the method was *stylin-01*, a gene coding for a cuticular protein from the CPR family, which is a prime candidate receptor of noncirculative plant viruses. This protein has recently been identified in the acrostyle, an organ in aphid maxillary stylets containing plant virus receptors across its surface (Webster et al., 2018). In the same study, the authors showed that the viral helper protein P2 of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and an antibody targeting the surface-exposed peptide of Stylin-01 compete *in vitro* for binding to the acrostyle. Moreover, reducing Stylin-01 expression in the aphid vector *Myzus persicae* impacted its ability to transmit the CaMV. However, transcript levels were only partially reduced, despite numerous attempts made by multiple methods. In addition, a direct P2-Stylin-01 interaction was not observed, due to intrinsic properties of the protein, preventing Stylin-01 from being definitely identified as the receptor of CaMV. A *stylin-01* mutant would undoubtedly help define the precise role of Stylin-01 in noncirculative virus transmission. Here, we will describe in detail the following steps of the protocol: i) male and sexual female synchronized photoperiod-triggered induction, ii) mating and fertilized eggs synchronization, iii) sgRNAs and Cas9 protein microinjection, iv) diapause experienced by melanized eggs, v) hatching and maintenance of new colonies, vi) the mutation detection protocol, and vii) the effective germline transmission of mutations within the offspring of hatching colonies. Each critical step in the protocol will then be discussed in the light of our experience. This study represents the first successful

genome editing protocol ever developed in aphids to create stable mutant lineages.

2. Material and methods

2.1. Single guide RNAs preparation

2.1.1. *In-silico* single guide RNAs design

The CRISPOR algorithm (<http://crispor.tefor.net/>, Concordet and Haeussler, 2018) was used to find targets for single guide RNA synthesis within the *stylin-01* coding sequence. Prior to this computational step, the genomic *stylin-01* DNA sequence from the *A. pisum* clones used in this study were checked to identify putative polymorphic sites. CRISPOR software specifically searches for target sequences of a N^{16–20}-NGG format, N^{16–20} corresponding to a succession of 16–20 nucleotides (N = A, T, G or C) and NGG to the PAM motif necessary for *Streptococcus pyogenes* Cas9 activity. This algorithm can also search within *A. pisum* genome for putative off-target sites (within exonic, intronic or intergenic regions) sharing respectively 0, 1, 2, 3 or 4 mismatches with the initial target sequence. A specificity score is then calculated for all target sequences and a measurement of their uniqueness within the genome is provided. Target sequences (up to 4, if possible) with the maximum specificity score (100 being the highest) and the lowest number of off-target sites were then selected. In our case, the selected sequences also need to begin with GG, since these two nucleotides are necessary for *in vitro* transcription using T7 polymerase (see below). Considering this additional constraint, target sites selection within *stylin-01* coding sequence were restricted to GG-N^(14–18)-NGG motifs.

2.1.2. *In vitro* single guide RNA synthesis

For single guide RNA synthesis (Fig. S1), the DR274 plasmid (Plasmid 42250, Addgene) was used as a template. To linearize the plasmid, a digestion with *BsaI* restriction enzyme (New England Biolabs) was performed at 37 °C for 24 h in a total volume of 100 µL, using 80 U of enzyme and 8 µg of plasmid. The digestion quality was checked by electrophoresis on a 1.5% agarose gel containing SYBR safe (Life Technologies) and quantified with a Quantus Fluorometer (Promega). The linearized plasmid was then used for single guide RNA template preparation with specific primers. The Forward primer of 65 nt consists in a T7 promoter sequence at the 5'-end (20 nt) followed with the target site sequence defined by CRISPOR software (16–20 nt) and the beginning of the universal sequence of the guide RNA at the 3'-end (25 nt). The Reverse primer corresponds to a 23 nt sequence covering the end of the universal guide RNA sequence (see primers Table S1). PCR was subsequently performed using *Taq* polymerase (Promega) with the following conditions: one initial denaturation step of 95 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation step at 94 °C for 30 s, one annealing step at 58 °C for 30 s and one elongation step at 72 °C for 20 s, and one final elongation step of 72 °C for 5 min. The primers used for the four RNA guides of *stylin-01* gene are listed in Table S1. PCR products were then purified using the GenElute PCR Clean Up kit (Sigma Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were quality checked on an agarose gel, quantified with Quantus Fluorometer (Promega) and concentrated by vacuum drying, before being used as a template for *in vitro* transcription of single guide RNA. 4 µg of purified PCR product were *in vitro* transcribed with the MAXIScript T7 transcription kit (Ambion) following manufacturer's instructions with an additional DNase digestion step. Single guide RNAs were purified once with acid phenol-chloroform (1:1) and once with chloroform (1:1), before isopropanol precipitation (1:1) at –20 °C. The RNA pellet was then dried using a vacuum desiccator (or dryer) and resuspended in 15 µL of RNase-free water. RNA quality was checked by electrophoresis under RNase-free conditions and the concentration was estimated with a Quantus fluorometer (Promega).

2.1.3. *In vitro* single guide RNA cleavage efficiency validation

The genomic DNA sequence of *stylin-01* was initially amplified by PCR using specific primers (Table S1) and *Taq* polymerase (Promega) starting with 2 μ L of genomic DNA in a 50 μ L reaction mix with the following steps: 95 °C for 5 min followed by 45 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 20 s and a final step at 72 °C for 5 min. The amplification product was checked by electrophoresis on an agarose gel and used as template for an *in vitro* cleavage assay. Briefly, 100 ng of PCR target fragments were mixed with 300 ng of Cas9 protein (CP01, PNA Bio Inc) and 250 ng of each sgRNA individually in NEB buffer 3 containing BSA. The mix was incubated at 37 °C for 1 h. The Cas9 protein was then inactivated at 65 °C for 10 min. A negative control without sgRNA was also performed. The cleavage reaction efficiency was analyzed by electrophoresis on an agarose gel.

2.1.4. Injection mix preparation

A total volume of 40 μ L of injection mix was prepared with 1600 ng of each sgRNA corresponding to a final concentration of 40 ng/ μ L for each sgRNA, 13.3 μ g of recombinant Cas9 protein (CP01, PNA Bio Inc) at a final concentration of 333 ng/ μ L in RNase free water, with aliquots of 4 μ L stored at –80 °C until microinjection of fertilized eggs.

2.2. Egg production and microinjection

2.2.1. Sexual morphs production

The ultimate purpose of this part of the protocol is to generate a sufficient number of fertilized eggs for the microinjection steps (see below). To this end, males and females have to be perfectly synchronized in order to optimize their mating once they reach adulthood. The five clones used in this study were initially sampled in eastern France on *Medicago sativa* for L9Ms10, L9Ms13 and L9Ms14, *Trifolium pratense* for L7Tp23 (Nouhaud et al., 2014) and *Genista tinctoria* for Gt2.01 (Peccoud et al., 2015). These clones are maintained in a controlled environment as clonal colonies on *Vicia fabae* plants. A Long Day (LD) photoperiodic regime (16 h of light and 8 h of darkness at 18 °C) allows multiplication by viviparous parthenogenesis. In order to induce the production of sexual morphs, a Short Day (SD) photoperiodic regime (12 h of light and 12 h of darkness at 18 °C) was applied to the different clones used in this study. Two distinct induction protocols were used: i) a so-called “partial induction protocol” (aphids are moved to SD conditions for a limited number of days and then moved back to LD) that allows production of males, and ii) a so-called “complete induction protocol” (aphids are moved to constant SD conditions) that allows production of sexual oviparous females. The partial induction starts exactly one week before the complete induction, allowing males and sexual females to reach adulthood simultaneously and ensures that they are both mature for mating. Females start to lay fertilized eggs a few days after mating (Fig. 1). The following cross combinations were produced: L9Ms10 (Female) x L7Tp23 (Male), L9Ms14 (F) x L9Ms10 (M) and Gt2.01 (F) x L9Ms13 (M).

2.2.1.1. Partial induction for male production. This protocol was applied to L7Tp23, L9Ms10 and L9Ms13 clones (Fig. 1). Initially reared under LD conditions, 20 synchronized third stage larvae (L3) aphids (Generation 1 or G1) of each clone were moved to SD conditions on *V. fabae* plants (2 aphids/plant) for exactly 9 days. In these conditions, adulthood was reached within 5 days and mature adults started to produce offspring 8 days later. For each adult individual, 2–3 L1 (Generation 2 or G2) were kept in order to obtain 40 L1 larvae of the same age. These sexuparae - which are the male-producers - were isolated on plants (1 aphid/plant). After 9 days under SD conditions these G2 individuals were moved back to LD conditions in which they reached adulthood 10 days later. Production of offspring started after 3 days. Each adult was kept on the plant until it produced around 20 individuals (Generation 3 or G3, batch 1) before being moved to another plant to produce around 20 individuals (G3, batch 2). Because

of the specificities of this partial induction protocol, batch 1 contained only parthenogenetic females, while batch 2 was mainly composed of males. These newborn G3 males needed another 10 days to reach adulthood. In total, 800 males (40*20) were produced and were ready for the mating step (see below).

2.2.1.2. Complete induction for sexual females production. This protocol was applied to the second clone of the cross and started exactly 7 days after the partial induction of males (Fig. 1). Initially reared under LD conditions, 20 synchronized L3 aphids (Generation 1 or G1) from the L9Ms10, L9Ms14 or Gt2.01 clone were moved to SD conditions on *V. fabae* plants (2 aphids/plant). Since this induction is complete, aphids are never moved back to LD conditions. For each individual, around 4–5 L1 were kept (Generation 2 or G2) to obtain 70 L1 larvae of the same age. These sexuparae individuals are the female-producers. They were isolated (1 aphid/plant) until they reach adulthood after 10 days and started the production of offspring 3 days later. Each adult was kept on the plant until it produced around 20 individuals (Generation 3 or G3, Batch 1) and adults were discarded afterwards. Because of the specificities of this complete induction protocol all individuals were sexual females. These new born individuals needed another 10 days to reach adulthood. In total, 1400 females (70*20) were produced and ready for the mating step (see below).

2.2.2. Cross preparation, mating and egg collection

Thirty adult females and 15 adult males were placed on individual plants for mating, and an average of 6 plants were used each day. The mixing of sexual individuals started on the Wednesday before the week of injection (Fig. 2a). Usually four batches were set up: one on the Wednesday, one on the Thursday, one on the Friday and one on the Saturday. Once put on plants, the first eggs laid by sexual females were observable three days later and the peak of eggs production occurred after 5 days. As a consequence, the 4 successive batches of crosses corresponded to four rounds of injection the next week (from Monday to Thursday). On each day during the week of injections, aphids were placed on a new plant at precisely 9.00 a.m. to allow sexual females to lay eggs for exactly 4 h. Sexual females usually laid their eggs on the plant, on the plastic bag or on the plastic pot (Fig. 2b, c and 2d). Eggs were collected with a fine paintbrush under a magnifying glass and placed on a microscope slide with wet filter paper (Fig. 2e). With this protocol, eggs were collected within a 4 h window so that they were 2 h old on average. After egg collection, aphids were placed back on the plants before being manipulated exactly the same way on the following day.

2.2.3. Microinjection

Twenty eggs were aligned and orientated on a wet filter paper deposited on a microscope slide (Fig. 2f). The filter paper was cut diagonally and the “straight” or ventral side of the egg (opposite from the “curved” or dorsal side) was orientated to be in contact with the paper. The anterior pole of the egg was also distinguishable from the posterior pole under visible light using a dissecting microscope, as the anterior pole appears clearer and the posterior pole contains the bacteriocyte dark-green structure. Once aligned, eggs were injected using the FemtoJet Microinjector device (Eppendorf), and Eppendorf™ Femtotips™ Microinjection Capillary Tips (inside diameter of 0.5 μ m and outside diameter of 0.7 μ m). Capillaries were filled with the injection mix containing the Cas9 protein and the guide RNAs (see above) using dedicated Eppendorf Microloaders™ (Eppendorf). Eggs were injected at the anterior pole by a single pressure on the foot pedal for 0.3 s. An injection pressure of 500 hPa was applied and a compensation pressure of 50 hPa was set up to avoid liquid or cytoplasm reflux. A micro-manipulator was used to quickly shift the capillary from one egg to another. After injection, eggs were kept on the microscope slide used for injection, then directly transferred to a Petri dish containing wet filter paper - to prevent eggs from desiccation - and placed in a climatic

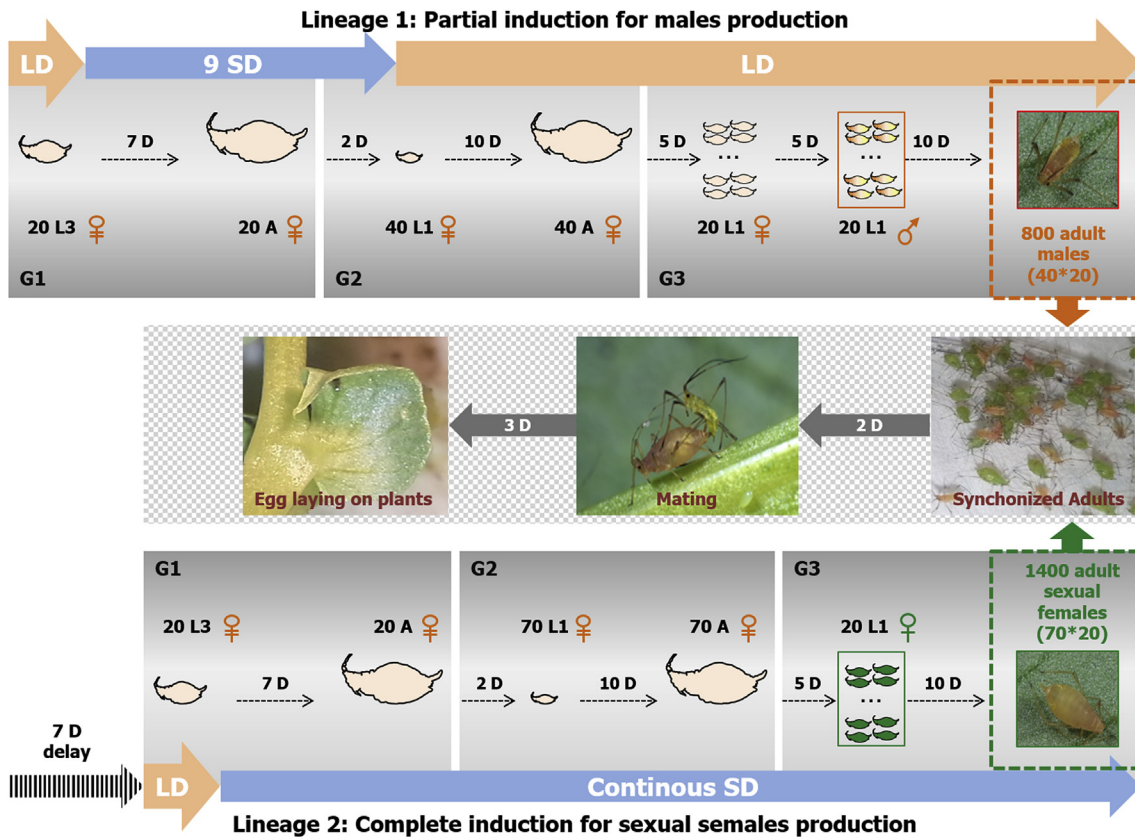


Fig. 1. – Sexual morph induction protocol. Lineage 1 undergoes a partial induction protocol where 20 L3 parthenogenetic aphids, initially maintained under long days photoperiod conditions (LD: 16 h of light, 8 h of night), are moved to short days (SD: 12 h of light, 12 h of night) for exactly 9 days before being moved back to LD conditions. Once the adults reproduce, the first 2 L1 offspring per adult are kept until they reach adulthood. Each of these 40 so-called “sexuparae” then produces a first batch of approximately 20 parthenogenetic females which are discarded, followed by a second batch of around 20 males that are kept for a total of 800 males. Seven days after lineage 1 induction has started, lineage 2 undergoes a complete induction protocol where 20 L3 parthenogenetic aphids under LD are moved to constant SD. These are kept until they are adults, and the first 3–4 L1 produced by each adult are then kept until they reach adulthood. Each of these 70 adult sexuparae produces a first batch of 20 sexual females that are kept for a total of 1400 females. These two delayed protocols allow a synchronized production of males and sexual females that all become adults at the same time, after which they are placed together (15 males for 30 females per plant) for mating. Around 5 days later, the first eggs are laid by females and the microinjection procedure can start. Abbreviations: LX: larval stage X, A: adult, GX: Generation X, D: Day.

chamber at 15 °C (Fig. 2g).

2.2.4. Egg melanization, diapause and hatching

Melanization occurs at the beginning of embryos development where they slowly acquire a black serosal cuticle necessary for cold resistance. Thus complete melanization indicates a non-disruptive injection. Eggs that did not reach this stage were considered damaged by the injection procedure and discarded (Fig. 3a). Melanization of injected eggs was complete within 3–4 days at 15 °C. Melanized eggs were then collected from the microscope slide (Fig. 3b). At this time, eggs were either directly transferred to plants, or treated before transferring them to prevent them from developing fungal or bacterial contamination during the obligate diapause period. This treatment consisted of an initial 5 min wash step in 5% bleach solution followed by three 5 min washes in ultrapure water. Eggs were then dried out on filter paper and carefully deposited with a fine paintbrush on the upper surface of *V. fabae* leaves (Fig. 3c and d). Plants were then kept in a climatic chamber at 4 °C (LD conditions) for exactly 85 days, a period corresponding to the duration of the obligate diapause they experience before hatching. After this period, plants were moved back at 18 °C (LD conditions) to allow diapause to be broken. During two weeks, plants were carefully observed every day under a magnifying glass and hatching aphids were collected. These individuals are the so-called “foundress” and correspond to viviparous parthenogenetic females (Fig. 3e). Each “foundress” was then individualized on a new single plant until they produced offspring by parthenogenesis. These new clonal lineages were

then maintained by isolating two individuals (L2 or L3) every generation to a new plant.

2.3. Mutations detection

2.3.1. Mutations detection in injected eggs

Once injections were completed, sub-samples of 20–40 melanized eggs were collected and frozen at –80 °C prior to DNA extraction, which was carried out using the ‘salting out’ protocol previously described by Sunnucks et al. (1996). DNA from a single egg was extracted and resuspended in 20 µL of ultra-pure sterilized water. The *stylin-01* genomic region (containing the target sites of the four sgRNAs) was PCR amplified starting with genomic DNA (see above). The sizes of the amplicons were compared to the size of the wild-type genomic fragment by electrophoresis on a 1.5% agarose gel to evaluate the presence of insertions or deletions.

2.3.2. Mutations detection in hatched colonies

Once hatched, “foundress” individuals were isolated on a new plant until they produced offspring. As clones, newborns are all genetically identical. For each newly established lineage, a pool of 5 individuals at the 4th instar stage (L4) was frozen in liquid nitrogen. Genomic DNA was extracted using PureLink™ Genomic Plant DNA Purification kit (K183001, ThermoFisher Scientific). A PCR fragment of 1388 bp flanking the targeted region was amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (F530S, ThermoFisher Scientific) with primers BC57F

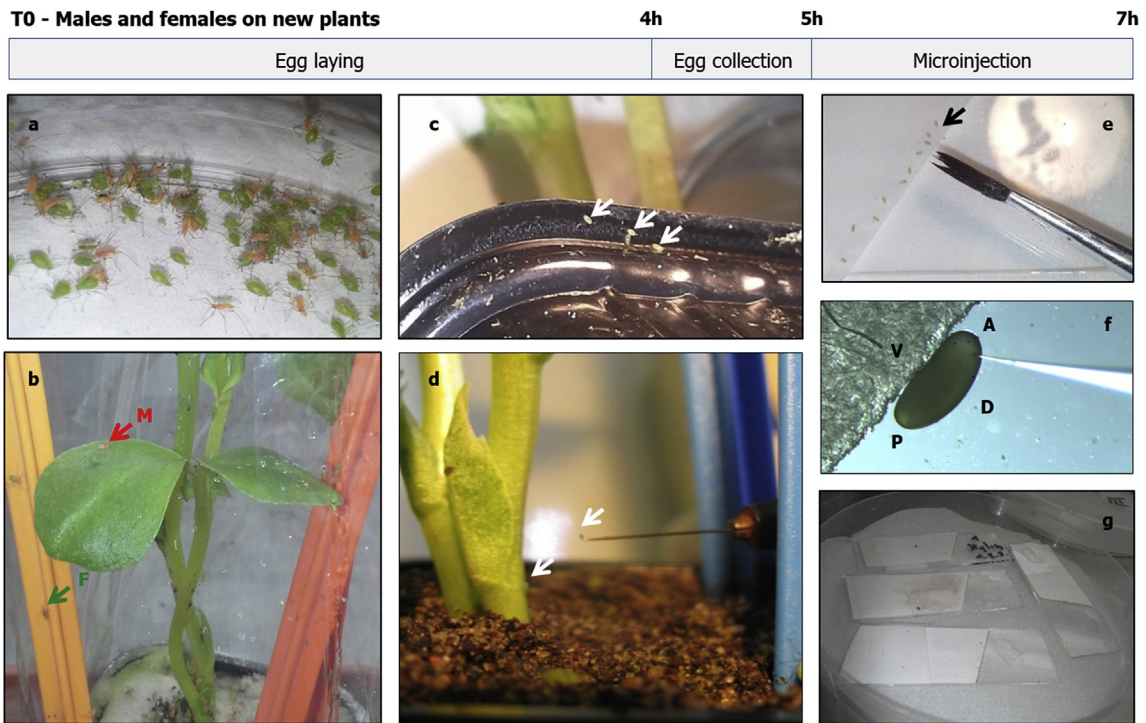


Fig. 2. – Egg collection and injection procedure. On each day, during the week of injections, males and sexual females - initially put together for mating a few days before - are placed on a new plant at exactly 9.00 a.m. (a and b). On each plant, 30 sexual females and 15 males are placed together during 4 h so that females can lay eggs on the plant, the plastic bag, the pot or the tutor (c and d). Precisely 4 h later, eggs are collected with a fine paintbrush and aligned (e) on wet filter paper deposited a microscope slide (20 per slide). The ventral face (V) of the egg is placed in contact with the paper and the injection is performed on the dorsal face (D) at the anterior pole (A), which is opposite of the posterior pole (P) defined as the pole where the bacteriocyte is observable (f). Once injection is completed slides are placed into petri dishes containing wet filter paper in climatic chambers at 15 °C (g).

5'-AGACGCATCCACAATCACAA-3' and BC57R 5'-CGGATGATCATTTGAGGAG-3'. PCR cycling conditions included a denaturation step at 98 °C for 30 s, 35 cycles of 98 °C for 10 s, 64 °C for 30 s, 72 °C for 45 s followed by a final extension at 72 °C for 5 min. To analyze the genomic DNA sequence from the 2 alleles of the *stylin-01* gene, blunt-ended PCR products were cloned in pGGz plasmid (derived from pDonR-Zeo) and transformed in *E. coli* DH5 strain. Four to 20 colonies were selected by colony PCR (Sandhu et al., 1989) using GoTaq G2 polymerase (M7841,

Promega, Corporation, Madison, WI, USA) with primers 13F 5'-AACA GGGGCTGGTCAAATG-3' and 14R 5'-GGCCATATCGGTGGTCATC-3'. PCR amplifications included a denaturation step at 95 °C for 2 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 100 s followed by a final extension at 72 °C for 5 min. Selected colonies were cultivated overnight, their plasmid DNA extracted using the Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System (A1460, Promega, Corporation, Madison, WI, USA) and sequenced using the same primers (GENEWIZ, South

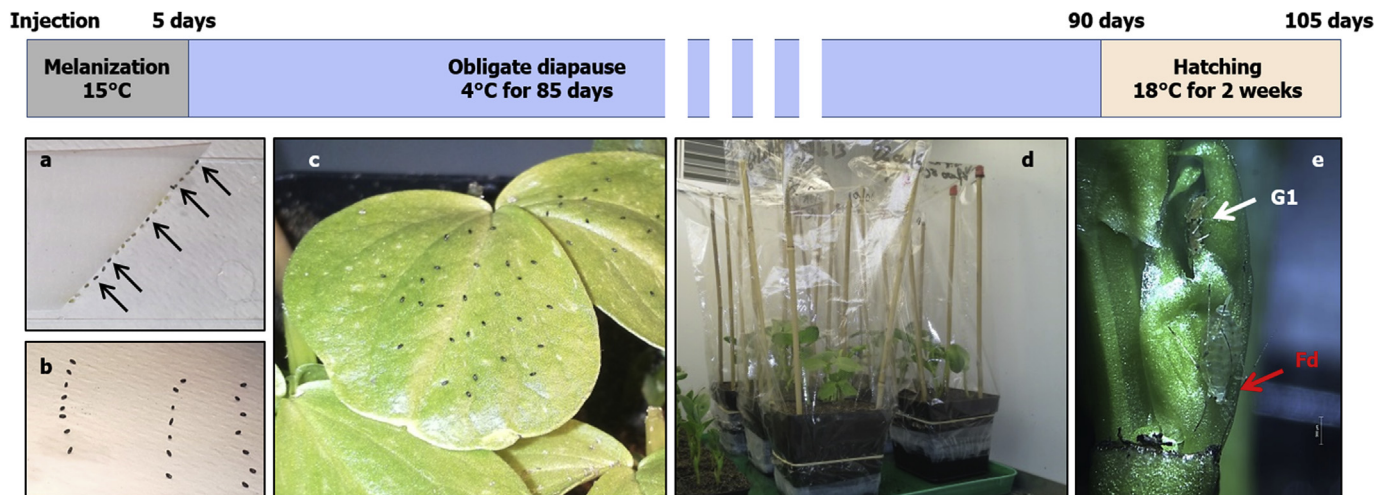


Fig. 3. – Diapause and hatching steps. Eggs that were not damaged by the injection usually melanized within 5 days (a). Melanized eggs are then collected directly from the microscope slide and placed on the upper surface of the leaves of a new plant (b and c). Plants are then covered with a plastic bag and placed in a climatic room for 85 days at 4 °C for the obligate diapause period (d). Once diapause is completed plants are moved back to 18 °C to allow egg hatching. The individual that hatches is called the “Foundress” (Fd) and each of those is placed individually on a new plant until it becomes an adult and start producing an offspring (G1) by parthenogenesis (e).

Table 1
Comparison of the egg production level and hatching rate of 3 different crosses.

Female	Male	Egg production	Egg treatment	Hatching rate
L9Ms10	L7Tp23	High (at least 10 eggs/ female)	Control	36%
L9Ms10	L7Tp23		H2O + Bleach	9%
L9Ms14	L9Ms10	Low (less than 5 eggs/ female)	Control	35%
L9Ms14	L9Ms10		H2O + Bleach	28%
Gt2.01	L9Ms13	High (at least 10 eggs/ female)	Control	77%
Gt2.01	L9Ms13		H2O + Bleach	33%

Plainfield, NJ, USA). Sequence alignment steps were performed using the Geneious software (<http://www.geneious.com>).

3. Results

3.1. Evaluation of egg production dynamics and hatching rate in three genetic backgrounds

Before applying CRISPR-Cas9 mutagenesis to the pea aphid, it was necessary to select lineages that are able to respond to the photoperiod shortening signal to produce sexual individuals. Three combinations of crosses were tested in this study: L9Ms10 (Female) x L7Tp23 (Male), L9Ms14 (F) x L9Ms10 (M) and L9Ms13 (F) x Gt2.01 (M). Two key parameters were considered for these crosses: i) the number of fertilized eggs laid by sexual females after mating and ii) egg hatching success after the 85 days of obligate diapause. Females usually start to lay eggs 3 days after mating (d.a.m) for a total period of 6 days with an optimum for eggs production at 6 d.a.m. Although the number of eggs laid by single females was not precisely recorded (Table 1), the females from crosses L9Ms10xL7Tp23 and L9Ms13xGt2.01 produced higher numbers of fertilized eggs compared to the females from the L9Ms14xL9Ms10 cross (at least 10 per female for the two first crosses, and less than 5 per female for the third one). Thirty six and 35% of the untreated eggs hatched and produced “foundress” lineages for L9Ms10xL7Tp23 and L9Ms14xL9Ms10 crosses, respectively, whereas 77% of eggs hatched in the case of Gt2.01xL9Ms13 cross (Table 1). Hatching rates were reduced for bleach-treated eggs, ranging from 9% (L9Ms10xL7Tp23), 28% (L9Ms14xL9Ms10) to 33% (Gt2.01xL9Ms13), suggesting that this treatment affects embryos viability and should be removed from the protocol (Table 1). Taken together, our results show that the Gt2.01xL9Ms13 cross is the most efficient for producing sufficient numbers of eggs for the microinjection step and post-diapause lineage selection.

3.2. Assessment of single guide RNAs *in vitro* cleavage efficiency

CRISPOR algorithm found four target sites for single guide RNAs synthesis fulfilling the GG-N^{14–18}-NGG motif constraint within the *stylin-01* coding sequence. The four selected sequences do not share perfect identity with other homologous regions within the pea aphid genome: the single guide RNAs synthesized to target these regions (namely sg1, sg2, sg3 and sg4) were therefore unlikely to generate off-target cleavages. Briefly, *stylin-01* genomic DNA is composed of three exons. Sg1 target site is located within the second exon and the three others are distributed within the last exon (Fig. 4). These four sgRNAs were tested for their ability to cleave the *stylin-01* genomic DNA sequence *in vitro* (Fig. 5). Electrophoresis profiles showed two bands corresponding to the expected cleavage fragments when sg1 and sg3 were present in the reaction, suggesting a high *in vitro* binding efficiency for these guides. Expected cleavage fragments were also observed for sg2 and sg4. However, a band corresponding to uncleaved PCR fragment remained, suggesting an effective but reduced efficiency of these guides *in vitro*. Altogether, this experiment ensured that all the

designed sgRNAs were functional *in vitro*.

3.3. Effect of the microinjection on egg survival

In this study, three independent series of microinjections were performed on eggs originating from three different crosses. For each experiment, eggs were injected with two different mixtures: the first one comprising the 4 guide RNAs (sg1, sg2, sg3 and sg4) and the Cas9 protein; and the second one comprising only one guide RNA, sg4, and the Cas9 protein. Overall, 1698 eggs were injected in 5 days for the first cross (L9Ms10xL7Tp23), 412 eggs in 4 days for the second cross (L9Ms14xL9Ms10) and 527 eggs in 2 days for the third cross (Gt2.01xL9Ms13) (Table 2). The impact of microinjection on egg survival was estimated with the proportion of melanized eggs reported to the total number of injected eggs, considering melanization as a proxy measurement of survival. Egg survival rate was around 20%, 31% and 44.4% for the first, second, and third cross, respectively. These differences in egg survival might either reflect different embryo fitness for the three crosses, or an experimenter effect due to manual microinjection. The survival rate of microinjected eggs could thus exceed 45% under optimal conditions.

3.4. Estimation of the *in ovo* mutation rate

To rapidly estimate CRISPR-Cas9 efficiency after microinjection, up to 40 melanized eggs injected with the 4 sgRNAs/Cas9 mixture were collected within the pool of eggs kept for diapause. For L9Ms10xL7Tp23 cross, the PCR amplification was efficient for 36 eggs out of the 40 selected (Fig. 6). A single band corresponding to the wild type amplicon was observed for 8 eggs. Although this result may reflect the rate of “non-mutated” eggs, we cannot totally exclude the presence of small insertion/deletion events at the four target sites that cannot be detected with the PCR protocol used. For the 28 remaining eggs, the electrophoresis profiles revealed 1, 2 or even 3 bands with a size lower than the one expected for the wild type PCR fragment, either found alone or together with the wild type amplicon. These short PCR fragments probably arose from the combined action of at least 2 guide RNAs triggering large deletions in *stylin-01* genomic DNA sequence. In addition, small amplicons of various sizes were observed in the eggs, indicating that large re-arrangements occurred between different combinations of guide RNAs. These 28 eggs were thus assigned as “mutated”, bringing the mutation rate in the first experiment to at least 77.8%. Eighteen eggs were examined as part of the third experiment (Gt2.01xL9Ms13 cross), out of which 12 gave a PCR result. Four samples were assigned as “non-mutated” and 8 samples as “mutated”, indicating a mutation rate of at least 66.7%. These *in ovo* analyzes confirmed the efficiency of the CRISPR-Cas9 system in mutating aphid eggs at early stages post microinjection. They also showed that the injection of several guide RNAs could generate various combinations of large deletions within the genomic sequence of *stylin-01* without knowing - at this stage - if the observed mutations arose from somatic or germline cells.

3.5. Hatching and stable lineages establishment rate from injected eggs

After the obligate diapause period, embryos have completed their development and hatch as the so-called “foundress” individuals that initiate new clonal colonies. For the three cross combinations tested in this study hatching rates of injected eggs were very low (Table 2) and varied from 1.1% for L9Ms10xL7Tp23 cross (3 hatched eggs/274 eggs injected with sg 4 or with the four sgRNAs), to 4.9% for L9Ms14xL9Ms10 cross (5/101), and 11.7% for Gt2.01xL9Ms13 cross (23/196). These hatching rates were much lower than the ones observed for non-injected eggs in the three genetic backgrounds (36, 35 and 77% respectively, see Table 1). This suggests a potential damage occurring during the injection procedure or a toxic effect of the

>stylin-01 (ACYP1009006)

ATGCAGgtaagagtctctcgaagtttcgagaatggattgttattcggtatataccggcgaggtaaccgtgctcacagtttcacgctttgacagGTCACCTTTTGCCGTATCGTCGTTGCT GTTAGCTGTCTGTCGCCGTACGGCGTACCCCGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCGCCATCTTGGTCCAAGATTTCAGCACCCCAACGCCGATGGATCATTCAAGAACAAGgtatgcaca attattttcttaaaaaactttgaggtgaatttttaagctcgctagctctcatgacggtttatgtacctacgcatttatcgatctcatcaagtatagcctcatccccgcagctgaataatgt tgaacgaaatctttgacacacttctctcggctcggtcgagcattatacttgttgcctgtagttatacgttataactaaacggtttcgggtgctaataatagacgatttttcgctccagta tctatattattattattcattattttgaaaacgaatgctgagcagcaataactacgacaatagttgcaatgttttttttttactattttacgaaattattgtttctagtaaaatatt gtaattataaacacgtaacatttcaagttaaaaactgaaaacctcaatttaaccgggtggcgttgggtgataaaatatacactgaattacgctcagctagaccgcatgttgagcgggt ctacttataggttgaagaattcatcacttagtttaaatatttagagtcattagccaacatggaccatctcaatagacggtttttcggttttagcttctattttactataaattatagtt taataattaaaaaaagctcactcctatcggttattcctaaccacattatatttctggtgagTTTCCAACCGAAAACGGAATCAAAACAAGATCAGTCGGATACTTGAAGGCTGG CCCAGAAGGACCCGTAGCTGTGTTCAGGGAGCTTCTGCGTACGTCGCCCCAGACGGCCAGACCATCCAATCGGATACATCGCCGACGAGAACGGTTACCAGCCGTACGGCGCTCATT GCCACTCCACCACCAATCCAGCTGAGATCCAAGAGTCGTCAGATACCTCGCCTCTCTGCCAGCACCCCGAACCAAAATACCAGTAA

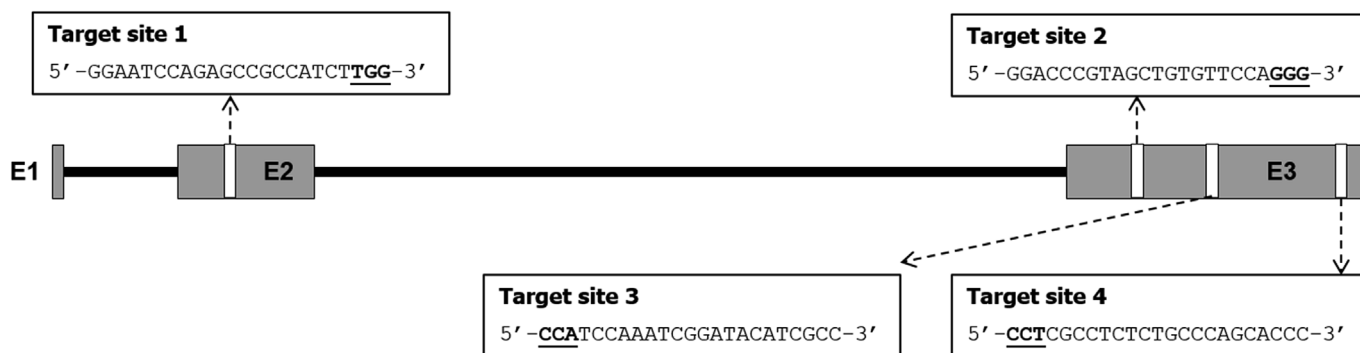


Fig. 4. – *Stylin-01* gene model and guide RNAs target sites. *Stylin-01* gene comprises 3 exons (E1, E2 and E3) and 2 introns for a genomic DNA length of 1.35 kb. CRISPOR software was used to identify putative target sites (in grey) comprising NGG motifs (underlined) at the 3' end to allow potential DNA cleavage by sgRNA-Cas9 complex. One target site was predicted in exon 2, and 3 target sites in exon 3.

sgRNAs/Cas9 mix impacting embryos survival and hatching. These results also mirror the differences in hatching rates for eggs from the three genetic backgrounds (Table 1), the Gt2.01xL9Ms13 cross showing the highest rate compared with the two other crosses. Altogether, 31 “foundress” individuals out of the 571 injected and melanized eggs were obtained in the three experiments. These 31 “foundress” were installed individually on plants to allow their complete developmental to adulthood. Seventeen “foundress” aphids gave offspring, producing by parthenogenesis genetically identical individuals, leading to the establishment of stable lineages subsequently maintained as clonal colonies. Finally, 55% of the hatched “foundresses” ended up as stable lineages (Table 2). A potential effect of mosaicism in the “foundress” might in part explain why 14 individuals could not produce offspring. The final rate of stable lineages setting is therefore closed to 3% (17/571) in the three combined genetic backgrounds.

3.6. Germline transmission rate estimation in stable lineages

All the individuals within the progeny of “foundress” aphids are genetically identical since they arise from diploid oocytes produced clonally. They can potentially originate from one or several germline nuclei within the syncytial early embryo. If only one germline nucleus

has been targeted by the CRISPR-Cas9 system within the early-fertilized egg then all the progeny will share the same mutations (one or two different mutated alleles). If there are several germline nuclei at the time of injection, it is possible to detect within the progeny individuals displaying different mutation patterns (more than two mutated alleles). To detect mutated lineages, DNA was extracted from pooled individuals for the 17 stable lineages to amplify the *stylin-01* genomic DNA sequence. PCR fragments were then cloned in a plasmid and sequenced to discriminate between the two parental alleles. A total of 4 lineages (L2, L4, L7 and L15) originating from eggs injected with the four guide RNAs (sg1, sg2, sg3 and sg4) and 2 lineages (L14 and L16) originating from eggs injected with a single guide RNA (sg4) were mutated in the *stylin-01* gene (Table 2). In more details (Fig. 7), L2 lineage displayed multiple re-arrangements in the two mutated alleles and at the four sites targeted by sgRNAs: allele 1 showed a 10 nt deletion at target site 1, a 3 nt deletion at target site 2, a 3 nt insertion at target site 3 and a 13 nt insertion/6 nt deletion at target site 4, while allele 2 showed a large 380 nt deletion at target site 1, a 10 nt insertion/2 nt deletion at target site 2, a 2 nt insertion at target site 3, and a 7 nt deletion at target site 4. In L4, L7 and L15 lineages, insertions or deletions of a few nucleotides were observed at the different target sites for 1 of the 2 alleles. Unexpectedly for these three lineages, only one parental allele was

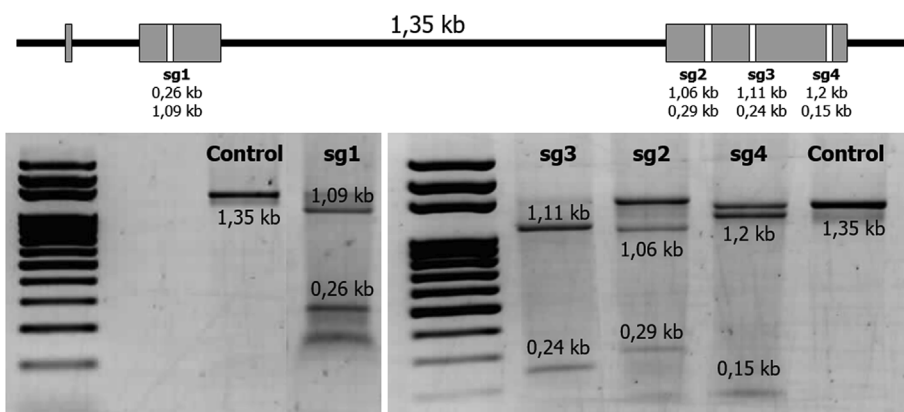


Fig. 5. sgRNAs *in vitro* cleavage assay. In order to test the ability of the 4 synthesized sgRNAs to efficiently cleave their predicted target sequence *in vitro* a PCR product from *stylin-01* genomic DNA (1.35 kb) was mixed with each sgRNA individually and Cas9 protein in its buffer. If the sgRNA actually targets its predicted sequence and slices the DNA fragment, two cleavage fragments will be observed on the agarose gel. The size of expected cleaved fragments are indicated on top of the gel for each sgRNA. The size of the bands that can be observed at the end of the reaction either for the control or for the 4 tested sgRNA are indicated on each lane of the gel.

Table 2
CRISPR-Cas9 mutagenesis of *stylin 1* gene in three different genetic backgrounds.

Cross	sgRNAs combination	Foundress generation			Foundress offspring	
		Injected eggs	Melanized eggs (%)	Hatched eggs (%)	Stable lineages (%)	Mutated lineages (%)
L9Ms10 (F) x L7Tp23 (M)	sg1-sg2-sg3-sg4 sg4	1059	199/1059 (18.8)	3/159 (1.9)	1/3 (33.3)	0/1 (0)
		639	140/639 (21.9)	0/115 (0)	0 (0)	0 (0)
L9Ms14 (F) x L9Ms10 (M)	sg1-sg2-sg3-sg4 sg4	257	89/257 (34.6)	4/74 (5.4)	1/4 (25)	1/1 (100)
		155	39/155 (25.2)	1/27 (3.7)	1/1 (100)	1/1 (100)
Gt2.01 (F) x L9Ms13 (M)	sg1-sg2-sg3-sg4 sg4	286	119/286 (41.6)	17/101 (16.8)	9/17 (52.9)	3/9 (33.3%)
		241	115/241 (47.7)	6/95 (6.3)	5/6 (83.3)	1/5 (25)

detected by cloning, none of the 20 sequences analyzed for each lineage allowed the detection of the second parental allele. For lineages originating from eggs injected with a single guide RNA sg4, L14 lineage showed re-arrangements on both alleles at the target site: a 3 nt insertion/2 nt deletion on allele 1 and a 6 nt deletion on allele 2. L16 lineage displayed a 7 nt deletion at target site 4 on allele 1, the other parental allele could not be detected in the set of sequenced clones. Since lineages were maintained clonally, the same protocol was applied several generations later to sequence the 6 lineages and perfectly identical mutational patterns as those previously described were observed (data not shown). Since 6 out of the 17 established lineages were stably mutated, the germline transmission rate of the mutations was close to 35% (Table 2). These results thus demonstrate that the CRISPR-Cas9 protocol described here is fully functional in the pea aphid and efficient to generate stable mutant lineages on the two targeted alleles of *stylin-01* gene.

4. Discussion

4.1. Difficulties encountered in the aphid model to develop CRISPR-Cas9 mutagenesis

Alternation of reproductive mode as well as the obligate diapause fertilized eggs must experience are two specificities of the aphid life cycle that have caused difficulties in developing CRISPR-Cas9 mutagenesis in aphids. Direct injection within viviparous parthenogenetic females could be an alternative to egg injection. However, in a recent study, Jamison et al. (2018) tried to deliver sgRNA-Cas9 RNP complexes designed to target the *tor* gene - a cuticle pigmentation gene - in viviparous aphid ovaries by electroporation. The analysis did not indicate any mutation (neither in the soma nor in the germline) of the

targeted gene in the offspring of the treated individuals. It is indeed very unlikely that both components could efficiently reach germline cells that are embedded between several layers of tissues within the ovaries. Thus, fertilized eggs seem to be the most rational starting point and therefore the production and the collection of a significant number of eggs just after being laid by sexual females is the first critical point of the protocol. This implies the three main parameters we have first optimized in this protocol: i) the induction of sexual morphs, ii) the synchrony of males and females production and iii) a large number (1000s) of manipulated individuals to produce a sufficient number of eggs. Because diapause cannot be avoided, the *in ovo* PCR test is a proxy to estimate the success of the mutagenesis before eggs experience the 3 months of slow development. The second critical point of the protocol corresponds to the *a priori* choice of the cross that conditions genetic compatibility and by extension hatching rates and fitness of stable lineages. The main challenge of the aphid model in the view of developing targeted mutagenesis thus relies on the complexity of the biology of this insect. We discuss in the following paragraphs all the parameters that have been optimized to allow the production of stable mutant lineages in the pea aphid.

4.2. Lineages choice for sexual morphs induction, mating and hatching success

In order to produce sexual morphs, the two different lineages chosen for the cross must be able to fully respond to photoperiod shortening and alternate their reproductive mode. The implementation of two distinct induction protocols for the two lineages - one favoring a late production of males and the second an early production of oviparous females - ensures that sexual individuals become adult at the same period and are synchronously mature for mating. Self crosses must be

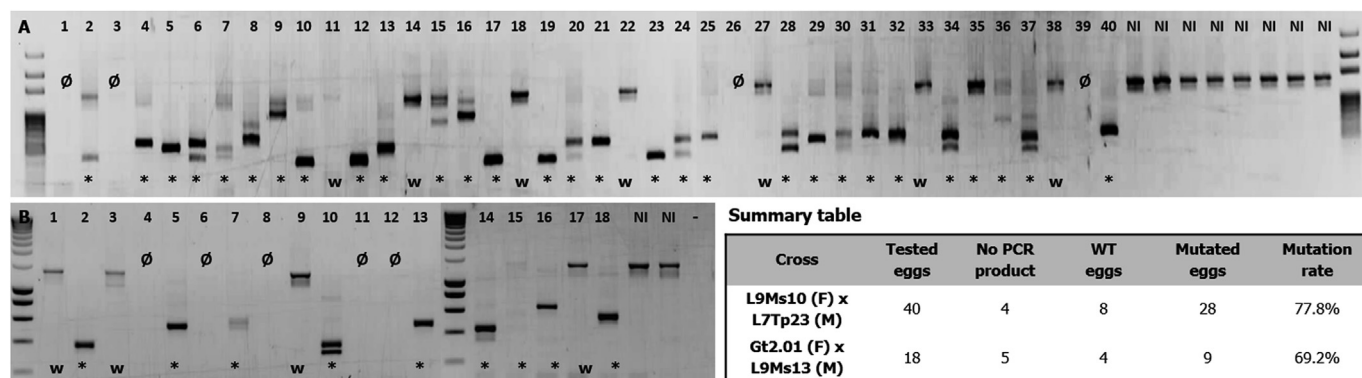


Fig. 6. – *In ovo* mutation rates estimation. For two different crosses (A: L9Ms10 x L7Tp23 and B: Gt2.01 x L9Ms13) eggs were injected with a sg1-sg2-sg3-sg4 and Cas9 protein mix. Respectively 40 and 18 melanized eggs from these two experiments were then collected for DNA extraction and for subsequent *stylin-01* genomic DNA region amplification. PCR products were loaded on a gel in order to identify deletion events between the different sgRNAs target sites, revealed by the presence of amplicons having a different size than the wild-type expected size. Eggs are classified into three different classes: wild-type eggs (w), mutated eggs showing deletion events (*) and eggs for which PCR did not work (Ø). In the summary table the ratio [mutated eggs/PCR positive eggs] gives an estimation of the *in ovo* mutation rate.

A. Stable lineages originated from eggs injected with sg1, sg2, sg3 and sg4 guide RNAs

sg1 target site		sg3 target site	
WT	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCGCATCTGGTCCAAGATT	WT	GCCCCAGACGGCCAGACCAATCGAAATCGGATACATCGCCGACGA
L2-allele1	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCGCCA-----AGATT	L2-allele1	GCCCCAGACGGCCAGACCAATCGAAATCGGATACATCGCCGACGA
L2-allele2	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCGCAT-----	L2-allele2	GCCCCAGACGGCCAGACCAATCGAAATCGGATACATCGCCGACGA
L4-allele1	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGC-----CTGGTCCAAGATT	L4-allele1	GCCCCAGACGGCCAGACCA-----ATCGGATACATCGCCGACGA
L7-allele1	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCGCATCTGGTCCAAGATT	L7-allele1	GCCCCAGACGGCCAGACCAATCGAAATCGGATACATCGCCGACGA
L15-allele1	CGCATCACTGAACCCGGAATCCAGAGCCG-----TCTGGTCCAAGATT	L15-allele1	GCCCCAGACGGCCAGACCAATCGAAATCGGATACATCGCCGACGA
sg2 target site		sg4 target site	
WT	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGTGTCCAGGGAGCTTCTGC	WT	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGCTCTCTGCCAGCACCCCGAACCAA
L2-allele1	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGT-----CCAGGGAGCTTCTGC	L2-allele1	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGCTCTCTGCCAGCACC-----AACCAG
L2-allele2	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGTAGCCGTAGCTCCAGGGAGCTTCTGC	L2-allele2	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGCTCTCTGCCAGCACC-----TGCCAGCACC-----CGAACCAA
L4-allele1	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGTGTGGGAGTCCAGGGAGCTTCTGC	L4-allele1	AAGAGTCGCTCAGATAC-----CTCTGCCAGCACC-----CGAACCAA
L7-allele1	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGTGTAGCCAGGGAGCTTCTGC	L7-allele1	AAGAGTCGCTCAGATA-----CCTCTCTGCCAGCACC-----CGAACCAA
L15-allele1	GAAGGCTGGCCAGAAAGGACCCGTAGCTGTG-----CAAGGGAGCTTCTGC	L15-allele1	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGC-----CTGCCAGCACC-----CGAACCAA

B. Stable lineages originated from eggs injected with sg4 guide RNA

sg4 target site	
WT	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGCTCTCTGCCAGCACC-----CGAACCAA
L14-allele1	AAGAGTCGCTCAGATACCTGGCTCT-----aaGCCAGCACC-----CGAACCAA
L14-allele2	AAGAGTCGCTCAGATACCTGG-----CTGCCAGCACC-----CGAACCAA
L16-allele1	AAGAGTCGCTCAGATAC-----CTCTGCCAGCACC-----CGAACCAA

Fig. 7. – Sequences of the mutations detected in lineages edited with CRISPR-Cas9. Both *stylin-01* alleles from all the lineages originated from eggs injected with a combination of sg1, sg2, sg3 and sg4 (A) or only sg4 (B) were sequenced. For the first sgRNAs combination (A), four lineages (L2, L4, L7 and L15) were stably mutated whereas for the second sgRNAs combination (B) two lineages were stably mutated. For each sgRNA the target site change relative to the wild type sequence for each allele is indicated: insertion (+) or deletion (Δ). The 3 nucleotides corresponding to the PAM motif are underlined.

avoided since most of the time they are unfit and usually result in very low hatching rates after diapause. In the current study, the three different cross combinations tested resulted in variable egg production rates thus revealing different genetic compatibility levels between selected lineages. Nevertheless, the production of numerous synchronized sexual females (1400) and males (800) is a way to overcome this issue, and to produce the hundreds of eggs needed for further microinjection. Once melanized, eggs must experience a 3-month period of diapause at low temperature. The process of diapause in the pea aphid – and in many other insects - is a slowing but not a cessation of development (Shingleton et al., 2003). The early stages of embryogenesis progress at a temperature-independent rate whereas later stages of embryogenesis progress at a temperature-dependent rate. However embryos maintained at very high temperatures in the very early stages show severe developmental abnormalities. Diapause is thus an incompressible event that cannot be artificially overcome. Hatching is promoted by placing aphids at 18 °C during a 2-weeks period. The embryos originating from the three cross combinations tested in this study displayed various hatching rates from 35 to nearly 80%. The hatching rate, in our hands, corresponds to the most robust indicator of the genetic compatibility between two lineages selected for a cross. It is thus important, when starting to set up a targeted mutagenesis protocol, to optimize the choice of the two lineages that will allow reaching the necessary scale of the experiment.

4.3. Egg injection procedure: timing and effect on melanization and post-diapause hatching

Once the mating of adult individuals is completed, sexual females start to deposit the first fertilized eggs on plants three days later. Females then continue to lay eggs for approximately one week with a peak in production three days after the first laid ones. Every day of the week of microinjection it is mandatory to repeat the same routine: individuals are placed every morning on a new plant and eggs are collected exactly 4 h later. The age of the eggs can thus be estimated between 0 and 4 h after egg laying (hAEL). Lin et al. (2014) performed a detailed cytological observation of the 10 first cycles of nuclei division of pea aphid early embryos originating from fertilized eggs. The authors estimated that these 10 cycles are completed within 16 h and that the 5th cycle of division is reached after approximately 6 h. At that time, the embryo contains 16 nuclei in a syncytial structure. The authors also performed in situ hybridization of ApVas1 mRNA - a germline marker - within embryos. Interestingly, they could not observe the germ plasm after the 3rd nuclei division, which means that none of the eight

observable nuclei are predetermined to be a germline nucleus. After the 4th division, the germ plasm is detectable which means that some nuclei will give rise to primordium germ cells. Whether the germline was of a single or multiple origin was not assessed in this study. It is known in drosophila that germ cells originate from three founding nuclei in the syncytial blastoderm embryo and continue amplification before moving into polar buds that give rise to the primordium germ cells (Campos-Ortega and Hartenstein, 2013 and Lindsley et al., 2016). Therefore in the case of the pea aphid, injecting eggs 4 h maximum after laying guarantees that they contain between 8 and 16 nuclei in a syncytial structure, but we do not know how many nuclei display a germline origin. CRISPR-Cas9 system could thus potentially generate more than two different mutated alleles within the offspring of the “foundress” individual. Nevertheless, we could only observed at most two mutated alleles within the offspring of the six mutated “foundress” suggesting that in these specific cases only one germline nucleus had been targeted. In a protocol aiming at performing germline transformation of various species of mosquitoes (including *A. gambiae* and *A. aegypti*) embryos are collected right after oviposition for 15 min then placed for 30 min under mosquito rearing specific conditions to allow their maturation/melanization. At the time of injection, embryos are thus 30–45 min old (Lobo et al., 2006). In *D. melanogaster* injections are also performed around 30 min after embryos collection which corresponds to the syncytial blastoderm stage (Kiehart et al., 2007). In both cases injections take place at the very early stages of embryogenesis to reduce mosaicism levels. As stated above, the early steps of aphid embryogenesis are slower so that a 0–4 h post laying window is comparable to a 30–45 min post-oviposition window in drosophila or mosquitoes. Another feature of aphid eggs is that bacteriocyte is observable at the early steps of embryogenesis at the posterior pole of the egg and is situated close to the future germline nuclei. To avoid any bacteriocyte damage the capillary was inserted at the opposite pole to allow a diffusion of the CRISPR-Cas9 components within the entire syncytium. Nevertheless, injecting those reagents at the “bacteriocyte pole” could be a way to preferentially reach germline nuclei. It has to be noted that given the large scale of these experiment it was not possible to test different sgRNAs concentrations or compare the impact of the injection of a Cas9 mRNA versus the Cas9 protein. These parameters had already been tested in the mosquito injection protocol (Kistler et al., 2015) so that we decided to directly inject the recombinant Cas9 protein with several sgRNAs at optimized concentrations. After the microinjection step, melanization is a first estimation of egg survival. Only eggs that had completed this step were conserved and placed on plants at low temperature. In our study, melanization rate ranged from 20 to 45%

depending on the experiment. In mosquitoes, hatching occurs between 3 and 5 days after microinjection (Lobo et al., 2006) whereas it happens between 2 and 3 days in drosophila (Kiehart et al., 2007). In the case of aphids, due to the obligate diapause, hatching cannot be observed before 85 days post-injection. For further comparisons hatching rates were estimated starting from melanized rather than injected eggs. As mentioned above, hatching rate is highly dependent on the genetic compatibility between the two lineages that are crossed. Nevertheless, the comparison of hatching rate of non-injected versus injected eggs mirrors the deleterious effect – including cytoplasm leakage, membrane deterioration and probably zygotic maternal mRNAs gradient perturbation – that the injection procedure can have on embryos fitness. Embryos survival rate after injection is estimated at 15–20% in *D. melanogaster* (Bassett et al., 2013) and approaches 10% in *A. aegypti* (Kistler et al., 2015). When considering the best cross combination (Gt2.01xL9Ms13), it appears that a survival rate of 11.7% (23 hatched lineages out of 195 melanized eggs) is quite similar to what has been observed in mosquitoes or drosophila. The individuals that hatch from eggs (also called foundress) then produce genetically identical offspring by clonal reproduction. Considering the peculiarity of clonal reproduction in aphids, if the germline nucleus was reached by the CRISPR-Cas9 system at the time of microinjection, the mutation would be fixed and all offspring will be identically mutated (see below). On the contrary, if only somatic cells were affected, then the offspring will not be mutated and somatic mutations would potentially affect the fitness of foundress individuals. This is illustrated by the fact that not all the hatched lineages gave birth to viable offspring. Indeed for the last experiment 14 out of the 23 hatched lineages gave offspring: these are referred as to stable lineages. The final stable lineages rate is thus of 7.1% (14 out of 195 melanized eggs).

4.4. *In vitro* and *in ovo* guide efficiency validation: two necessary check points before diapause

As mentioned above, the whole experiment requires 7 months for completion: 8 weeks for the induction of sexual morphs, 2 weeks for microinjection/melanization, 12 weeks of diapause, 2 weeks for hatching and another 4 weeks for the set up and maintenance of clonal lineages. Considering the complexity of the protocol, it is therefore crucial to verify *a priori* the cleavage efficiency of the sgRNA/Cas9 mixture injected within the egg. Indeed sgRNAs design and prediction mainly rely on the likelihood of the RNA sequence to anneal its target DNA sequence. In the recent years, many different bioinformatics tools were developed for such prediction purposes. In this study, 4 sgRNAs predicted to target the *stylin-01* coding sequence were designed and all of them appeared to efficiently cleave DNA *in vitro* when combined with the recombinant Cas9 protein. It thus appears that CRISPOR software (Concordet and Haeussler, 2018) offers a good chance to generate functional sgRNA molecules. Injecting several sgRNAs is a means to generate large deletions within the genomic DNA sequence of a given gene, and the observation of amplicons smaller than the wild-type is thus an easy way to confirm sgRNA efficiencies. As a side effect, the simultaneous injection of several guide RNAs might also increase the risk of off-target effects. In the future, methods such as the Digenome-seq (Kim et al., 2015), could be used to estimate the rate of off-target cleavages caused by specific sgRNAs, but were not investigated in this study. The approximate size of amplicons also appears to be sufficient to predict which combinations of sgRNAs are responsible for the large deletion events observed. In that regard the various patterns observed confirmed that the 4 sgRNAs were efficient to trigger DNA cleavage in early embryos and validated the functionality of the CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. Finally, *in ovo* mutation rates could be estimated at 70–78% in pea aphid eggs, a rate close to what can be observed in drosophila (50–86%, Bassett et al., 2013) but higher than the rates in mosquitoes estimated at 24.6% (Kistler et al., 2015). Sacrificing several eggs in the early steps of the experiment to check the editing

efficiency is thus an absolute pre-requisite to include before going through the long and complex steps of diapause and hatching.

4.5. Germline transmission rate within established mutant lineages

Combining the three successive microinjection experiments performed in this study, 17 stable lineages were eventually generated and maintained clonally. Depending on the efficiency of the system, it was possible to observe either one or the two alleles of *stylin-01* gene mutated and in the latter case to observe different mutations for the two alleles. Amplification, cloning and sequencing of the *stylin-01* genomic DNA region within the offspring of the 17 stable lineages revealed that 6 lineages (4 arising from eggs injected with the 4sgRNAs and two from eggs injected with only one sgRNA) contained an insertion/deletion of a few nucleotides within the target sequence of at least one sgRNAs. In all cases, open reading frames were modified with insertion/deletion events ranging from –10 nt to +13 nt. Large deletions (–380 nt or –75 nt) outside predicted target sites have also been observed in two cases. For two lineages L2 and L14, mutations in both *stylin-01* alleles were detected. In L2 lineage, multiple re-arrangements with insertions and deletions were observed at the four target sites for the two alleles. In the lineage originating from eggs injected with one sgRNA, L14, mutations were also observed on both alleles at sg4 target site. These two lineages correspond therefore to double heterozygous *stylin-01* mutants. For the other four mutated lineages, only one of the two parental alleles could be detected and its sequence analyzed. Surprisingly, the other parental allele could not be detected in these 4 lineages. It is possible that sequencing only 20 clones per PCR product would not guarantee the identification of both parental alleles. A possible cloning bias could also result in the fact that only one of the two alleles was preferentially introduced within the plasmid. In addition, the exact same mutations could be detected in later parthenogenetic generations suggesting the stable character of the mutations produced here (data not shown). In the aphid model, clonality thus allows germline mutations to be directly transmitted and fixed within their offspring. Finally, the germline transmission rate in this study reached 35%. In model organisms, germline transmission rate estimation requires a subsequent crossing generation. Those rates can reach 34.5% in *Drosophila* (Bassett et al., 2013) and 18.9% in mosquito (Kistler et al., 2015). Despite the low number of stable colonies generated in this study, the germline transmission rate of the mutations in the pea aphid is very close to what is observed in those models, which fully validates the current CRISPR-Cas9 mutagenesis protocol. In the case of heterozygous mutant lineages, it is possible to obtain homozygous mutant lineages by performing a self-cross. Mutated lineages must be submitted to a decreasing photoperiod treatment to allow the production of sexual morphs and their subsequent mating. After hatching, 25% of the lineages should thus be homozygous for the mutations, 50% heterozygous mutant and the remaining 25% would be of a wild-type genotype.

In conclusion, the current study provides a detailed step-by-step and reproducible framework of CRISPR-Cas9 mutagenesis to create and maintain stably edited aphid lineages. *Stylin-01* edited stable lineages have been successfully generated and colonies are now well established. Analyzing their phenotypes will require further investigations. To our knowledge this work corresponds to the first example of an efficient targeted mutagenesis in the aphid model. The availability of such a protocol thus represents a major advance for the aphid scientific community to decipher and validate gene function for various life history traits associated with aphids' peculiar biology and strongly responsible for the serious damages they cause within agro-ecosystems.

Acknowledgements

This work was funded by an INRA-SPE grant (2016–2017) lead by Gaël Le Trionnaire and Véronique Brault (INRA Colmar, UMR SVQV)

and the ANR SexAphid (2018–2020) project (ANR-17-CE20-0010) lead by Denis Tagu. The authors would like to thank Jean-Christophe Simon, Gaëtan Denis and Julie Jaquiéry (INRA Rennes, UMR IGEPP) for their advices on aphid crosses and rearing. Eric Marois and Stéphanie Blandin (CNRS Strasbourg, IBMC Unit) are greatly acknowledged for their advices on mosquito eggs microinjection protocol.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.016>.

References

- Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., Liu, J.-L., 2013. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* 4, 220–228.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V., 2013. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer Science & Business Media.
- Concordet, J.-P., Haeussler, M., 2018. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 46, W242–W245.
- The International Aphid Genomics Consortium (IAGC), 2010. Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol.* 8, e1000313.
- Cui, Y., Sun, J.L., Yu, L., 2017. Application of the CRISPR gene-editing technique in insect functional genome studies—a review. *Entomol. Exp. Appl.* 162, 124–132.
- Doudna, J.A., Charpentier, E., 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
- Gilles, A.F., Schinko, J.B., Averof, M., 2015. Efficient CRISPR-mediated gene targeting and transgene replacement in the beetle *Tribolium castaneum*. *Development* 142, 2832–2839.
- Jamison, B.V., Thairu, M.W., Hansen, A.K., 2018. Efficacy of in vivo electroporation on the delivery of molecular agents into aphid (Hemiptera: aphididae) ovarioles. *J. Insect Sci.* 18, 49.
- Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G.K., Rispe, C., Tagu, D., 2007. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Biotechnol.* 7, 63.
- Kiehart, D.P., Crawford, J.M., Montague, R.A., 2007. Quantitative microinjection of *Drosophila* embryos. *Cold Spring Harb. Protoc.* 4, prot4718.
- Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H.R., Hwang, J., Kim, J.-I., Kim, J.-S., 2015. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods* 12, 237.
- Kistler, K.E., Voshall, L.B., Matthews, B.J., 2015. Genome engineering with CRISPR-Cas9 in the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep.* 11, 51–60.
- Le Trionnaire, G., Wucher, V., Tagu, D., 2013. Genome expression control during the photoperiodic response of aphids. *Physiol. Entomol.* 38, 117–125.
- Legeai, F., Shigenobu, S., Gauthier, J.P., Colbourne, J., Rispe, C., Collin, O., Richards, S., Wilson, A.C., Murphy, T., Tagu, D., 2010. AphidBase: a centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome. *Insect Mol. Biol.* 19, 5–12.
- Lin, G.-w., Cook, C.E., Miura, T., Chang, C.-c., 2014. Posterior localization of ApVas1 positions the preformed germ plasm in the sexual oviparous pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *EvoDevo* 5, 18.
- Lindsley, D.L., Hardy, R.W., Ripoll, P., Lindsley, D., 2016. Gonadal mosaicism induced by chemical treatment of sperm in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 202, 157–174.
- Lobo, N.F., Clayton, J.R., Fraser, M.J., Kafatos, F.C., Collins, F.H., 2006. High efficiency germ-line transformation of mosquitoes. *Nat. Protoc.* 1, 1312.
- Mulot, M., Boissinot, S., Monsion, B., Rastegar, M., Clavijo, G., Halter, D., Bochet, N., Erdinger, M., Brault, V., 2016. Comparative analysis of RNAi-based methods to down-regulate expression of two genes expressed at different levels in *Myzus persicae*. *Viruses* 8, 316.
- Nouhaud, P., Peccoud, J., Mahéo, F., Mieuze, L., Jaquiéry, J., Simon, J.C., 2014. Genomic regions repeatedly involved in divergence among plant-specialized pea aphid biotypes. *J. Evol. Biol.* 27, 2013–2020.
- Peccoud, J., Mahéo, F., De La Huerta, M., Laurence, C., Simon, J.C., 2015. Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conserv. Divers.* 8, 484–492.
- Sandhu, G.S., Precup, J.W., Kline, B.C., 1989. Rapid one-step characterization of recombinant vectors by direct analysis of transformed *Escherichia coli* colonies. *Biotechniques* 7, 689–690.
- Shingleton, A.W., Sisk, G.C., Stern, D.L., 2003. Diapause in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) is a slowing but not a cessation of development. *BMC Dev. Biol.* 3, 7.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y., Zhang, Y., 2017. Progress and prospects of CRISPR/Cas systems in insects and other arthropods. *Front. Physiol.* 8, 608.
- Sunnucks, P., England, P.R., Taylor, A.C., Hales, D.F., 1996. Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic Sitobion aphids in Australia. *Genetics* 144, 747–756.
- Tagu, D., Le Trionnaire, G., Tanguy, S., Gauthier, J.-P., Huynh, J.-R., 2014. EMS mutagenesis in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, g3 113, 009639.
- Taning, C.N.T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., Smaghe, G., 2017. CRISPR/Cas9 in insects: applications, best practices and biosafety concerns. *J. Insect Physiol.* 98, 245–257.
- Wang, Y., Li, Z., Xu, J., Zeng, B., Ling, L., You, L., Chen, Y., Huang, Y., Tan, A., 2013. The CRISPR/Cas system mediates efficient genome engineering in *Bombyx mori*. *Cell Res.* 23, 1414.
- Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., Deshoux, M., Gargani, D., Calevro, F., Jimenez, J., Moreno, A., Krenz, B., 2018. Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *J. Virol.* 92, e00432-18.

Supplementary Tables and Figures

Table S1 – List of the primers used in this study

Oligonucleotide	Sequence
Stylin1-pF-sgRNA1	GAAATTAATACGACTCACTATAGGAATCCAGAGCCGCCATCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Stylin1-pF-sgRNA2	GAAATTAATACGACTCACTATAGGACCCGTAGCTGTGTTCCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Stylin1-pF-sgRNA3	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCGATGTATCCGATTTGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
Stylin1-pF-sgRNA4	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTGCTGGGCAGAGAGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
pR-sgRNA-univDR274	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACT
Styl1-BC29F	ATATGAATTC-TTACTGGTATTTTGGTTC
Styl1-BC24R	ATATGAATTC-TTACTGGTATTTTGGTTC
Styl1-BC57F	AGACGCATCCACAATCACA
Styl1-BC57R	CGGATGATCATTTCGAGGAG
M13-Fwd	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rev	AACAGCTATGACCATG

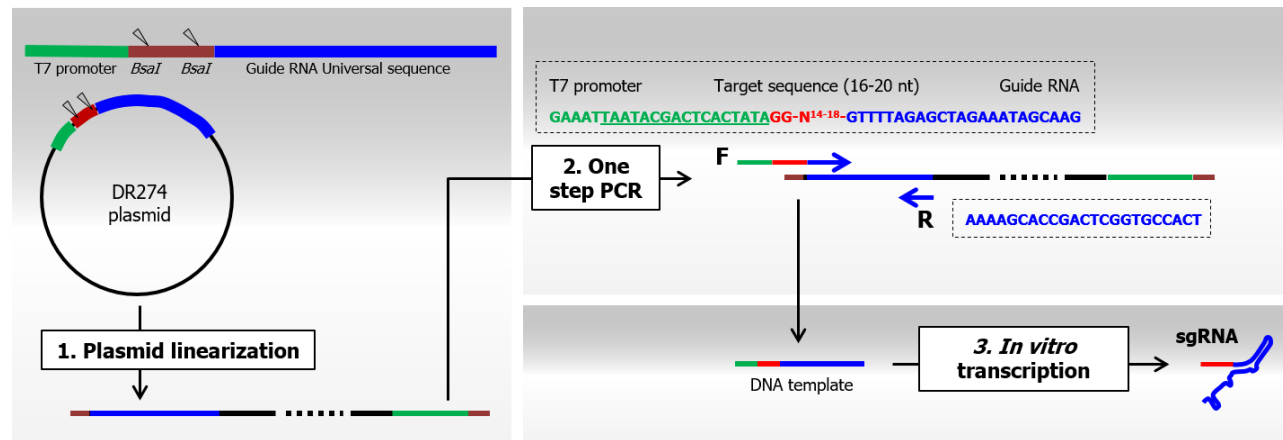


Figure S1 – *In vitro* single guide RNA synthesis. DR274 plasmid contains the guide RNA universal sequence necessary for Cas9 complexing. **1:** this plasmid is first linearized with *BsaI* restriction enzyme and then used as a template for PCR amplification with a reverse primer corresponding to the end of the universal guide RNA sequence and one long forward primer. **2:** this specific primer comprises the T7 promoter sequence followed by the target sequence of the candidate gene and the beginning of the universal guide RNA sequence. PCR amplification with low annealing temperature then allows the production of a DNA template. **3:** This template is used for T7 *in vitro* transcription of the single guide RNA.

4. Conclusion

Après plus de deux années de travail et malgré de nombreuses contraintes, nos équipes de Montpellier et Rennes ont finalement développé avec succès deux approches pour étudier les fonctions des gènes *stylins*. L'ARN interférence a permis d'observer à plusieurs reprises une réduction des niveaux d'expression (voir chapitres suivants), tandis que le système CRISPR-Cas9 a été mis au point pour la toute première fois chez le puceron *A. pisum*, générant des lignées KO pour le gène *stylin-01*. Ce système semble être une bonne alternative à l'approche ARN interférence qui présente de nombreux inconvénients en terme d'efficacité et de reproductibilité. Néanmoins, il est important de noter qu'il présente tout de même certains désavantages : les lignées KO sont pour l'instant maintenues dans un local confiné (type NS3), exigeant des règles de travail plus strictes. De plus, *A. pisum* est une espèce très sensible aux stress, qu'ils soient dus aux conditions d'élevage (trop d'individus sur une plante, état physiologique de la plante, etc.) ou à leur manipulation, nous obligeant à travailler avec un nombre limité d'individus à la fois. Ceci peut être problématique par exemple lorsqu'il faut utiliser beaucoup d'individus pour réaliser des tests de transmission de virus. Par ailleurs, *A. pisum* est un puceron qui ne se nourrit pas sur tout type de plante, ce qui pose aussi problème pour la transmission de certains de nos virus modèles. Enfin, un point important à souligner est que les lignées sont générées par reproduction sexuée. Elles correspondent donc à des lignées « sœurs » et ne sont pas génétiquement identiques, contrairement aux lignées clonales (parthénogénétiques). L'interprétation des résultats peut donc s'avérer plus complexe, et ce point sera discuté au cours des chapitres 3 et 4, et dans la discussion générale.

Chapitre 3

-

**Détermination du rôle des stylines dans
la transmission des virus non circulants**

1. Contexte de l'étude

Avant le démarrage du projet de thèse, l'acrostyle était déjà connu pour porter le(s) récepteur(s) du CaMV (Uzest et al., 2007, 2010). De plus, les protéines Stylin-01 et Stylin-02 venaient juste d'être identifiées à la pointe des stylets, et leur localisation en surface de l'acrostyle en faisait des candidats récepteurs sérieux. Nous avons donc cherché à savoir dans un premier temps si Stylin-01 ou Stylin-02 était impliquée dans la transmission du CaMV.

Pour cela, j'ai été chargée d'initier le développement de l'approche ARN interférence au laboratoire puis la recherche des phénotypes associés, dans le cadre de mon stage de master 2. Cette question a ensuite sollicité plusieurs membres de l'équipe. Nous avons pu mettre en évidence le rôle majeur de la protéine Stylin-01 dans la transmission du CaMV et ces résultats ont été publiés l'année dernière dans *Journal of Virology*, dans un article dont je suis co-auteure.

Durant ma thèse, j'ai également participé à la caractérisation des pucerons KO Stylin-01, et étudié leur capacité à transmettre le CaMV mais également le TuMV, un potyvirus lui aussi transmis selon la stratégie facteur assistant. Ce virus est utilisé en routine dans notre laboratoire, et présente l'avantage d'infecter le même hôte que le CaMV (le navet).

Suite à l'analyse protéomique effectuée durant ma première année de thèse, nous avons aussi identifié au moins trois protéines supplémentaires qui affluent à la surface de l'acrostyle : Stylin-03, Stylin-04 et Stylin-05. Elles représentent aussi des candidates sérieuses pour la transmission des virus. Suite à des résultats intéressants dans l'équipe détaillés ci-après, nous nous sommes d'abord focalisés sur la protéine Stylin-04. Nous avons recherché son implication éventuelle dans la transmission du TuMV en utilisant l'approche ARN interférence.

2. Détermination du rôle de Stylin-01 et Stylin-02 dans la transmission du CaMV

2.1. Présentation du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)

Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) infecte principalement la famille des *Brassicaceae* (chou, navet, colza, certains écotypes d'*A. thaliana*...) et aussi quelques espèces de la famille des *Solanaceae* (*Datura stramonium* ou encore certaines espèces du genre *Nicotiana*) (Schuelz et al., 1986). L'infection systémique des plantes hôtes par le CaMV peut se manifester par un éclaircissement des nervures des feuilles, des chloroses sous forme de mosaïque, ou encore un nanisme de la plante (Fig. 18). La sévérité de ces symptômes peut varier selon la souche virale, l'espèce végétale et les conditions environnementales.



Figure 18. Symptômes systémiques du CaMV sur navet

Feuille de navet infectée par le CaMV, souche Cabb B-JI. Un jaunissement sous forme de mosaïque et un éclaircissement des nervures sont visibles.

Le CaMV est transmis par plusieurs espèces de pucerons parmi lesquelles *M. persicae* ou *B. brassicae* sont connus pour être de bons vecteurs, tandis qu'à l'inverse, *Acyrtosiphon lactucae* ne transmet pas le virus (Uzest et al., 2007). Le CaMV peut également être inoculé mécaniquement au laboratoire grâce à l'utilisation d'abrasif créant des microlésions sur les feuilles.

Si le CaMV n'est pas un virus inquiétant d'un point de vue agronomique, il présente cependant un intérêt fondamental majeur car il est un modèle d'étude incontournable chez les virus de plante, entre autre pour caractériser le mode de transmission non circulant par vecteur. Il est le seul, jusqu'à présent, pour lequel une interaction directe avec l'acrostyle a été montrée (Uzest et al., 2007, 2010). Il est donc très étudié dans l'équipe pour des questions liées à la recherche du récepteur dans les stylets de puceron mais pas seulement. Son adaptation à la cellule végétale de son hôte, via des mécanismes cellulaires et moléculaires sophistiqués, a également été très étudiée.

Le complexe transmissible P2-P3-virion

Le génome du CaMV est une molécule d'ADN double brin circulaire de 8 kb comprenant sept ORFs, dont six sont exprimés en plante (Hohn et al., 1997). Parmi eux, les produits des gènes II à IV (P2, P3 et P4) sont importants pour la transmission par le puceron (Uzest et al., 2011).

La production de P2 en système hétérologue a en effet permis d'observer que des pucerons nourris au préalable sur *Parafilm* avec une solution contenant P2, étaient capables de transmettre des isolats parfaitement infectieux mais non transmissibles (Blanc et al., 1993a, 1993b). Les auteurs ont pu en déduire que la protéine P2 était le facteur assistant du virus. Il a aussi été montré par la suite que les pucerons nourris avec P2 ne peuvent transmettre les virions purifiés, que s'ils ont été préalablement incubés avec la protéine P3 (Drucker et al., 2002; Leh et al., 1999). P3 établirait donc un lien entre la particule virale et le facteur assistant P2, formant le complexe transmissible P2-P3-virion dont la structure est décrite ci-dessous (Fig. 19).

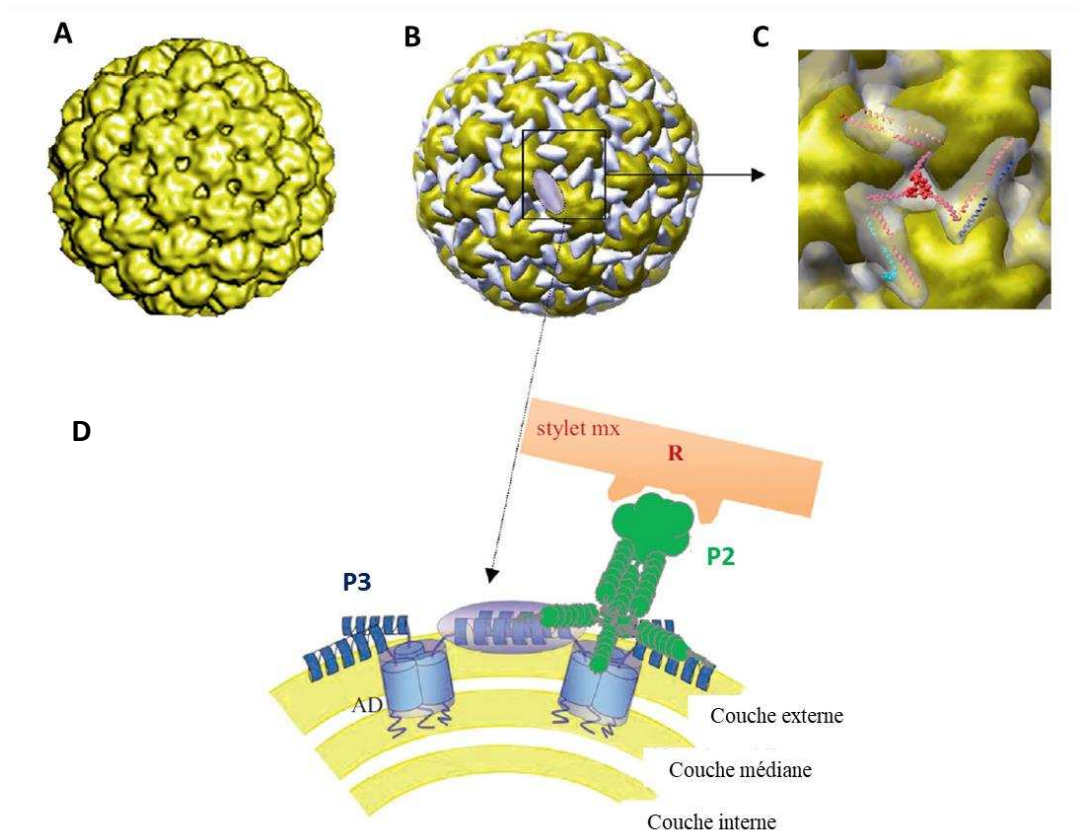


Figure 19. Organisation du complexe transmissible du CaMV

A) Reconstitutions 3D des particules virales à 26 Å de résolution obtenues à partir de données de cryomicroscopie électronique. **B)** Reconstitution 3D des complexes P3-virion à 26 Å de résolution. La protéine P3 (en gris) forme un réseau régulier autour des capsomères. **C)** Structure 3D de la protéine P3 (AA 2-74) obtenue à partir de données de cristallographie 3D. **D)** Modèle de l'interaction entre les éléments du complexe transmissible. Les domaines C-terminaux de la protéine P3 (en bleu) pénètrent les couches concentriques de la capside (en jaune) sous forme de trimères, via les pores ou domaines d'ancrage (AD) présents entre les capsomères. Les domaines N-terminaux sont exposés en surface où ils peuvent interagir avec les domaines homologues émergeant des pores adjacents sous forme de dimères antiparallèles. La protéine P2 (en vert), interagirait via son domaine C-terminal avec la protéine P3 tandis que le domaine N-terminal permettrait l'accrochage de la protéine au niveau des récepteurs (R) dans les stylets maxillaires du puceron. *Adaptée de Uzest et al. (2011)*

- La particule virale

Le CaMV est un virus de 53 nm de diamètre dont la capside non enveloppée comprend 420 sous-unités protéiques (de 37 à 44 kDa). Celles-ci résultent d'un clivage en N- et C- terminal de la protéine P4 (57 kDa), et de nombreuses modifications post-traductionnelles (glycosylations et phosphorylations) (Mesnard et al., 1993; Torruella et al., 1989). Des expériences de diffusion de neutrons sur particules virales purifiées, ont d'abord permis de montrer que la capside était arrangée en trois couches concentriques, l'ADN viral étant présent au niveau des couches internes II et III (Kruse et al., 1987). Des données de cryo-microscopie électronique ont ensuite permis de caractériser sa symétrie icosaédrique (T=7) (Cheng et al., 1992). Elles ont également permis de montrer que sa couche externe présente une organisation en 12 pentamères et 60 hexamères, entourés de canyons. La protéine P3 est présente dans ces canyons, autour des capsomères, formant ainsi un réseau régulier tout autour de la capside virale (Plisson et al., 2005).

- La protéine P3

P3 est une protéine de 15 kDa comportant 129 acides aminés (AA). Son domaine C-terminal est ancré profondément dans la capside, les AA 60 à 110 étant impliqués dans l'interaction avec le domaine C-terminal (AA 80 à 112) de la protéine P4 (Leh et al., 2001). Il contient également un motif riche en lysine et en proline (AA 112 à 121), connu pour interagir avec l'ADN (Mougeot et al., 1993).

Le domaine N-terminal (les 33 premiers AA) est, quant à lui, exposé en surface de la capside. Sa structure atomique a été résolue (Hoh et al., 2010). Il interagit sous la forme d'un dimère antiparallèle avec un domaine équivalent émergeant d'un pore adjacent. Il est susceptible de former des interactions de type *coiled-coil* à la surface de la capside (Leclerc et al., 1998), notamment avec la protéine P2 ou la protéine de mouvement P1 (Stavolone et al., 2005).

- La protéine P2

P2 est une protéine de 159 acides aminés (18k Da). Le domaine C-terminal (60 derniers AA) est constitué de deux hélices α séparées par une tige-boucle qui conduisent à l'association avec P3 (Leclerc et al., 1998). Ces mêmes acides aminés C-terminaux sont également capables d'auto-oligomérisation (Hebrard et al., 2001).

A l'extrémité opposée, le domaine N-terminal de P2 est impliqué dans l'interaction avec le récepteur dans les stylets de pucerons (Moreno et al., 2005). L'utilisation de mutants a mis en évidence que l'AA 6 était important pour la transmission par vecteur. En effet, selon la mutation introduite sur cet acide aminé, la capacité du vecteur à transmettre le virus peut être modifiée : les espèces non vectrices peuvent transmettre et inversement. Ainsi, le mutant Q6H (changement d'une glutamine en histidine) entraîne une diminution drastique du taux de transmission du virus par l'espèce *B. brassicae*, alors que celui-ci reste inchangé avec l'espèce *M. persicae*.

De plus, le mutant Q6Y (changement d'une glutamine en tyrosine) a totalement perdu sa capacité à se fixer aux récepteurs dans les stylets du puceron et n'est plus transmis par vecteur (Uzest et al., 2007).

L'obtention de la structure de P2, en particulier du domaine N-terminal, fournirait donc de précieuses informations sur les sites directement impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Ces analyses structurales sont actuellement en cours chez nos collaborateurs (P. Bron, CBS Montpellier).

L'activation de la transmission

L'acquisition du complexe transmissible résulte de mécanismes cellulaires et moléculaires qui représentent une adaptation virale très sophistiquée, maximisant les chances de transmission (Bak et al., 2013; Martinière et al., 2013). Ces mécanismes ont été mis en évidence par des chercheurs de l'équipe d'accueil VIP. Ils décrivent la réorganisation complète des éléments du complexe transmissible en réponse à la pénétration des stylets dans la plante.

Avant l'arrivée du puceron, protéines et virions sont en effet séparés dans la cellule végétale : les virions décorés de la particule P3 sont principalement contenus dans des usines virales (VF) tandis que la totalité de la protéine P2 est confinée dans des corps à transmission (TB). Lorsque le puceron perfore les cellules avec ses stylets, les VF libèrent les complexes virions-P3 tandis qu'une entrée de tubuline dans les TB provoque la libération des protéines P2. Les protéines P2 se lient alors aux microtubules et aux complexes virions-P3 : il y a formation des complexes transmissibles répartis dans toute la cellule sur le réseau de microtubules. Ils sont ainsi plus facilement accessibles pour le puceron. Ce phénomène, nommé « activation de la transmission », est défini comme le passage de l'état pour lequel le virus n'est pas transmissible à l'état où il le devient, en présence de son vecteur (Drucker and Then, 2015).

2.2. Mise en évidence du rôle de Stylin-01 dans la transmission du CaMV par ARN interférence

2.2.1. Résumé de l'étude

Des immuno-marquages sur stylets disséqués avec une banque d'anticorps dirigés contre des protéines RR-1, venaient de révéler la présence de Stylin-01 et de Stylin-02 dans l'acrostyle. Ces protéines sont très conservées et possèdent un peptide en commun au niveau de leur extrémité C-terminale : le peptide 1-11. Celui-ci est directement accessible en surface de l'organe et co-localise avec les sites de rétention du CaMV. L'objectif de cette étude était donc de déterminer l'implication de Stylin-01 et/ou Stylin-02 dans la transmission de ce virus.

Dans un premier temps, des tests de compétitions avaient été réalisés *in vitro* sur des stylets disséqués d'*A. pisum*, entre le facteur assistant P2 et l'anticorps qui cible le peptide 1-11. Ils avaient permis de montrer que l'accrochage de l'anticorps était significativement réduit lorsque les stylets avaient été pré-incubés avec P2, et inversement (Fig. 4-BC - article). Ces résultats démontraient qu'il y avait effectivement compétition pour les sites d'accrochage sur l'acrostyle.

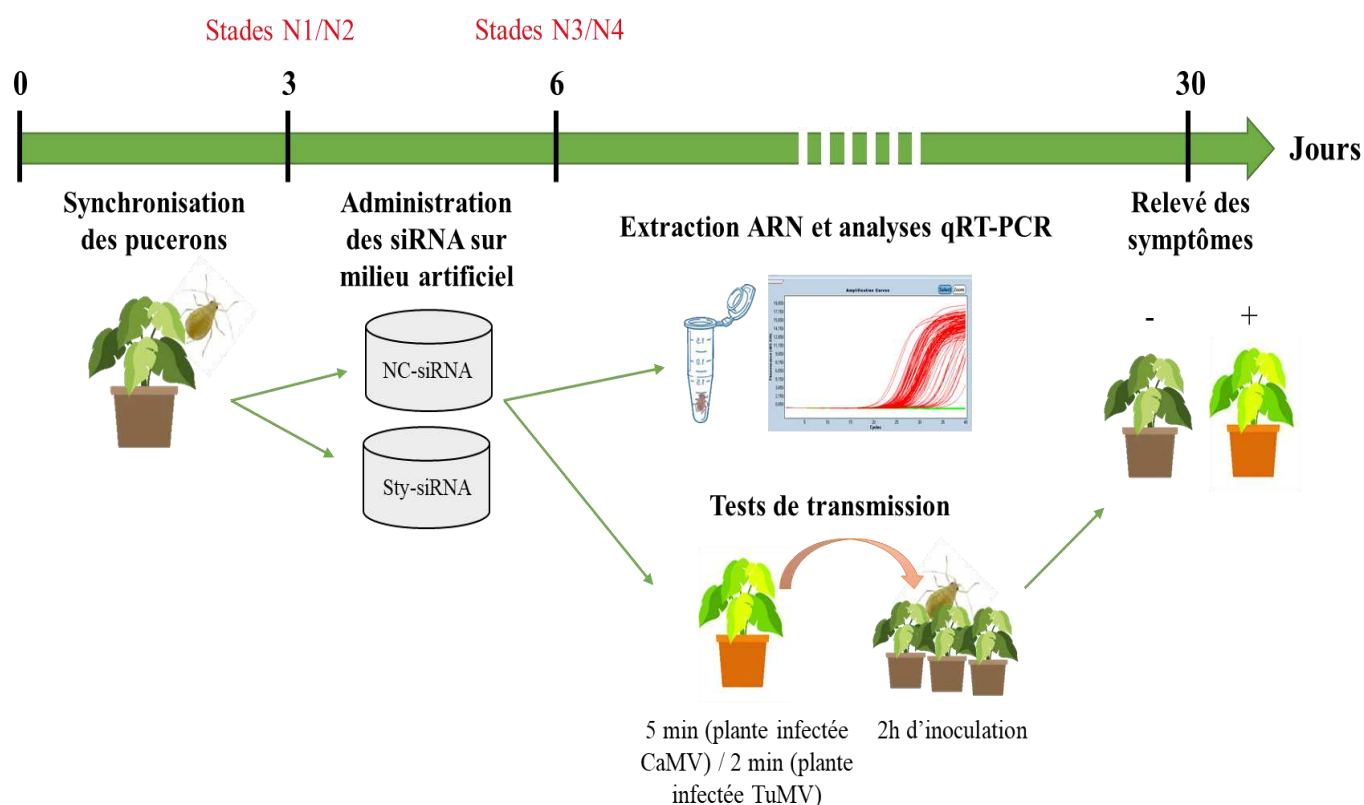


Figure 20. Représentation schématique du protocole de *silencing* et des tests de transmission

Au jour 0, des adultes *M. persicae* sont laissés sur aubergine pour synchronisation des pucerons. Au jour 3, les larves N1/N2 sont positionnées sur milieu artificiel contenant les siRNA contrôles (NC-siRNA) ou les siRNA dirigés contre les stylines (Sty-siRNA). Après 72 h, au jour 6 (stades N3/N4), des pools de 10 pucerons sont prélevés pour analyser les niveaux d'expression des gènes *stylins* par PCR quantitative. En parallèle, des pucerons sont récupérés pour effectuer des tests de transmission avec le CaMV ou le TuMV : la période d'acquisition du virus est de 5 min et 2 min, respectivement sur plantes sources (21 jours post inoculation), puis les pucerons sont transférés sur les navets sains pour une période d'inoculation de 2 h. Les symptômes sont régulièrement relevés jusqu'au jour 30.

Dans un deuxième temps, nous avons diminué l'expression des gènes *stylin-01* et *stylin-02* par ARN interférence, et réalisé des tests de transmission avec les pucerons traités (**Fig. 20**). Lors de cette étude, nous avons décidé que seules les répétitions pour lesquelles nous observions une réduction significative des transcrits seraient conservées pour l'analyse des phénotypes. De cette manière, nous avons vu qu'une réduction moyenne de 66 % de l'expression du gène *stylin-01* était directement corrélée à une diminution du taux de transmission du CaMV, de 40 % par rapport à la condition contrôle (**Fig. 5-AB - article**).



Afin de vérifier que cette baisse de la transmission n'était pas due à un effet indirect du traitement sur le comportement alimentaire des pucerons, l'expérience a été renouvelée sous contrôle EPG. De cette manière, nous nous sommes assurés que les pucerons avaient bien eu accès au même nombre de ponctions intracellulaires (cinq ponctions en l'occurrence, définies comme optimales pour la transmission du CaMV par [Baptiste Monsion lors de sa thèse](#)) au moment d'acquérir le virus. Une diminution du taux de transmission a de nouveau été observée pour les pucerons nourris sur *Sty01-siRNA*, tandis que les durées moyennes des ponctions intracellulaires étaient identiques entre les pucerons traités et contrôles (**Fig. 5F - article**). L'ensemble de ces résultats nous ont permis de conclure que *Stylin-01* semblait être le meilleur candidat récepteur du CaMV.

A l'inverse, une réduction de 28 % des transcrits *stylin-02* n'a pas eu d'effet sur la transmission (**Fig. 5-CD - article**), suggérant que cette protéine ne serait pas impliquée. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure formellement car l'efficacité du traitement est moindre par rapport à *stylin-01*, et peut-être insuffisante pour observer un phénotype.

2.2.2. Article 3 : Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors



Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors

Craig G. Webster,^{a*} Elodie Pichon,^a Manuella van Munster,^a Baptiste Monsion,^a Maëlle Deshoux,^a Daniel Gargani,^a Federica Calevro,^b Jaime Jimenez,^c Aranzazu Moreno,^c Björn Krenz,^{d*} Jeremy R. Thompson,^d Keith L. Perry,^d Alberto Fereres,^c  Stéphane Blanc,^a  Marilyne Uzest^a

^aBGPI, Université de Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

^bUniversité de Lyon, INSA-Lyon, INRA, BF21, UMR0203, Villeurbanne, France

^cInstituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

^dPlant Pathology and Plant-Microbe Biology Section, School of Integrative Plant Science, Cornell University, Ithaca, New York, USA

ABSTRACT Plant viruses transmitted by insects cause tremendous losses in most important crops around the world. The identification of receptors of plant viruses within their insect vectors is a key challenge to understanding the mechanisms of transmission and offers an avenue for future alternative control strategies to limit viral spread. We here report the identification of two cuticular proteins within aphid mouthparts, and we provide experimental support for the role of one of them in the transmission of a non-circulative virus. These two proteins, named Stylin-01 and Stylin-02, belong to the RR-1 cuticular protein subfamily and are highly conserved among aphid species. Using an immunolabeling approach, they were localized in the maxillary stylets of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* and the green peach aphid *Myzus persicae*, in the acrostyle, an organ earlier shown to harbor receptors of a noncirculative virus. A peptide motif present at the C termini of both Stylin-01 and Stylin-02 is readily accessible all over the surface of the acrostyle. Competition for *in vitro* binding to the acrostyle was observed between an antibody targeting this peptide and the helper component protein P2 of *Cauliflower mosaic virus*. Furthermore, silencing the *stylin-01* but not *stylin-02* gene through RNA interference decreased the efficiency of *Cauliflower mosaic virus* transmission by *Myzus persicae*. These results identify the first cuticular proteins ever reported within arthropod mouthparts and distinguish Stylin-01 as the best candidate receptor for the aphid transmission of noncirculative plant viruses.

IMPORTANCE Most noncirculative plant viruses transmitted by insect vectors bind to their mouthparts. They are acquired and inoculated within seconds when insects hop from plant to plant. The receptors involved remain totally elusive due to a long-standing technical bottleneck in working with insect cuticle. Here we characterize the role of the two first cuticular proteins ever identified in arthropod mouthparts. A domain of these proteins is directly accessible at the surface of the cuticle of the acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets. The acrostyle has been shown to bind a plant virus, and we consistently demonstrated that one of the identified proteins is involved in viral transmission. Our findings provide an approach to identify proteins in insect mouthparts and point at an unprecedented gene candidate for a plant virus receptor.

KEYWORDS aphid, cuticular protein, plant virus, receptor, stylets, transmission

The transmission of plant viruses by aphid vectors has been classified into two major distinct categories designated “circulative” and “noncirculative” (1, 2). Circulative viruses are able to cross gut and salivary glands barriers. They are internalized in the aphid body, excreted into the salivary gland lumen, and finally inoculated via salivation

Received 14 March 2018 **Accepted** 25 April 2018

Accepted manuscript posted online 16 May 2018

Citation Webster CG, Pichon E, van Munster M, Monsion B, Deshoux M, Gargani D, Calevro F, Jimenez J, Moreno A, Krenz B, Thompson JR, Perry KL, Fereres A, Blanc S, Uzest M. 2018. Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *J Virol* 92:e00432-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18>.

Editor Anne E. Simon, University of Maryland, College Park

Copyright © 2018 Webster et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Marilyne Uzest, marilyne.uzest@inra.fr.

* Present address: Craig G. Webster, Department of Primary Industries and Regional Development, Crop Protection Branch, South Perth, Western Australia, Australia; Björn Krenz, Leibniz-Institut DSMZ, Braunschweig, Germany.

into a new host plant. In contrast, noncirculative viruses do not penetrate the aphid body but are retained on the cuticle of the insect. They reversibly attach to the insect feeding apparatus during acquisition from an infected plant. There, they can remain infectious for only a short period (generally a few minutes) and are rapidly released and inoculated into a new host plant together with the aphid saliva (3–6). Most noncirculative virus species, including those in the families *Bromoviridae*, *Potyviridae*, *Caulimoviridae*, and *Betaflexiviridae*, are retained on the cuticle lining the inner canals of the maxillary stylets (7–10). However, a few species in the genera *Sequivirus* and *Closterovirus* are retained upstream in the foregut, either in the precibarium or in the cibarium (11, 12).

Numerous studies have attempted to decipher the molecular details of noncirculative virus-aphid interactions, but most have focused on viral determinants. These viral molecules are now well defined for the best-characterized viral species (for review, see references 5, 6, 13, and 14). Two types of proteins are key to successful interaction with aphid vectors: the coat protein and the virus-encoded “helper component.” Viruses in the genus *Cucumovirus* have adopted a “capsid strategy” and bind directly through their coat protein to putative receptors in aphid mouthparts (15–17), whereas a helper component is mandatory in the genera *Potyvirus* and *Caulimovirus*. This helper component—HC-Pro in the case of potyviruses and P2 in the case of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)—binds to putative receptors in insect stylets and creates a molecular bridge between the receptor and the virus particle (18–21).

To date, the identity of the receptors of noncirculative viruses in the aphid mouthparts (and/or foregut) is totally unknown. Their characterization is the major challenge to understanding noncirculative virus-vector interactions and to develop alternative control strategies that could interfere with virus transmission. The technical difficulty of manipulating insect stylets, a cell-free network of highly cross-linked chitin fibers and cuticular proteins, is undoubtedly the major bottleneck to solving this problem. Because noncirculative viruses are acquired when plant sap or cell contents are pumped through the stylets and released when saliva is spitted out, their receptors are usually assumed to be located at the extreme tip of aphid maxillary stylets, where the food and salivary canals fuse to form the common duct (8, 22). Consistently, using *in vitro* interaction assays, we earlier showed that the CaMV helper component P2 binds exclusively to cuticular proteins at the surface of the acrostyle, an organ discovered in the common duct of aphid stylets (9, 23). CPR proteins (cuticular proteins with the Rebers and Riddiford consensus sequence [RR]) represent the largest cuticular protein family described for arthropods (24, 25). In aphids, depending on the RR sequence, CPR proteins have been divided into subgroups RR-1, RR-2, and RR-3, RR-2 being by far the largest (25–30). Immunolabeling of dissected stylets revealed that proteins of the RR-2 subgroup are located within the acrostyle, but they proved poorly accessible at its surface and the identity of the corresponding genes could not be confirmed (23, 31).

To identify receptor candidates readily accessible at the surface of the acrostyle, we decided to extend this approach to the other subgroups of the CPR family. Here we report the identification of two closely related and highly conserved RR-1 cuticular proteins, Stylin-01 and Stylin-02, in the acrostyle of both *Myzus persicae* and *Acyrtosiphon pisum*. The two proteins harbor nearly identical C-terminal domains that are surface exposed and that perfectly matches the localization of the CaMV-P2 binding sites. Remarkably, CaMV P2 and an antibody targeting the surface-exposed domain of Stylin-01 and -02 competed for binding to the acrostyle, and RNA interference (RNAi) functionally confirmed that Stylin-01 is involved in CaMV transmission. Our results represent the first identification of cuticular proteins in aphid stylets and in the acrostyle and reveal Stylin-01 as the prime candidate receptor for the vector transmission of noncirculative plant viruses.

RESULTS

Identification of the first cuticular protein in aphid maxillary stylets: Stylin-01. We first produced the anti-1-01 antibody (Table 1), targeting the peptide 1-01 (ILVQDSAP

TABLE 1 Antibodies and stylet immunolabeling results^a

Antibody ID	Peptide ID	AA positions in proteins	Peptide sequence	Specificity	Labeling	Accessibility
Anti-1-01	1-01	32–46	ILVQDSAPSADGSLK	Stylin-01	+	PAC
Anti-1-05	1-05	21–35	PAGQSPESRAVILVQ	Stylin-01	+	Em
Anti-1-06	1-06	38–52	APSADGSLKNNFQTD	Stylin-01	+	PAC
Anti-1-07	1-07	32–46	SQEQEVNFDGNFKNK	Stylin-02	+	PAC
Anti-1-08	1-08	48–62	NFQTDNGIKQEEVRY	Stylin-01	–	NA
Anti-1-09	1-09	59–73	EVRYLKAGPEGVSV	Stylin-01	–	NA
Anti-1-10	1-10	92–106	YVADENGYQPYGAHL	Stylin-01	+	Em
Anti-1-11	1-11	121–135	RYLASLPSTPEPKYQ	Stylin-01/02	+	Ac
Anti-1-13 ^b	1-13	108–122	TPPPIPAEIQESLRY	Stylin-01/02	+	Em
		106–120	LPTPPPIPAEIQESL			

^aID, identifier; AA, amino acid; Ac, epitope exposed at the surface and directly accessible; PAC, epitope poorly accessible (labeling either weak or visible as dots without chitinase treatment); Em, epitope embedded, not accessible at the surface of the stylets (labeling visible only after chitinase digestion); NA, not applicable, because of the total lack of labeling regardless of the treatment. +, labeling observed at the tip of maxillary stylets; –, no labeling detected regardless of the tested conditions.

^bDue to poor immunogenicity prediction, two partially overlapping peptides were used for immunization.

SADGSLK), present in a single protein of *M. persicae*, MYZPE13164_G006_v1.0_000055990, and *A. pisum*, ACYP1009006. This protein is a typical RR-1 protein. When incubated with *M. persicae* or *A. pisum* individualized stylets, anti-1-01 antibody labeled the distal tip of maxillary stylets (Fig. 1A). The labeling was visible as fluorescent dots mainly in the acrostyle region, indicating that the corresponding protein is present at this location. However, the discontinuous and weak signal intensity suggested that the epitope recognized by anti-1-01 is embedded into the chitin and poorly accessible, as confirmed by the fact that a partial chitinase digestion prior to immunolabeling greatly increased the signal intensity (Fig. 1A).

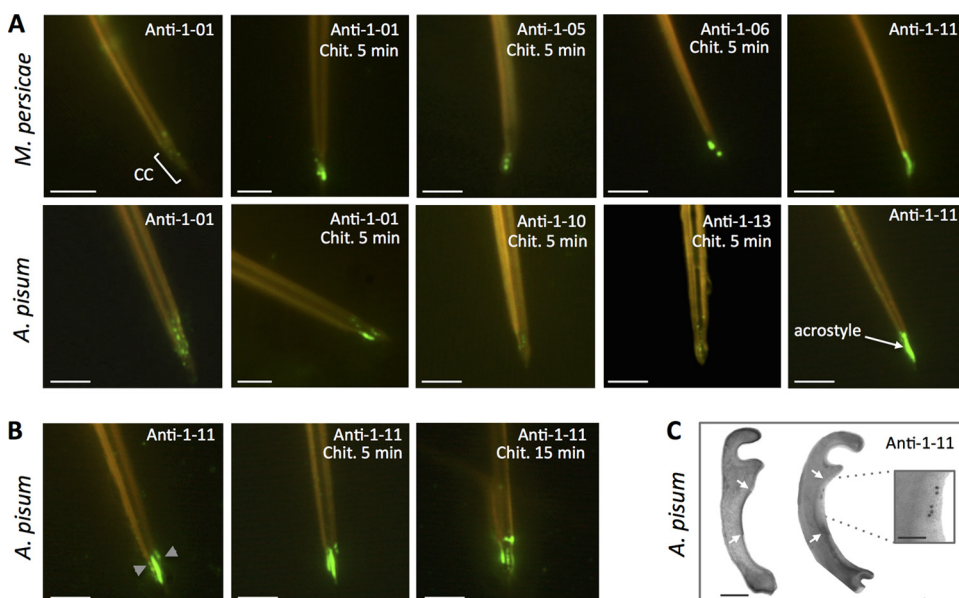


FIG 1 Stylin-01 is present in the acrostyle. (A) Immunolabeling of *M. persicae* (top) and *A. pisum* (bottom) dissected maxillary stylets untreated or predigested with chitinase (Chit.). Fluorescence signals were more or less intense depending on the antibody used and visible at the tip of maxillary stylets in the common canal (CC) and in the acrostyle. The antibodies for which no labeling has been observed are not shown (anti-08 and anti-09). (B) Anti-1-11 antibody directly labeled the surface of the acrostyle of aphid maxillary stylets and was weaker following a 5- to 15-min chitinase digestion treatment. (C) Transmission electron microscopy (TEM) observations of cross sections of the upper part of the common canal of *A. pisum* (indicated by gray arrowheads on the leftmost image of panel B). The darker density at the surface of the inner cuticle corresponds to the acrostyle (white arrows). Immunogold labeling with anti-1-11 antibody (right) showed gold particles at the surface of the acrostyle (magnified in the inset). Scale bars represent 5 μ m in all immunofluorescence images, 100 nm in the TEM panel, and 50 nm in the inset.

To further confirm the presence of this protein at the tip of *M. persicae* and *A. pisum* maxillary stylets, and to evaluate whether one or more of its epitopes may emerge at the surface and be readily accessible, seven additional antibodies were produced (Table 1). The targeted peptides were designed in order to completely cover the mature protein (116 amino acids in length). Unfortunately, an 18-amino-acid region within the RR-1 chitin-binding domain was predicted to be poorly immunogenic and thus not considered for peptide syntheses and antibody production. Antibodies anti-1-08 and anti-1-09 did not label *M. persicae* or *A. pisum* stylets, even after partial chitinase treatment. All other antibodies (anti-1-05, anti-1-06, anti-1-10, anti-1-13, and anti-1-11) positively labeled the tip of *M. persicae* and/or *A. pisum* maxillary stylets (Fig. 1A), with a remarkable intensity for anti-1-11. The corresponding protein in each aphid species was, respectively, named Mp_Stylin-01 and Ap_Stylin-01.

Peptide 1-11 is directly accessible at the surface of the acrostyle. In contrast to all other peptides of Stylin-01 (Fig. 1A), the peptide 1-11 (RYLASLPSTPEPKYQ) is readily accessible without the need for chitinase treatment (Fig. 1B) and completely covers the surface of the acrostyle. Interestingly, in this case, the intensity of the labeling was weakened by chitinase digestion. The presence of peptide 1-11 was also revealed on the sides of the food and common canals at the tip of maxillary stylets, indicating that it may emerge not solely from the acrostyle but also from neighboring regions (Fig. 1B). In parallel, gold labeling of ultrathin cross sections of *A. pisum* maxillary stylets with anti-1-11 further confirmed the presence of the corresponding peptide at the surface of the acrostyle (Fig. 1C).

Stylin-01 is highly similar to another RR-1 protein. A neighbor-joining phylogeny analysis revealed orthologs for almost all RR-1 cuticular proteins in the three aphid species with available genome sequences, *M. persicae* (Mp), *A. pisum* (Ap), and *Diuraphis noxia* (Dn). Furthermore, the phylogenetic tree illustrated that Stylin-01 clearly grouped with a second RR-1 protein: Ap_ACYPI003649/Mp_G006_000086060/Dn_XP_015379180.1 (Fig. 2). In this analysis, the mature protein sequences of Ap_ACYPI009006 (Ap_Stylin-01) and Ap_ACYPI003649 were 71% identical. Moreover, the 15 C-terminal amino acids of this closely related RR-1 protein shared 80% identity (12 out of 15 amino acid residues) with peptide 1-11 of Stylin-01 (Fig. 3A). This high degree of identity between the C-terminal sequences of Stylin-01 and the second protein prompted testing whether anti-1-11 could recognize both and therefore whether Ap_ACYPI003649 could also be present in aphid stylets. Peptides of 18 amino acids in length containing the 15 C-terminal amino acids of Ap_ACYPI009006 (Stylin-01 peptide 1-11) and Ap_ACYPI003649 were blotted onto nitrocellulose membrane for Western blot analyses. In contrast with anti-1-01 antibody, which reacts specifically with the N terminus of Ap_ACYPI009006 and not with that of Ap_ACYPI003649, this experiment revealed that anti-1-11 antibody reacts strongly with both peptides (Table 2). Therefore, the acrostyle labeling observed with anti-1-11 could be due to the C terminus of Ap_ACYPI009006 (Stylin-01), of Ap_ACYPI003649, or both.

Identification of a second RR-1 cuticular protein in aphid maxillary stylets – Stylin-02. While Ap_ACYPI003649 is recognized by the anti-1-11 antibody, this does not necessarily confirm that this protein is also present in aphid stylets. To assess this possibility, an antibody specifically directed to Ap_ACYPI003649 protein was produced. A peptide of 15 amino acids in length—peptide 1-07 (Table 1)—was chosen in the N-terminal part of the mature protein for immunization, in the region where sequences of Ap_ACYPI003649 and Ap_ACYPI009006 are the most divergent. A dot blot analysis confirmed the specificity of anti-1-07 antibody for the corresponding peptide of Ap_ACYPI003649 (Table 2). When incubated with *A. pisum* dissected stylets, anti-1-07 antibody labeled the tip the acrostyle (Fig. 3B), indicating the presence of the Ap_ACYPI003649 protein that we logically named Stylin-02. As for regions of Stylin-01 other than the C terminus, the labeling of Stylin-02 with anti-1-07 seemed stronger after an extended treatment (15 to 60 min) with chitinase, indicating that this motif is poorly accessible at the surface (Fig. 3B).

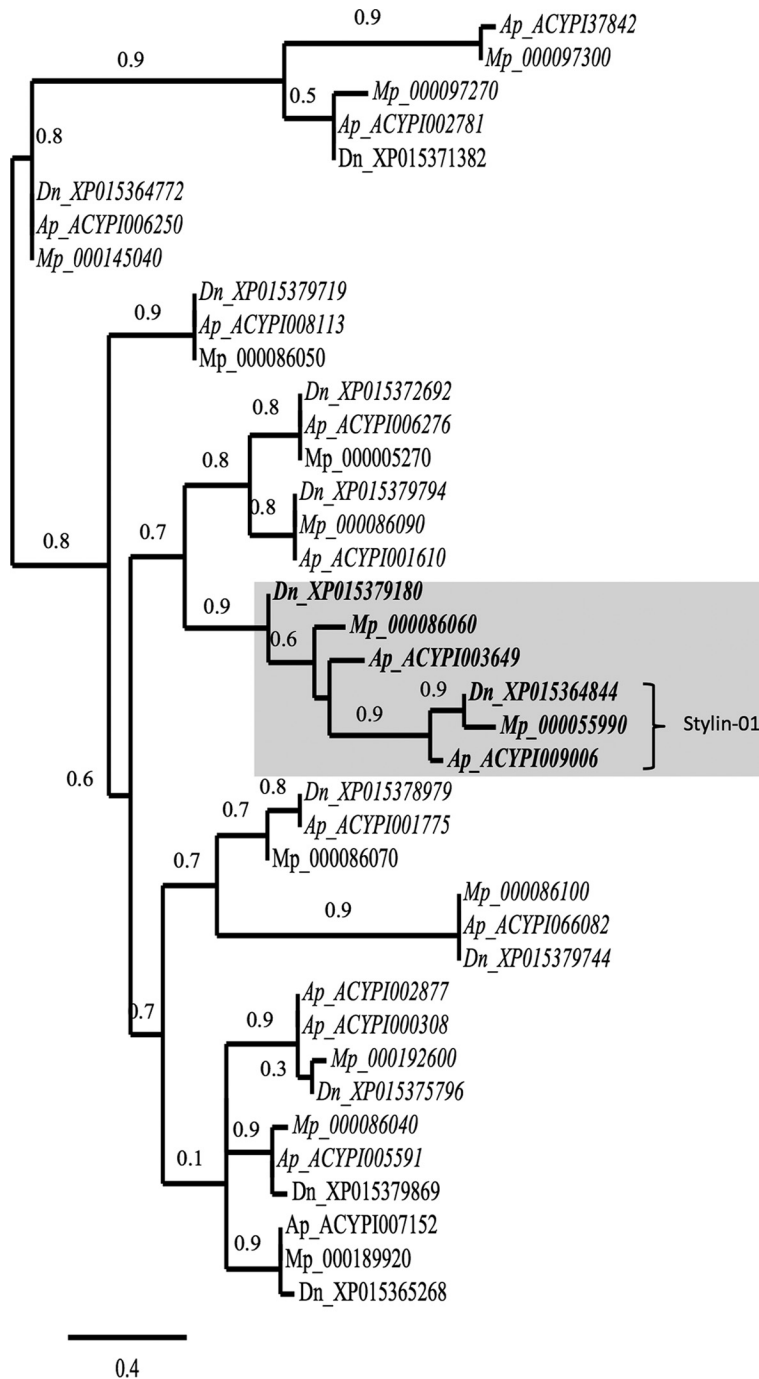


FIG 2 Phylogenetic relationships of putative RR-1 proteins of *M. persicae* (Mp), *A. pisum* (Ap), and *D. noxia* (Dn) with trimmed signal peptides. Database accession numbers for each gene are indicated on the right of the species abbreviation. It is noteworthy that to retrieve *M. persicae* sequences from Aphidbase, numbers should be preceded by MYZPE13164_G006_v1.0_. Gene orthologs determined by OrthoMCL software are in italics. Branch support values are indicated at the node, and the scale bar represents probabilities of change from one amino acid to another in terms of a unit, which is an expected 1% change between two amino acid sequences. Stylin-01 proteins form a cluster shaded with Ap_ACYPI003649, Mp_000086060, and Dn_XP015379180.

Based on these results, it is impossible to conclude about the relative contribution of Stylin-01 or Stylin-02 to the strong labeling at the surface of the acrostyle observed with anti-1-11.

Stylin-01 and Stylin-02 are conserved among aphid species. A comparative analysis was conducted on Stylin-01 and Stylin-02 homologs found in several aphid

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on June 29, 2018 by guest

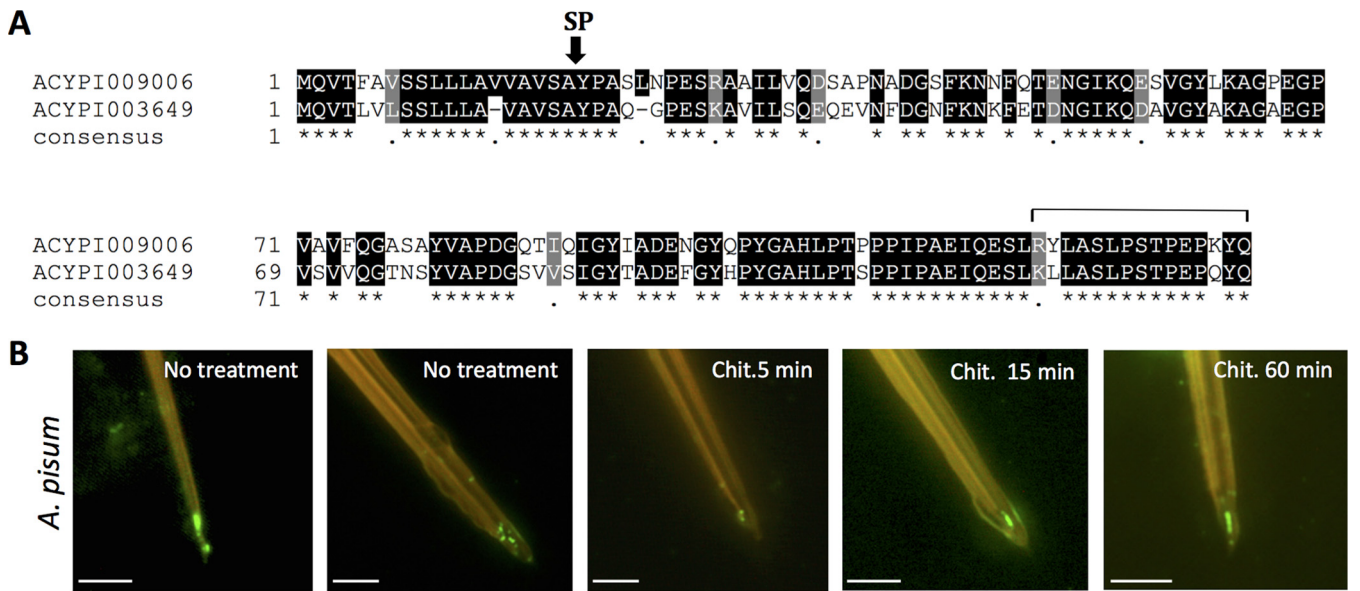


FIG 3 ACYPI003649, a second RR-1 protein identified in the acrostyle. (A) Alignments of Ap_ACYPI009006 (Ap_Stylin-01) and Ap_ACYPI003649 were performed using T-Coffee software (66, 67). Shading was done with BOXSHADE 3.21 software. Identical residues are shaded in black; similar residues are shaded in gray. The consensus sequence is shown at the bottom, with periods indicating conserved substitutions and asterisks indicating identities. The signal peptide (SP) cleavage site is indicated. The line above the sequence delineates peptide 1-11. (B) Immunolabeling of *A. pisum* stylets with anti-1-07 antibody. Scale bars represent 5 μm.

species (see Fig. S1A and B in the supplemental material), through BLAST searches or direct sequencing of aphid colonies maintained in our laboratory (accession numbers are given in Table S1 in the supplemental material). For both proteins, high sequence similarities were found across aphid species, with the RR-1 chitin-binding domain being almost identical. Remarkably, the amino acid sequences of the C-terminal domains were nearly identical in Stylin-01 and Stylin-02 (containing peptide 1-11) in all aphid species investigated.

CaMV-P2 and anti-1-11 compete for binding to the acrostyle. The coinubation of dissected stylets of *A. pisum* with P2 fused to green fluorescent protein (P2-GFP) and anti-1-11 antibody (detected with Alexa-594 conjugated secondary antibodies) indicated a near-perfect colocalization of their respective target (Fig. 4A).

When stylets of *A. pisum* were preincubated with the viral protein P2 or derivative fusions (P2-GFP and an N-terminal 6-histidine tag fusion, HP2), the subsequent binding of anti-1-11 antibody onto the acrostyle was significantly reduced or abolished compared to nonbinding pretreatment controls (Sf9 cell crude extracts or the acrostyle-nonbinding P2Rev5 mutant [9]) (Fig. 4B). Consistently, but to a lesser extent, this occurred in a reversed-competition experiment, when stylets of *A. pisum* were preincubated with anti-1-11 the subsequent binding of P2-GFP fusion was similarly hindered, whereas nonbinding pretreatment controls (blocking solution or anti-CMV, an antibody unrelated to aphid proteins) had no effect (Fig. 4C).

Taken together, these results demonstrate that the viral protein P2 and the specific anti-1-11 antibody compete *in vitro* for binding to the acrostyle.

Silencing of Mp_Stylin-01 gene expression decreases CaMV transmission efficiency. The impact of Stylin-01 and Stylin-02 on CaMV transmission efficiency was investigated using RNAi-mediated silencing on the vector species *M. persicae*. When cohorts of first-instar nymphs were fed with small interfering RNAs targeting specifically *stylin-01* transcripts (*Sty01*-siRNA), their accumulation was significantly reduced (by 66.1%) compared to that in cohorts of nymphs fed with a negative-control siRNA (NC-siRNA; Fig. 5A). Interestingly, *Sty01*-siRNA-treated aphids transmitted CaMV at a significantly lower rate (reduced by 40%) than did aphids fed with NC-siRNA (Fig. 5B).

When aphids were fed on artificial diets containing siRNA that specifically target *stylin-02* transcripts (*Sty02*-siRNA), their accumulation was also significantly reduced (by

Downloaded from <http://jvi.asm.org/> on June 29, 2018 by guest

TABLE 2 Specificities of anti-1-01, anti-1-11, and anti-1-07 antibodies assessed by dot blot analyses on peptides originating from proteins closely related to ACYPI009006 and ACYPI003649^a

Antibody ID	Peptide used for antibody production	<i>A. pisum</i> protein ID	Peptide sequence (spot)	Dot Blot detection	Labeling intensity
Anti-1-01	ILVQDSAPSADGSLK	ACYPI009006	YPASLNPEsRAAILVQDS		++
		ACYPI009006	QDSAPNADGSFKNNFQTEN		++
		ACYPI003649	YPAQGPEsKAVILsQEQE		-
		ACYPI003649	SQEQEVNFDGNFKNFET		-
		ACYPI001610	QQFQPTTPIPIVRYENDG		-
		ACYPI001610	ENDGVNFDGSYKWAYETG		-
		ACYPI006276	RDGNKQLPVLIMHKQALQ		-
		ACYPI006276	ALQEDGGFQYFAADNGL		-
Anti-1-07	SQEQEVNFDGNFKNK	ACYPI009006	YPASLNPEsRAAILVQDS		-
		ACYPI009006	QDSAPNADGSFKNNFQTEN		-
		ACYPI003649	YPAQGPEsKAVILsQEQE		+
		ACYPI003649	SQEQEVNFDGNFKNFET		++
		ACYPI001610	QQFQPTTPIPIVRYENDG		-
		ACYPI001610	ENDGVNFDGSYKWAYETG		-
		ACYPI006276	RDGNKQLPVLIMHKQALQ		-
		ACYPI006276	ALQEDGGFQYFAADNGL		-
Anti-1-11	RYLASLPSTPEPKYQ	ACYPI009006	ESLRYLASLPSTPEPKYQ		++
		ACYPI003649	ESLKLASLPSTPEPKYQ		++
		ACYPI001610	PPPLPPAIAKLLQFLATQ		-
		ACYPI001610	QFLATQSTPEPAYNKIK		-
		ACYPI006276	PKAPVSVVPLQQSSAPA		-
		ACYPI006276	APAYVSPSPSGRSLAKNR		-

^a-, no labeling; +, weak labeling; ++, strong labeling.

27.6%) compared to that in cohorts of nymphs fed with NC-siRNA (Fig. 5C). However, in that case, the decrease in *stylin-02* mRNA did not lead to a significant change in CaMV transmission efficiency (Fig. 5D).

Therefore, even though both *stylin-01* and *stylin-02* transcript levels were significantly reduced, only *Stylin-01*-silenced aphids showed a significant decrease in their ability to transmit CaMV.

While these results suggest that reducing the *stylin-01* mRNA level may have a direct impact on CaMV transmission by decreasing the amount of *Stylin-01* protein in aphid stylets, the above-described experiments do not exclude a possible indirect effect of silencing on aphid feeding behavior and therefore on virus acquisition. The probing behavior of aphids was monitored to assess a potential effect of *Stylin-01* silencing on the duration of intracellular punctures (potential drop waveforms [pds]) on CaMV-infected turnips. It is known that intracellular punctures are mandatory for the acquisition of CaMV and that their duration is positively correlated with the efficacy of ulterior transmission (32). Remarkably, over more than 500 recorded potential drops for silenced and for nonsilenced aphid cohorts, the mean durations of intracellular punctures were nearly identical, with respective averages (means \pm standard errors of the means [SEMs]) of 3.96 ± 1.32 s and 3.91 ± 1.76 s (Fig. 5E), indicating that *Stylin-01* mRNA depletion does not impact on this trait closely linked to virus transmission.

During these experiments, after successfully completing 5 pds, each aphid was individually transferred to healthy turnip plants to check their virus transmission ability. It is noteworthy that CaMV transmission rates were low for all biological replicates under these experimental conditions, reducing the statistical power of our test. Nevertheless, a consistent trend of 50 to 100% reduction of CaMV transmission efficiency was observed in the experimental repeats for *Stylin-01*-silenced aphids (Fig. 5F).

A logical way to explain that silencing of *Stylin-01* decreases CaMV transmission is that it decreases the binding of P2 onto the acrostyle. For practical reasons, such

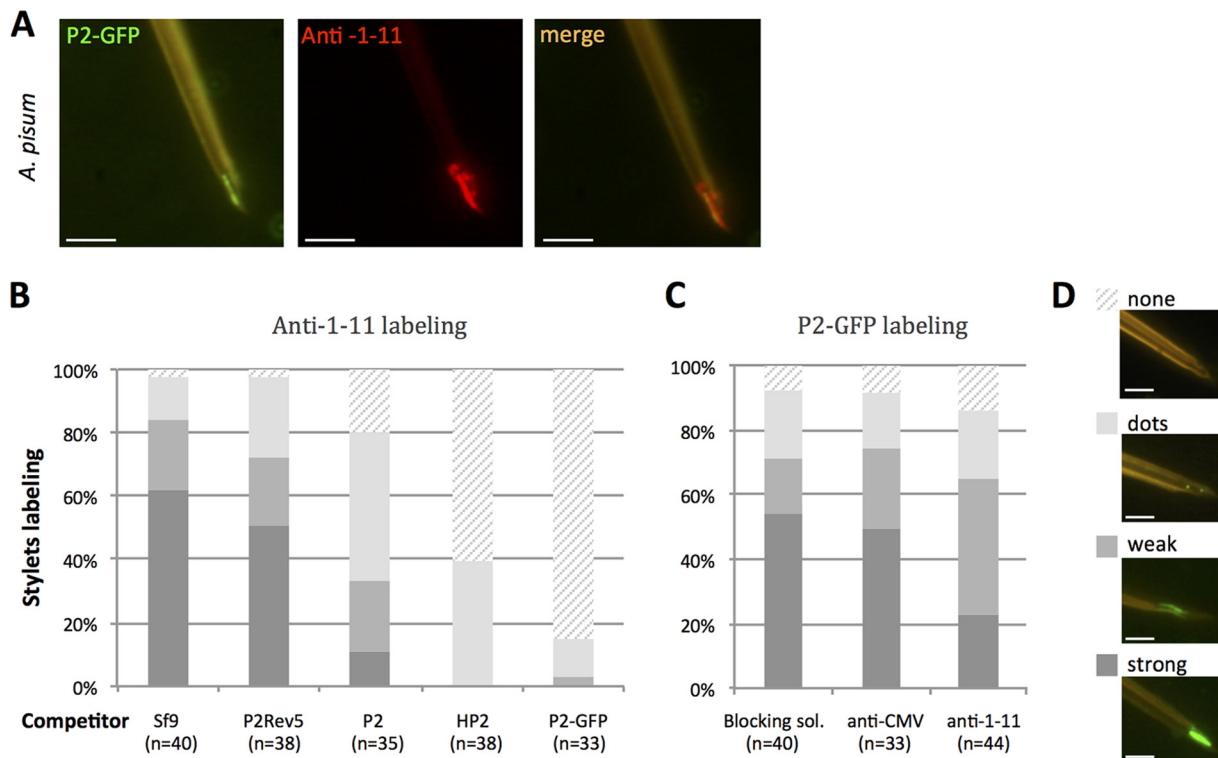


FIG 4 CaMV protein P2 and anti-1-11 IgGs colocalize in and compete for the acrostyle. (A) Coincubation of P2-GFP and anti-1-11 antibody with *A. pisum* dissected stylets. P2-GFP (green fluorescence) and anti-1-11 antibody (red fluorescence) colocalize on the acrostyle (seen as orange labeling). (B) Histograms show the proportion of maxillary stylets with the acrostyle labeled by anti-1-11 antibody from 4 independent experiments, after preincubation with crude extracts from healthy Sf9 cells (Sf9), from Sf9 cells producing P2, P2Rev5 mutant, P2-GFP fusions, or purified His tag-P2 (HP2), as indicated. While no significant difference was observed in the intensity of anti-1-11 labeling after Sf9 or P2Rev5 preincubation (one-way ANOVA, $P = 0.779$), the proportion of stylets strongly labeled was significantly reduced when P2, P2-GFP, and HP2 were used as competitors (one-way ANOVA, $P = 2.27 \times 10^{-5}$). (C) Histograms show the proportion of maxillary stylets with the acrostyle labeled by P2-GFP from 4 independent experiments, after preincubation with blocking solution containing no antibody, anti-CMV as a negative control, and anti-1-11 antibodies. The intensity of the labeling observed after preincubation with blocking solution containing anti-1-11 antibodies is reduced compared to that with stylets preincubated with blocking solution or anti-CMV as a negative control. However, this reduction is not significant (ANOVA, $P = 0.0503$). The numbers of maxillary stylets observed for each treatment is indicated as "n." Each labeled stylet counted in panels B and C was scored as strongly, weakly, dot, or not labeled; a representative image illustrating each of these scores is shown in panel D. Scale bars represent 5 μm .

semiquantitative estimates could only be carried out on the larger stylets of *A. pisum*. Silenced *A. pisum* (see Materials and Methods) were scored as in Fig. 4D for intensity of P2-GFP binding. The results obtained from two independent experiments show a strong reduction of P2-GFP binding (Table 3).

DISCUSSION

The identification of virus receptors within their insect vectors is a major challenge faced by virologists studying viruses in both the animal and plant kingdoms. Several candidate proteins have earlier been shown to interact with plant viruses using various approaches, such as far-Western blot (33–38), yeast-two hybrid (39, 40), or genomics, transcriptomics, and proteomics (39, 41–45) approaches. However, their actual role as receptors has proven difficult to validate. To date, the most comprehensive and convincing study concerns *Pea enation mosaic virus* (PEMV; *Luteoviridae*), transmitted by *A. pisum* in a circulative manner. The coat protein of PEMV directly interacts with aminopeptidase N (APN) of the aphid gut cell membrane (46, 47). A pea aphid gut binding peptide, GBP3.1, competes with PEMV for binding to APN and reduces viral accumulation in the aphid hemocoel (46, 48). The authors therefore concluded that APN functions as a gut receptor for PEMV in the pea aphid (47). For stylet-borne noncirculative viruses, the putative receptors are cuticular proteins entangled with the chitin fibers of the stylet (23), a cell-free structure (49), and they are notoriously difficult

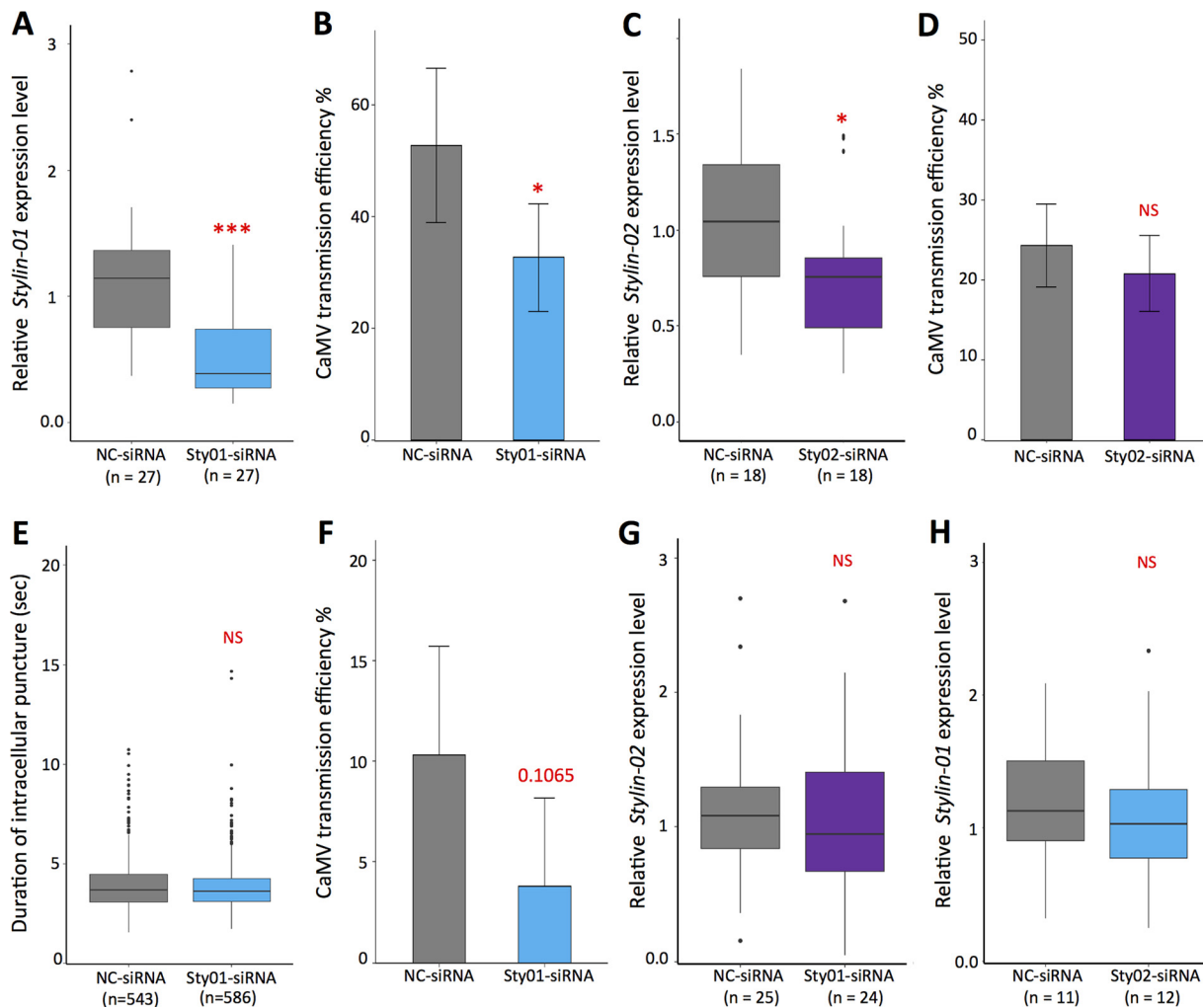


FIG 5 Effects of *stylin-1* and *stylin-2* gene silencing on cauliflower mosaic virus transmission. (A) Box plots represent median (horizontal line) and 25th and 75th percentiles of transcript levels of *stylin-01* normalized against two reference genes, the actin and *EF1 α* genes. The *stylin-01* relative expression level is significantly reduced in *sty01*-siRNA-treated *Myzus persicae* compared to the NC-siRNA group (ANOVA, $n = 27$ pools of 10 aphids each, $P = 8.12 \times 10^{-6}$). (B) Proportion of CaMV-infected plants calculated from two independent experiments (means \pm SDs). For each experiment and for each treatment, two aphids were transferred onto each test plant ($n = 48$) after a 5-min acquisition access period (AAP). The asterisk indicates significant differences between virus transmission efficiencies (chi-square test, $P = 0.016$). (C) Box plots represent *stylin-02* transcript levels normalized against two reference genes, as in panel A. The *stylin-02* relative expression level is significantly reduced (ANOVA, $n = 18$ pools of 10 aphids, $P = 0.0231$). (D) Proportion of CaMV-infected plants calculated from three independent experiments (means \pm SDs). For each experiment and for each treatment, as for panel B, we used two aphids per test plant ($n = 72$). No significant difference was observed between virus transmission efficiencies (chi-square test, $P = 0.473$). (E) Boxes showing the interquartile and the median represent the mean duration of intracellular punctures (pds) produced on CaMV-infected turnip plants by *M. persicae* fed for 72 h on NC-siRNA ($n = 543$) or *sty01*-siRNA ($n = 582$). No significant difference was observed between the two treatments (ANOVA, $P = 0.574$). (F) Proportion of CaMV-infected plants calculated from five independent experiments (means \pm SDs). For each experiment repeat and each treatment, a single aphid was transferred per test plant ($n = 22$) after an AAP of 5 pds. The P value (chi-square test) reflecting a marginally significant difference between the two treatments is indicated on the graph. Black circles in panels A, C, and E are outliers. (G and H) Controls demonstrate that *Sty01*-siRNA and *Sty02*-siRNA do not silence *stylin-02* (G) and *stylin-01* (H), respectively. The specificity of silencing of *Sty01*-siRNA was estimated from 25 and 24 pools (for NC-siRNA and *Sty01*-siRNA, respectively) out of the 27 pools used for panel A and from 11 and 12 pools (for NC-siRNA and *Sty02*-siRNA, respectively) out of the 18 pools used for panel C. Asterisks in panels A and C indicate differences as follows: ***, $P < 0.001$, and *, $P < 0.05$. NS, not significant.

to extract. Such a technical hurdle has long obstructed the elucidation of the molecular dialogue between noncircular viruses and their insect vectors.

Here we identify two proteins in the aphid stylets, and more generally in arthropod mouthparts, *Stylin-01* and *Stylin-02*. These proteins share more than 70% identity and have nearly identical C-terminal domains. They are conserved at least in the subfamilies *Aphidinae*, *Lachninae*, and *Eriosomatinae*, the *Aphidinae* subfamily being the one in which almost all vectors of noncircular viruses have been described (50). While

TABLE 3 P2-GFP labeling of dissected stylets of *Acyrtosiphon pisum* silenced for *stylin-01* gene expression

RNAi treatment	P2-GFP labeling ^a				
	Strong	Weak	Dots	None	Total
NC-siRNA	19 (79.2)	4 (16.6)	0 (<4.2)	1 (4.2)	24 (100)
Sty01-siRNA	1 (6.7)	0 (<6.7)	0 (<6.7)	14 (93.3)	15 (100)

^aThe percentage of maxillary stylets labeled out of the total number of maxillary stylets observed is indicated in parentheses.

anti-1-08 and anti-1-09 did not label aphid stylets under our experimental conditions, probably due to a lack of accessibility of the corresponding peptides within the superficial layers of the stylet cuticle, we extended the list of the peptides successfully detected within the acrostyle (23, 31). Although we could not distinguish whether Stylin-01, Stylin-02, or both actually display their conserved C termini at the surface of the cuticle, our immunolabeling approach definitely demonstrated that the C-terminal protein domain revealed by anti-1-11 covers all the surface of the acrostyle. It is thus in contact with ingested plant sap and secreted aphid saliva and has the potential to play a key role in virus retention and release.

RNAi-mediated interference in aphids has been attempted in several studies (51, 52). The efficacy of silencing is notoriously highly variable and dependent on the gene targeted (52, 53). Unfortunately, a complete knockdown could never be achieved whatever the method and aphid species used and the gene targeted (51). In our study, oral delivery of specific siRNA significantly reduced the expression of the *stylin-01* and, to a lesser extent, *stylin-02* genes. Reducing the expression of Stylin-01 impacted the ability of aphid vectors to transmit CaMV but did not alter the aphid feeding behavior during the probing events associated with virus uptake. Therefore, it is tempting to conclude that Stylin-01 may act as a receptor and bind directly the CaMV helper protein P2. Consistent with this proposition is the demonstration that P2 and the antibody directed against the surface-exposed C terminus of Stylin-01 compete for attachment to the acrostyle. However, other possibilities cannot totally be excluded at this stage. For example, reducing the amount of Stylin-01 protein within aphid stylets could also locally perturb the ultrastructure of the acrostyle, affecting the accessibility of active domains of receptor molecules other than Stylin-01. To definitely confirm that Stylin-01 is the receptor driving CaMV transmission, direct *in vitro* binding to CaMV-P2 would be necessary. Unfortunately, Stylin-01 and Stylin-02 proteins were totally unfolded under the numerous experimental *in vitro* conditions we assessed. It is possible that cuticular proteins fold solely in the presence of chitin-chitosan fibers, in which case *in vitro* binding between Stylin proteins and CaMV-P2 would be extremely difficult to realize, if not impossible.

Our results indicate that in contrast to Stylin-01, Stylin-02 is unlikely to be involved in CaMV transmission, although it may be argued that *stylin-02* knockdown was not effective enough to observe a phenotype. We can speculate that Stylin-02 is less abundant within the acrostyle. Reducing its amount in aphid stylets may, then, affect only partially the function of the acrostyle, and we could not detect any defect of the silenced aphid in CaMV transmission. Another hypothesis relies on the few differences in amino acid composition between the Stylin-01 and Stylin-02 C-terminal domains. Investigating whether these subtle differences could explain the lack of effect of Stylin-02 on CaMV transmission will require a technical means (not yet defined) to distinguish between the C-terminal domains of these proteins.

Recently, Liang and Gao (54) reported a positive interaction in the yeast-two-hybrid system between the coat protein of a noncirculative virus, *Cucumber mosaic virus* (CMV; isolate SXCH [GenBank JX993913]), and Mpcp4 of their *M. persicae* colony from south-eastern China. Mpcp4 was first identified in 2007 by Dombrovsky et al. (37) during a search for extractable cuticular proteins in whole aphids. This protein actually corresponds to the protein we identified in this study as Stylin-01. Liang and Gao (54)

concluded that “Mpcp4 gene promoted CMV acquisition in *M. persicae*,” but a formal demonstration of its role in CMV transmission was not provided to support this conclusion. We here show that Stylin-01 solely emerges at the tip of the maxillary stylets, in the acrostyle, and the binding site of CMV to the aphid’s cuticle has not been precisely localized. We have thus far failed to attach this virus to the acrostyle, despite a large range of conditions tested, and so whether Stylin-01 is involved in the transmission of CMV remains an open question. Likewise, and more generally, whether Stylin-01 and possibly also Stylin-02 are receptors of noncirculative viruses other than CaMV will need further investigations.

In this report, we provide new insight into the proteomic composition of the acrostyle and, for the first time, key information on its surface composition, which may lead to a better understanding of its functions. In addition to the previously reported RR-2 protein(s) (23, 31), we show that the acrostyle contains two RR-1 proteins, Stylin-01 and Stylin-02. Our *in vitro* competition and *in vivo* silencing approaches strongly support the role of Stylin-01 as the receptor of CaMV. Moreover, beyond the case of the transmission of CaMV by aphid vectors, we here illustrate the potential complexity of the acrostyle at the virus-vector and plant-insect interface and provide an efficient method to further search and characterize all proteins emerging at the surface of arthropod mouthparts. It must be noted that these proteins are of interest for the transmission of all noncirculative viruses that sum up to hundreds of species of major economic importance.

MATERIALS AND METHODS

Aphid clones. All aphid colonies were maintained in growth chamber at 23/18°C (day/night), with a photoperiod of 16/8 h (day/night). *Acyrtosiphon pisum* LL01 and *Myzus persicae* Sulzer were maintained on *Vicia faba* cv. Aguadulce, and on *Solanum melongena* cv. Barbentane, respectively.

Antibodies. Antibodies used in the present study were produced against peptides originating from cuticular proteins of the CPR family of *M. persicae* and/or *A. pisum* (Table 1), proteins from the CPR family having high degrees of identity between orthologs in these two aphid species (30). Peptides synthesized by Eurogentec (Kanaka Eurogentec S.A., Seraing, Belgium) were used to immunize rabbits. Antisera were collected and purified on the peptides used for immunization. Primary antisera were used at dilutions of 1:200 for immunolabeling of stylets and 1:1,000 for Western blot analyses. Secondary antibodies Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit IgG (A11070 and A11012; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) were used at a dilution of 1:800, goat anti-rabbit (GAR) IgG-horseradish peroxidase (HRP) (sc-2030; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) was used at a dilution of 1:5,000, and 10-nm colloidal gold-conjugated GAR IgG (BBI Solutions, Cardiff, UK) was used at a dilution of 1:25. Polyclonal *Cucurbitur mosaic virus* (CMV) antibodies (CAB 44501/0500; Agdia Inc., Elkhart, IN) were used at a dilution of 1:200 in competition experiments.

Protein production. The P2 helper protein of CaMV (isolate Cabb B-JI), either native or fused to green fluorescent protein at its C terminus (P2-GFP), and the nontransmissible P2Rev5 derivative mutant (55) were expressed in the Sf9 baculovirus/insect cell system as previously described (9). Insect cells harvested 48 h after infection with a baculovirus recombinant were resuspended in DB5 buffer (50 mM HEPES (pH 7.0), 500 mM LiSO₄, 0.5 mM EGTA, 0.2% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)). Cells were lysed by freeze-thaw cycling at –20°C. Cellular debris was removed by centrifugation. Alternatively, P2 fused to a hexahistidine N-terminal tag (HP2) was also produced and was affinity purified on nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin as described previously (56). Aliquots of 50 μl of crude extracts or purified proteins were kept at –20°C until use.

Peptide dot blot analyses. Peptides of 18 amino acids, comprising either the N termini (mature proteins) or the C termini of Ap_ACYPI009006, Ap_ACYPI003649, Ap_ACYPI001610, and Ap_ACYPI006276, were synthesized by Proteomic Solutions (Saint-Marcel, France). Peptides were detected by Western blot analysis using anti-1-01, anti-1-07, or anti-1-11 antibodies.

***In vitro* interactions on dissected individualized stylets.** Individualized *M. persicae* and *A. pisum* stylets were immunolabeled according to the methods of Uzest et al. (23) and Webster et al. (31). Dissected stylets preincubated in blocking solution (TBS buffer [50 mM Tris and 200 mM NaCl, pH 7.4] supplemented with 1% [wt/vol] skim milk powder and 0.05% [vol/vol] Tween 20) for 20 min were incubated in primary antibodies for 14 h, followed by 4 h of incubation in secondary Alexa Fluor-conjugated antibody at room temperature. In addition, stylets were pretreated with 2 U/ml of chitinase from *Streptococcus griseus* (Sigma) in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) at room temperature. Alternatively, stylets were incubated with 5 μl of P2-GFP crude extracts along with the primary anti-1-11 antibody for colocalization experiments, followed by secondary antibody incubations as described above.

A series of sequential incubations onto dissected stylets was done using the baculovirus/Sf9 cell-produced viral proteins P2, P2Rev5, HP2, and P2-GFP as primary interacting molecules. A crude extract of healthy Sf9 cells was included as a negative control. Twenty microliters of these primary interacting molecules was incubated for 14 h in modified DB5 buffer (DB5-0.05 containing 0.05% [wt/vol]

CHAPS [final concentration]). Slides were rinsed once in DB5-0.05 buffer and twice in TBS buffer. Stylets were incubated in anti-1-11 primary antibody as described above for 1 h. The secondary antibody used to reveal the presence of anti-1-11 on the stylets was Alexa Fluor 594-conjugated antibody when P2-GFP was used as the primary interacting molecule; Alexa Fluor 488-conjugated antibody was used for all other experiments. The incubation time was also reduced to 1 h. A second series of sequential incubations onto dissected stylets was performed using anti-1-11 antibody as the primary interacting molecule. In this case, the blocking solution alone, or the blocking solution containing a serum unrelated to aphid proteins (anti-CMV), was used as a negative control. Incubation was followed by one rinse with TBS buffer and two rinses with DB5-0.05 buffer. Stylets were finally incubated with 5 μ l of P2-GFP crude extracts in DB5-0.05 for 2 h. Four independent replicates were performed for each experiment and for all treatments. Observations were done with an Olympus BX60 microscope equipped for epifluorescence.

Sample preparation for electron microscopy and immunogold labeling. The anterior parts of anesthetized *A. pisum* heads were severed in fixation buffer (FB; 0.1 M cacodylate buffer [pH 7.2]) under a dissecting microscope using razor blades. Samples were fixed in FB containing 0.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde and embedded in LR Gold resin. Primary antisera and secondary antibodies were used at a 1:25 dilution. Sections (60 nm thick) were observed in a JEOL 100CXII microscope operated at 60 to 80 kV.

RNA interference. As stylets are deprived of cells, RNAi treatments were applied at earlier larval stages and expected phenotypes were evaluated after stylet *de novo* synthesis, i.e., after at least one molting event from the start of short interfering RNA (siRNA) delivery. RNAi treatments were carried out on 3-day-old synchronized *M. persicae* aphids. Since *stylin-01* and *stylin-02* genes share 74% identity, we paid particular attention while designing short interfering RNAs to specifically target one or the other gene (Kanaka Eurogentec S.A.). Negative control siRNA (NC-siRNA; SR-CL000-005, Eurogentec), siRNA targeting specifically *stylin-01* mRNA (*Sty01*-siRNA; sequences are described in Table S2 in the supplemental material), or siRNA targeting specifically *stylin-02* mRNA (*Sty02*-siRNAa and *Sty02*-siRNAb; sequences are described in Table S2 in the supplemental material) were orally delivered for 72 h at 24°C through a Parafilm membrane sachet containing a final concentration of siRNAs of 1 μ M in 300 μ l of sterilized artificial diet (0.5 \times AP3 medium [57] supplemented with 20% sucrose). All experimental settings were first determined during *stylin-01* knockdown experiments. To analyze the relative *stylin-01* expression levels, 2 to 4 pools of 10 aphids were collected for each treatment. This experiment was repeated 9 times. In total, 27 pools of 10 aphids were analyzed for NC-siRNA and *sty01*-siRNA treatments. For 2 of these 9 replicates, aphids were additionally collected to perform CaMV transmission tests. To analyze the relative *stylin-02* expression levels, 6 pools of 10 aphids were collected for each treatment, and 3 replicates were performed (in total, 18 pools of 10 aphids were analyzed for each treatment). In all replicates, aphids were additionally collected to perform CaMV transmission tests.

In addition, and to estimate whether silencing of *Stylin-01* reduces P2 binding onto the acrostyle, RNAi treatments were carried out on 3-day-old synchronized *A. pisum* using the protocol set up for *M. persicae* (see above). A final concentration of 2 μ M siRNA was used, and two independent experiments were performed. Stylets of control and silenced aphids were dissected and incubated with P2-GFP as described above.

Real-time RT-qPCR. Total RNA was extracted from pools of 10 aphids using an RNeasy minikit (Qiagen, Hilden Germany). A total of 100 to 400 ng of the total RNA extracted was treated with RQ1 RNase-free DNase I (Promega Corporation, Madison, WI). First-strand cDNA was synthesized using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega Corporation) according to the manufacturer's instructions, with oligo(dT)₁₈ as the primer. Real-time reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on a LightCycler 480 instrument using a LightCycler 480 SYBR green I master mix (Roche, Penzberg, Germany) according to the manufacturer's recommendations with gene-specific primers (listed in Table S2 in the supplemental material). Expression levels were normalized with two internal reference genes encoding actin and elongation factor 1 α (EF1 α) from *M. persicae* (58). RT-qPCRs were performed in duplicates. Amplification efficiencies were analyzed with LinRegPCR free software (v. 2014.5) (59). Expression ratios were calculated using the threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (60).

Transmission tests. Cohorts of aphids fed for 72 h on artificial diets supplemented with siRNA were collected and starved for 1 h in glass tubes. They were allowed a 5-min acquisition access period (AAP) on CaMV-infected turnips (*Brassica rapa* cv. Just Right) 23 days postinoculation, followed by a 2-h inoculation access period (IAP) on 8-day-old turnip test plants, before insecticide spray was applied. In *Stylin-01* silencing experiments, 2 biological replicates were performed using 2 aphids per test plant and 48 test plants per treatment. In *Stylin-02* silencing experiments, 3 biological replicates were performed using 2 aphids per test plant and 72 test plants per treatment. Transmission efficiency was calculated by recording the number of plants presenting symptoms of virus infection 28 days after transmission assay divided by the total number of test plants per treatment. Alternatively, in the case of *Stylin-01* silencing experiments, cohorts of aphids fed on artificial diets supplemented with NC-siRNA or *Sty01*-siRNA were collected and attached to a gold wire as previously described (61). Aphids were transferred to CaMV-infected turnip plants after a 1-h starvation period. The aphid feeding behavior was monitored by electrical penetration graphs using an EPG Giga-8 device (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands) connected to a USB AD (DI-710; DATAQ Instruments) and a laptop computer. After five intracellular punctures (named as potential drop pattern [pd]), each aphid was transferred to an 8-day-old turnip test plant for a 2-h IAP (1 aphid per plant). Twenty-two aphids were used for each treatment, and the experiment was repeated 5 times. Duration of each pd was analyzed using Stylet+ software (EPG Systems [62]).

Database searches and sequence retrieval. For annotating RR-1 cuticular proteins in the genome of *Diuraphis noxia* (63), we used CutProtFam-Pred (<http://aias.biol.uoa.gr/CutProtFam-Pred/> [29]), with the standard settings proposed by the web interface (see Table S3 in the supplemental material). An exhaustive search in *Aphididae* family was performed with the BLAST programs (64) in the NCBI's (NR, TSA, and SRA) databases and Aphibase (available at <http://www.aphibase.com/>), using *A. pisum* ACYPI009006 (Stylin-01) and *A. pisum* ACYPI003649 (Stylin-02) as query sequences. Predicted translation of each full-length or partial retrieved sequence was checked for the presence of the conserved RR-1 motif (GSYSYTxPDGxxYxVxYVAD-ENGFQPxGxHLP) using CuticleDB software (<http://biophysics.biol.uoa.gr/cuticleDB/> [65]). All protein sequence analyses (predicted translation and signal peptide searches) were performed using ExPASy tools (<http://www.expasy.org/tools/>).

Alignments and phylogenetic reconstruction of the RR-1 family. Stylin-01 and Stylin-02 homologs were aligned using T-Coffee (66, 67). Phylogenetic relationships between *A. pisum*, *M. persicae*, and *D. noxia* RR-1 proteins were assessed using the Phylogeny.fr platform (68). After removal of the signal peptide, protein sequences of RR-1 genes of *A. pisum*, *M. persicae*, and *D. noxia* were aligned using MUSCLE (v. 3.8.31) (69) configured for highest accuracy (MUSCLE with default settings). Ambiguous regions (i.e., containing gaps and/or poorly aligned) were removed with Gblocks (v. 0.91b) using the following parameters: the minimum length of a block after gap cleaning was 10, no gap positions were allowed in the final alignment, all segments with contiguous nonconserved positions bigger than 8 were rejected, and the minimum number of sequences for a flank position was 85%. Then phylogenetic trees were reconstructed using the maximum likelihood method implemented in the PhyML program (v. 3.1/3.0 aLRT). The WAG substitution model was selected assuming an estimated proportion of invariant sites (of 0.009) and 4 gamma-distributed rate categories to account for rate heterogeneity across sites. The gamma shape parameter was estimated directly from the data ($\gamma = 3.517$). Reliability for internal branch was assessed using the aLRT test (SH-Like). Graphical representation and edition of the phylogenetic tree were performed with TREEDYN (v. 198.3) (70). OrthoMCL software (<http://orthomcl.org/orthomcl/>) was run on predicted RR-1 protein sets from *A. pisum*, *M. persicae*, and *D. noxia* in order to determine putative orthologs (71).

Statistical analysis. All statistical analyses were carried out with R software (v. 3.3.2). Statistical significance for transcript levels and mean duration of potential drop waveforms was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA), and CaMV transmissions were compared by performing a chi-square test. Results of each statistical test are indicated in the figure legends.

Accession number(s). Stylin-01 sequences from aphid clones maintained in our laboratory have been deposited in GenBank under accession numbers [MG188739](#) to [MG188743](#).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 4.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Le Blaye, B. Cayrol, and A. Morisset for technical assistance and J. L. Macia for aphid rearing. We are grateful to K. Gaget for her help with the RNAi experimental design.

This work was supported by Region LR grant Chercheuse d'Avenir 2011, a grant from the Bill & Melinda Gates Foundation (GCEag, OPP1130147), the French National Research Agency (ANR15-CE20-0011), and funding from the Plant Health and Environment Division of INRA.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Kennedy JS, Day MF, Eastop VF. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, United Kingdom.
- Harris KF. 1977. An ingestion-egestion hypothesis of non circulative virus transmission, p 166–208. In Harris KF, Maramorosch K (ed), *Aphids as virus vectors*. Academic Press, New York, NY.
- Hogenhout SA, Ammar El-D, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46:327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>.
- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333:524–538. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.04.001>.
- Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479:278–289. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>.
- Uzest M, Blanc S. 2016. Molecular mechanisms involved in noncirculative virus-vector interactions, p 59–72. In Brown J (ed), *Vector-mediated transmission of plant pathogens*. APS Press, St. Paul, MN.
- Wang RY, Ammuar ED, Thornbury DW, Lopez-Moya JJ, Pirone TP. 1996. Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *J Gen Virol* 77: 861–867. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-5-861>.
- Martin B, Collar JL, Tjallingii WF, Fereres A. 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J Gen Virol* 78:2701–2705. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2701>.
- Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hebrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres

- A, Blanc S. 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104>.
10. Blanc S, Drucker M, Uze M. 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev Phytopathol* 52:403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>.
 11. Murant AF, Roberts IM, Elnagar S. 1976. Association of virus-like particles with the foregut of the aphid *Cavariella aegopodii* transmitting the semi-persistent viruses anthriscus yellows and parnash yellow fleck. *J Gen Virol* 31:47–57. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-31-1-47>.
 12. Killiny N, Harper SJ, Alfaress S, El Mohtar C, Dawson WO. 2016. Minor coat and heat shock proteins are involved in the binding of citrus tristeza virus to the foregut of its aphid vector, *Toxoptera citricida*. *Appl Environ Microbiol* 82:6294–6302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-16>.
 13. Blanc S, Uze M, Drucker M. 2011. New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Curr Opin Microbiol* 14:483–491. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.008>.
 14. Ng JC, Falk BW. 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44:183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>.
 15. Megahed ES, Pirone TP. 1966. Comparative transmission of cucumber mosaic virus acquired by aphids from plants or through a membrane. *Phytopathology* 56:1420–1421.
 16. Ng JC, Perry KL. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* 5:505–511. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>.
 17. Weber KA, Hampton RO. 1980. Transmission of two purified carlaviruses by the pea aphid. *Phytopathology* 70:631–633. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-631>.
 18. Govier DA, Kassanis B. 1974. A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations. *Virology* 61:420–426. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90278-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90278-5).
 19. Govier DA, Kassanis B, Pirone TP. 1977. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78:306–314. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90101-5).
 20. Thornbury DW, Hellman GM, Rhoads RE, Pirone TP. 1985. Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* 144: 260–267. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90322-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90322-8).
 21. Pirone TP, Blanc S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34:227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.227>.
 22. Powell G. 2005. Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *J Gen Virol* 86:469–472. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80632-0>.
 23. Uze M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevielle C, Cot D, Blanc S. 2010. The “acrostyle”: a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 39:221–229. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.02.005>.
 24. Rebers JE, Riddiford LM. 1988. Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J Mol Biol* 203:411–423. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90009-5).
 25. Willis JH. 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol* 40:189–204. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.02.001>.
 26. Andersen SO, Hojrup P, Roepstorff P. 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 25:153–176. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(94\)00052-J](https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)00052-J).
 27. Andersen SO. 2000. Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem Mol Biol* 30:569–577. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00029-1).
 28. Gallot A, Rispé C, Leterme N, Gauthier JP, Jaubert-Paussamaï S, Tagu D. 2010. Cuticular proteins and seasonal photoperiodism in aphids. *Insect Biochem Mol Biol* 40:235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.001>.
 29. Ioannidou ZS, Theodoropoulou MC, Papandreou NC, Willis JH, Hamodrakas SJ. 2014. CutProtFam-Pred: detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile hidden Markov models. *Insect Biochem Mol Biol* 52:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.06.004>.
 30. Mathers TC, Chen Y, Kaithakottil G, Legeai F, Mugford ST, Baa-Puyoulet P, Bretaudeau A, Clavijo B, Colella S, Collin O, Dalmay T, Derrien T, Feng H, Gabaldon T, Jordan A, Julca I, Kettles GJ, Kowitzanich K, Lavenier D, Lenzi P, Lopez-Gomollon S, Loska D, Mapleson D, Maumus F, Moxon S, Price DR, Sugio A, van Munster M, Uze M, Waite D, Jander G, Tagu D, Wilson AC, van Oosterhout C, Swarbrick D, Hogenhout SA. 2017. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biol* 18:27. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1145-3>.
 31. Webster CG, Thillier M, Piroles E, Cayrol B, Blanc S, Uze M. 2017. Proteomic composition of the acrostyle: novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions. *Insect Sci* 24: 990–1002. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12469>.
 32. Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A, Fereres A. 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol* 83:3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163>.
 33. Kikkert M, Meurs C, van de Wetering F, Dorfmüller S, Peters D, Kormelink R, Goldbach R. 1998. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology* 88:63–69. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.1.63>.
 34. Bandla MD, Campbell LR, Ullman DE, Sherwood JL. 1998. Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* 88:98–104. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.2.98>.
 35. Li C, Cox-Foster D, Gray SM, Gildow FE. 2001. Vector specificity of barley yellow dwarf virus (BYDV) transmission: identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*. *Virology* 286:125–133. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0929>.
 36. Seddas P, Boissinot S, Strub JM, Van Dorsselaer A, Van Regenmortel MH, Pattus F. 2004. Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* 325:399–412. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.05.014>.
 37. Dombrovsky A, Gollop N, Chen S, Chejanovsky N, Raccah B. 2007. In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 88:1602–1610. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82769-0>.
 38. Fernández-Calvino L, Goytia E, Lopez-Abella D, Giner A, Urizarna M, Vilaplana L, Lopez-Moya JJ. 2010. The helper-component protease transmission factor of tobacco etch potyvirus binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor. *J Gen Virol* 91:2862–2873. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022335-0>.
 39. Liu W, Gray S, Huo Y, Li L, Wei T, Wang X. 2015. Proteomic analysis of interaction between a plant virus and its vector insect reveals new functions of hemipteran cuticular protein. *Mol Cell Proteomics* 14: 2229–2242. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046763>.
 40. Rana VS, Popli S, Saurav GK, Raina HS, Chaubey R, Ramamurthy VV, Rajagopal R. 2016. A Bemisia tabaci midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. *Cell Microbiol* 18: 663–678. <https://doi.org/10.1111/cmi.12538>.
 41. Li S, Xiong R, Wang X, Zhou Y. 2011. Five proteins of *Laodelphax striatellus* are potentially involved in the interactions between rice stripe virus and vector. *PLoS One* 6:e26585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026585>.
 42. Cilia M, Tamborindeguy C, Fish T, Howe K, Thannhauser TW, Gray S. 2011. Genetics coupled to quantitative intact proteomics links heritable aphid and endosymbiont protein expression to circulative polerovirus transmission. *J Virol* 85:2148–2166. <https://doi.org/10.1128/JVI.01504-10>.
 43. Whitfield AE, Rotenberg D, Aritua V, Hogenhout SA. 2011. Analysis of expressed sequence tags from maize mosaic rhabdovirus-infected gut tissues of *Peregrinus maidis* reveals the presence of key components of insect innate immunity. *Insect Mol Biol* 20:225–242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01060.x>.
 44. Tamborindeguy C, Bereman MS, DeBlasio S, Igwe D, Smith DM, White F, MacCoss MJ, Gray SM, Cilia M. 2013. Genomic and proteomic analysis of *Schizaphis graminum* reveals cyclophilin proteins are involved in the transmission of cereal yellow dwarf virus. *PLoS One* 8:e71620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071620>.
 45. Mar T, Liu W, Wang X. 2014. Proteomic analysis of interaction between P7-1 of Southern rice black-streaked dwarf virus and the insect vector reveals diverse insect proteins involved in successful transmission. *J Proteomics* 102:83–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpropt.2014.03.004>.
 46. Liu S, Sivakumar S, Sparks WO, Miller WA, Bonning BC. 2010. A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of Pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. *Virology* 401:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.009>.

47. Linz LB, Liu S, Chougule NP, Bonning BC. 2015. In vitro evidence supports membrane alanyl aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector. *J Virol* 89:11203–11212. <https://doi.org/10.1128/JVI.01479-15>.
48. Chougule NP, Li H, Liu S, Linz LB, Narva KE, Meade T, Bonning BC. 2013. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:8465–8470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222144110>.
49. Parrish WB. 1967. The origin, morphology, and innervation of aphid stylets (Homoptera). *Ann Entomol Soc Am* 60:273–276. <https://doi.org/10.1093/aesa/60.1.273>.
50. Eastop VF. 1983. The biology of the principal aphid vectors, p 115–132. *In* Plumb RT, Tresch JM (ed), *Plant virus epidemiology: the spread and control of insect-borne viruses*. Blackwell Scientific, Oxford, United Kingdom.
51. Kanakala S, Ghanim M. 2016. RNA interference in insect vectors for plant viruses. *Viruses* 8:329. <https://doi.org/10.3390/v8120329>.
52. Mulot M, Boissinot S, Monsion B, Rastegar M, Clavijo G, Halter D, Bochet N, Erdinger M, Brault V. 2016. Comparative analysis of RNAi-based methods to down-regulate expression of two genes expressed at different levels in *Myzus persicae*. *Viruses* 8:316. <https://doi.org/10.3390/v8110316>.
53. Christiaens O, Swevers L, Smagghe G. 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53:307–314. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.014>.
54. Liang Y, Gao XW. 2017. The cuticle protein gene MPCP4 of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) plays a critical role in cucumber mosaic virus acquisition. *J Econ Entomol* 110:848–853. <https://doi.org/10.1093/jee/tox025>.
55. Moreno A, Hebrard E, Uzeit M, Blanc S, Fereres A. 2005. A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. *J Virol* 79:13587–13593. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13587-13593.2005>.
56. Hébrard E, Drucker M, Leclerc D, Hohn T, Uzeit M, Froissart R, Strub J-M, Sanglier S, van Dorselaer A, Padilla A, Labesse G, Blanc S. 2001. Biochemical characterization of the helper component of cauliflower mosaic virus. *J Virol* 75:8538–8546. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.18.8538-8546.2001>.
57. Febvay G, Delobel B, Rahbé Y. 1988. Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can J Zool* 66:2449–2453. <https://doi.org/10.1139/z88-362>.
58. Kang ZW, Liu FH, Tian HG, Zhang M, Guo SS, Liu TX. 2017. Evaluation of the reference genes for expression analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction in the green peach aphid, *Myzus persicae*. *Insect Sci* 24:222–234. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12310>.
59. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>.
60. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
61. Jimenez J, Webster CG, Moreno A, Almeida RPP, Blanc S, Fereres A, Uzeit M. 2017. Fasting alters aphid probing behaviour but does not universally increase the transmission rate of non-circulative viruses. *J Gen Virol* 98:3111–3121. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000971>.
62. Tjallingii WF. 1978. Mechanoreceptors of the aphid labium. *Entomol Exp Appl* 24:531–537.
63. Nicholson SJ, Nickerson ML, Dean M, Song Y, Hoyt PR, Rhee H, Kim C, Puterka GJ. 2015. The genome of *Diuraphis noxia*, a global aphid pest of small grains. *BMC Genomics* 16:429. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1525-1>.
64. Altschul SF, Lipman DJ. 1990. Equal animals. *Nature* 348:493–494.
65. Willis JH, Iconomidou VA, Smith RF, Hamodrakas SJ. 2005. Cuticular proteins, p 79–110. *In* Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (ed), *Comprehensive molecular insect science*, vol 4. Elsevier, New York, NY.
66. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>.
67. Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orbitg M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J-F, Notredame C. 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* 39:W13–W17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr245>.
68. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465–W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>.
69. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
70. Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7:439. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>.
71. Li L, Stoekert CJ, Jr, Roos DS. 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 13:2178–2189. <https://doi.org/10.1101/gr.1224503>.

Supplemental information

Fig. S1: (Comparison of Stylin-01 and Stylin-02 homologs across aphid species)

Table S1 (Accession numbers of the sequences used in the comparisons presented in Figure S1)

Table S2 (List of oligonucleotides used in this study)

Table S3 (List of RR-1 genes of the aphid *Diuraphis noxia* detected using CutProtFam-Pred software)

Figure S1. Comparison of Stylin-01 and Stylin-02 homologs across aphid species.

A comparative analysis was conducted on Stylin-01 and Stylin-02 homologs found in several aphid species (see Table S1 for accession numbers). For this purpose, an exhaustive search in *Aphididae* family was performed with the BLAST programs. In addition, *stylin-01* sequences from aphid clones maintained in our laboratory (*A. pisum* LL01, *Brevicoryne brassicae* L., *A. gossypii* NM1, *M. persicae* Sulzer and *A. craccivora*) were obtained from cDNA amplification using corresponding primers sets (See Table S2). Alignments of Stylin-01 (A) and Stylin-02 (B) homologs were performed using the T-Coffee software (1, 2) and shading was done with BOXSHADE 3.21 software. Consensus sequence is shown at the bottom with (.) indicating conserved substitutions and (*) indicating identities. Signal peptide (SP) cleavage site and RR-1 conserved motif (horizontal line) are indicated.

References

1. **Notredame C, Higgins DG, Heringa J.** 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205-217.
2. **Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitz M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J-F, Notredame C.** 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res* 39:W13-W17.

Table S1. Accession numbers of the sequences used in the comparisons presented in**Figure S1.**

Species	Protein	Accession number
<i>Acyrtosiphon pisum</i> *	Stylin-01	MG188739
<i>Myzus persicae</i> *	Stylin-01	MG188741
<i>Brevicoryne brassicae</i> *	Stylin-01	MG188740
<i>Aphis gossypii</i> *	Stylin-01	MG188742
<i>Aphis craccivora</i> *	Stylin-01	MG188743
<i>Acyrtosiphon kondoi</i>	Stylin-01	FQ996478
<i>Aphis glycines</i>	Stylin-01	SRX 016521
<i>Aphis citricidus</i>	Stylin-01	CD451041.1 USDA-FP_103086
<i>Myzus ascalonicus</i>	Stylin-01	FO026540
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Stylin-01	FQ977098
<i>Rhopalosiphum padi</i>	Stylin-01	FO061799
<i>Essigella californica</i>	Stylin-01	GAZF02055426
<i>Pemphigus spyrothecae</i>	Stylin-01	FO049664
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Stylin-01	GAAF01000507
<i>Diuraphis noxia</i>	Stylin-01	XP015364844 (Aphidbase)
<i>Toxoptera citricida</i>	Stylin-01	CTG_TC131_2-17649192 (Aphidbase)
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Stylin-02	ACYPI003649
<i>Myzus persicae</i>	Stylin-02	MYZPE13164_G006_v1.0_000086060 (Aphidbase)
<i>Aphis gossypii</i>	Stylin-02	GW533866.1
<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	Stylin-02	SRR547988
<i>Essigella californica</i>	Stylin-02	GAZF02033397
<i>Diuraphis noxia</i>	Stylin-02	XP0153379180 (Aphidbase)
<i>Sitobion avenae</i>	Stylin-02	GAPL01028508
<i>Aphis craccivora</i>	Stylin-02	GAJW01000188

* Sequences obtained in the present study from aphid species maintained in our laboratory

Table S2. List of oligonucleotides used in this study.

Primers' name	Use	sequence (5' to 3')	Comments
pGEX-Ap9006Cter_For pGEX- Ap9006Cter_Rev	Cloning	<u>GATCC</u> ccAGATACCTCGCCTCTCTGCCCAGCACCCCCGAACCAAAATACCAGG <u>AATTC</u> CTGGTATTTTGGTTCCGGGGTGCTGGGCAGAGAGGCGAGGTATCTggG	GST-pept 1-11 fusion
pGEX-Ap3649Cter_For pGEX-Ap3649Cter_Rev	Cloning	<u>GATCC</u> ccAAATTATTGGCCTCTCTGCCCAGCACACCCGAACCACAGTACCAGG <u>AATTC</u> CTGGTACTGTGGTTCCGGGTGTGCTGGGCAGAGAGGCCAATAATTTggG	GST-pept Cter ACYPI003649 fusion
Sty01_For Sty01_Rev	cDNA amplification	AATCACAAACACATCGCACTCCG GTGTGGCRGATRATCAATTCGAGG	<i>Stylin-01</i> from <i>A. pisum</i> , <i>M. persicae</i> , <i>B. brassicae</i>
Ag_Sty01_For Ag_Sty01_Rev	cDNA amplification	CAAACGAACAGAAACTCGTCA TTGCGGATAATGGCTGAAGT	<i>Stylin-01</i> from <i>A. gossypii</i> , <i>A. craccivora</i>
qSty01_Mp_For qSty01_Mp_Rev	RT-qPCR RT-qPCR	ACATTTGTGCGTATCGTCATTG GCTGGGTGCTGAATCTT	<i>Stylin-01</i> from <i>M. persicae</i>
qSty02_Mp_For qSty02_Mp_Rev	RT-qPCR RT-qPCR	GGTCGCGTTAGTCTTCTCATCG TGACTTCTTGTCTTGACGCAG	<i>Stylin-02</i> from <i>M. persicae</i>
qEF1 α _Mp_For qEF1 α _Mp_Rev	RT-qPCR RT-qPCR	AAAATGGACAAACCCGTGAA GCTGTATGGTGGTTCCAGTAGAA	<i>EF1-a</i> from <i>M. persicae</i>
qActin_Mp_For qActin_Mp_Rev	RT-qPCR RT-qPCR	CGTTACCAACTGGGACGATATG GGGTTCAATGGAGCTTCTGTAA	<i>Actin</i> from <i>M. persicae</i>
NC-siRNA	Silencing	Reference SR-CL00-005 (Kaneka Eurogentec S.A., Seraing, Belgium)	siRNA duplex negative control
<i>sty01</i> -siRNA sense	Silencing	AUCCCAUUCGAGAUGCAAG (+dTdT)	Targeting <i>stylin-01</i> mRNA from <i>M. persicae</i> .
<i>sty02</i> -siRNAa sense <i>sty02</i> -siRNAb sense	Silencing Silencing	UCCUGCGUCAAGAACAAGA (+dTdT) UUGUCCAGGGAGCAAAUUC (+dTdT)	Targeting <i>stylin-02</i> mRNA from <i>M. persicae</i> .

5' and 3' overhanging sequences of *Bam*HI and *Eco*RI restrictions sites are underlined. Bases added to keep the open reading frame are in lower cases.

Table S3. List of RR-1 genes of the aphid *Diuraphis noxia* detected using CutProtFam-Pred software.

Sequence Name	Family Type	E-value	Score	Previous annotation description*
XP_015364772.1	CPR_RR-1	7.10E-12	38	PREDICTED: foot protein 1 variant 1
XP_015364844.1	CPR_RR-1	3.00E-18	59.2	PREDICTED: endocuticle structural glycoprotein SgAbd-4-like, partial
XP_015365268.1	CPR_RR-1	4.80E-09	28.4	PREDICTED: flexible cuticle protein 12-like
XP_015371382.1	CPR_RR-1	3.70E-08	20	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107167013
XP_015372692.1	CPR_RR-1	5.70E-08	18.3	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107167970
XP_015375796.1	CPR_RR-1	4.70E-14	45.3	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107170242
XP_015378979.1	CPR_RR-1	1.50E-16	53.6	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: larval cuticle protein LCP-30-like
XP_015379180.1	CPR_RR-1	2.20E-21	69.6	PREDICTED: endocuticle structural glycoprotein SgAbd-4-like
XP_015379719.1	CPR_RR-1	2.00E-20	66.4	PREDICTED: paternally-expressed gene 3 protein-like
XP_015379744.1	CPR_RR-1	3.60E-19	62.3	PREDICTED: endocuticle structural glycoprotein ABD-4-like
XP_015379794.1	CPR_RR-1	2.10E-19	63	PREDICTED: endocuticle structural glycoprotein SgAbd-8-like
XP_015379869.1	CPR_RR-1	6.40E-22	71.4	PREDICTED: probable serine/threonine-protein kinase fhkB

* Predicted by NCBI's automated computational analysis derived from genomic sequences (1) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by EST evidence

Reference

1. **Nicholson SJ, Nickerson ML, Dean M, Song Y, Hoyt PR, Rhee H, Kim C, Puterka GJ.** 2015. The genome of *Diuraphis noxia*, a global aphid pest of small grains. *BMC Genomics*, 16: 429 doi: 10.1186/s12864-015-1525-1

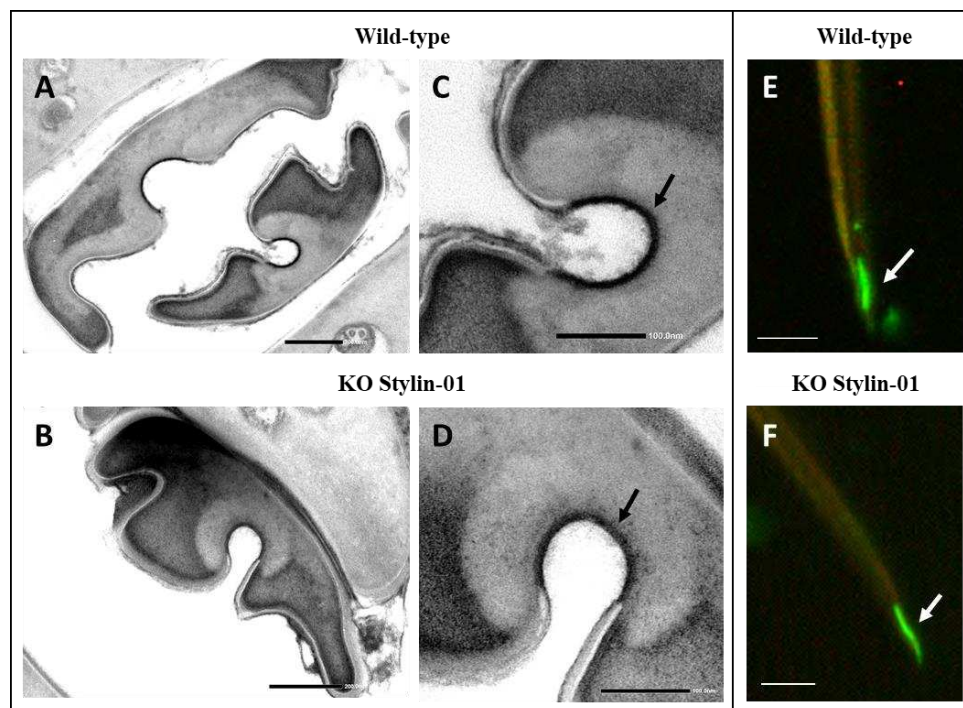


Figure 21. Impact de la mutation KO Stylin-01 sur l'ultrastructure des stylets

A-B) Coupes transversales de stylets maxillaires de pucerons *A. pisum* des lignées WT (**A**) et KO Stylin-01 (**B**) à l'extrémité distale observée, en microscopie électronique à transmission. **C-D)** Agrandissements au niveau de l'acrostyle, indiqué par une flèche noire. Aucune différence en terme de structure n'est visible à cette résolution entre les deux lignées. **E-F)** Incubation de la fusion P2-GFP sur stylets disséqués de pucerons *A. pisum* des lignées WT (**E**) et KO Stylin-01 (**F**), observée en microscopie à épifluorescence. De la fluorescence est observée tout le long du canal commun, indiquant que la protéine virale se lie de manière similaire sur l'acrostyle des lignées WT et KO Stylin-01.

Barres d'échelle : A-B) 200 nm, C-D) 100 nm, E-F) 5 μ m. Clichés B. Cayrol

2.3. Capacité des mutants KO Stylin-01 à transmettre le CaMV

Suite à ces premiers travaux, nous avons obtenu les lignées de pucerons *A. pisum* dont le gène *stylin-01* a été muté. Nous avons choisi de travailler avec la lignée L2, que nous appellerons par la suite « lignée KO Stylin-01 ». Celle-ci nous a semblé particulièrement intéressante car elle a subi de multiples réarrangements au niveau des deux allèles, aux quatre sites ciblés par les ARN guides (voir chapitre 2). Après vérification, la protéine Stylin-01 n'est effectivement plus détectée dans les pucerons, et aucun transcrite *stylin-01* n'a été mis en évidence par PCR. En contrôle, nous avons aussi choisi une lignée non injectée issue du même croisement (lignée WT ou *Wild-type*).

Bastien Cayrol a d'abord observé en microscopie électronique à transmission, les faisceaux de stylets des pucerons appartenant aux deux lignées (**Fig. 21-AD**). Aucune différence claire en terme de structure de la cuticule n'a été mise en évidence, que ce soit au niveau des stylets mandibulaires ou maxillaires, ou encore au niveau de l'acrostyle. Ensuite, les stylets des lignées KO Stylin-01 et WT ont été disséqués et incubés avec la fusion P2-GFP : nous n'avons pas noté de différence d'accrochage de la protéine virale (**Fig. EF**). Ce résultat suggérerait soit que Stylin-01 n'est pas le récepteur du CaMV, soit que son absence est compensée par une autre protéine cuticulaire.

Au vu de ses résultats, on ne s'attendait pas à trouver de différence dans la capacité des pucerons de la lignée KO Stylin-01 à transmettre le CaMV, par rapport à la lignée WT. Pour le vérifier, nous avons réalisé des tests de transmission. Le protocole a dû être adapté à l'espèce *A. pisum* qui accepte difficilement de s'alimenter sur navet, ainsi qu'à nos conditions de travail en laboratoire confiné. Nos élevages ont été maintenus sur des plantes très jeunes avec une faible densité de population. Nous avons de plus travaillé avec des stades larvaires précoces (N1/N2) et manipulé très peu de pucerons à la fois pour ne pas stresser les individus (voir matériel et méthodes complémentaires). Toutes ces contraintes nous ont poussé à réduire le nombre de tests de transmission et le nombre de plante par expérience.

Les taux de transmission obtenus avec *A. pisum* (16,3 % en moyenne pour la lignée WT malgré deux pucerons par plante) restent néanmoins beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec *M. persicae* (environ 50 % en moyenne avec un puceron par plante). Toutefois, avec quatre répétitions biologiques effectuées, nous avons pu observer une différence très nette entre le taux de transmission de la lignée WT et celui de la lignée KO Stylin-01. Ce taux est en effet cinq fois plus faible chez la lignée mutée (**Fig. 22-A**). Il n'est cependant pas égal à zéro : une transmission résiduelle (3,2 %) a été constatée.

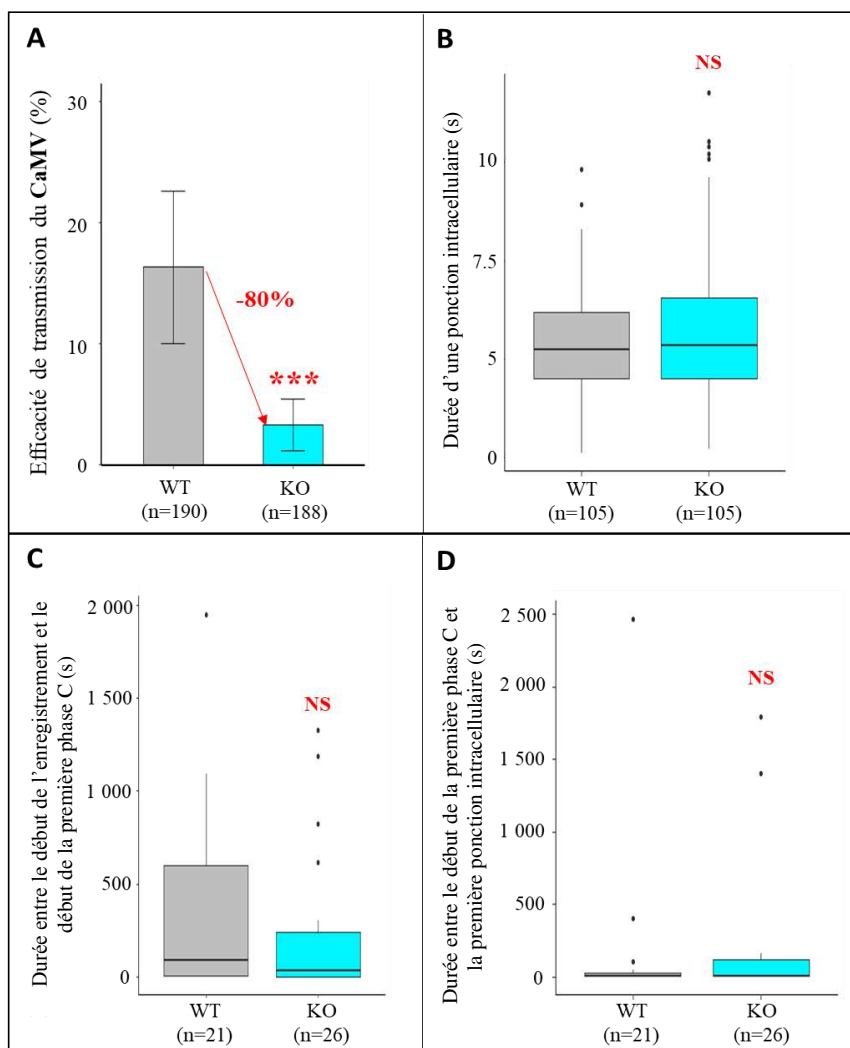


Figure 22. Taux de transmission du CaMV et comportement alimentaire des pucerons des lignées WT et KO Stylin-01

A) Représentation des taux de transmission du CaMV chez les pucerons *A. pisum* des lignées WT et KO Stylin-01. Le taux de transmission du CaMV chez les pucerons mutés est significativement plus faible (-80 %) par rapport à la lignée WT (χ^2 , $p = 3,78 \times 10^{-5}$). **B)** Représentation de la durée moyenne d'une ponction intracellulaire (*potentiel drop* ou pd) sur fève (*Vicia faba* cv Robin Hood) chez les pucerons *A. pisum* des lignées WT et KO Stylin-01. La médiane est représentée par une ligne horizontale. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lignées (ANOVA, $p = 0,284$). **C)** Représentation de la durée moyenne entre le début de l'enregistrement EPG et le début de la première phase C. La médiane est représentée par une ligne horizontale. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lignées (Kruskal-Wallis, $p = 0,289$). **D)** Représentation de la durée moyenne entre le début de la première phase C et la première ponction intracellulaire. La médiane est représentée par une ligne horizontale. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lignées (Kruskal-Wallis, $p = 0,824$).

Pour compléter nos résultats, nous avons réalisé des enregistrements EPG qui, pour des raisons pratiques, n'ont pas pu être effectués en parallèle des tests de transmission comme pour les expériences de *silencing*. Au total, 26 et 21 adultes ont respectivement été enregistrés pour les lignées KO Stylin-01 et WT. Ils ont permis de montrer que la durée moyenne des cinq premières ponctions intracellulaires dans la plante était identique entre les deux lignées ($5,68 \pm 1,60$ s pour la lignée KO Stylin-01 contre $5,39 \pm 1,30$ s pour la lignée WT) (**Fig. 22-B**). Par ailleurs, aucune variable EPG enregistrée n'a révélé de différence entre les deux cohortes de pucerons. La durée moyenne entre le début de l'enregistrement et le moment où le puceron insère ses stylets dans les tissus de la plante (début de la phase C) est identique ($328,37 \pm 113,93$ s vs $215,75 \pm 71,79$ s) (**Fig. 22-C**) ; ainsi que la durée moyenne entre le début de la phase d'alimentation et la première ponction intracellulaire ($151,32 \pm 123,47$ s vs $156,29 \pm 84,53$ s) (**Fig. 22-D**). Le taux de transmission du CaMV relativement faible pour la lignée KO Stylin-01 n'est donc pas lié à un défaut du comportement alimentaire de cette lignée.

Ainsi, la capacité de la lignée KO Stylin-01 à transmettre le CaMV semble impactée par rapport à la lignée WT. C'est la deuxième fois que nous arrivons à cette conclusion lorsque le gène *stylin-01* est ciblé, quelle que soit l'espèce de puceron (*A. pisum* ou *M. persicae*) ou l'approche utilisée (RNAi ou CRISPR-Cas9). Il serait tentant de conclure que Stylin-01 est le récepteur majeur du CaMV, même si les tests *in vitro* montrent une interaction avec la protéine virale P2 qui ne semble pas différente des interactions avec les stylets de la lignée WT. Toutefois, la force de cette interaction est difficilement mesurable via l'intensité de la fluorescence sur les stylets : elle pourrait être moindre *in vivo* ce qui expliquerait la différence des taux de transmission observée. L'interprétation des données devra aussi tenir compte du fait que les lignées étudiées sont issues d'oeufs différents. Ce point sera discuté en conclusion du chapitre.



Figure 23. Symptômes systémiques du TuMV sur navet

Feuille de navet infectée par le TuMV, souche C42. Un gauchage et une chlorose sous forme de mosaïque sont visibles.

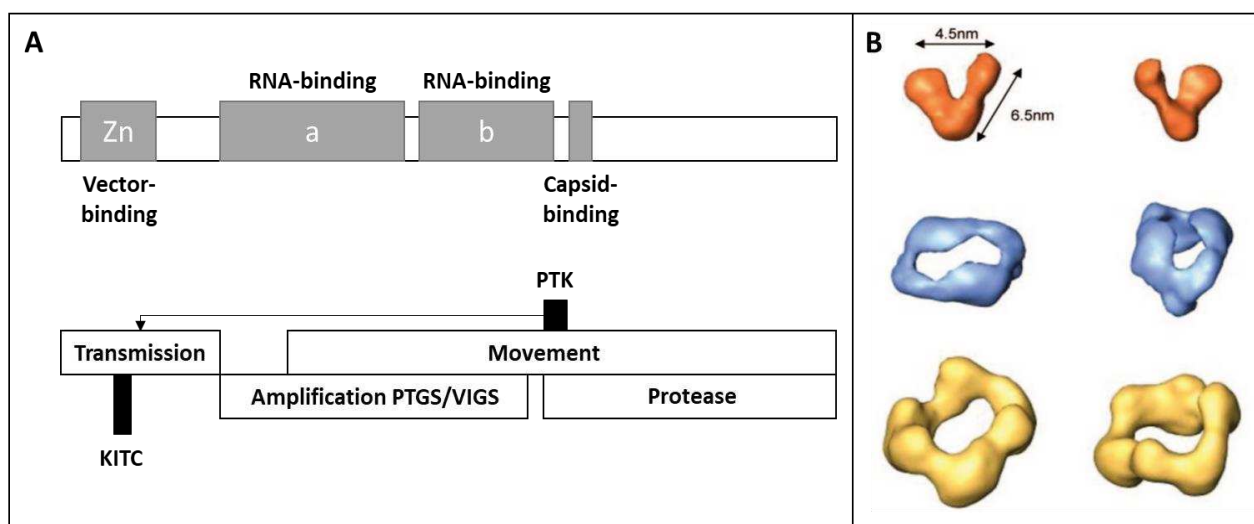


Figure 24. Représentation schématique des régions et motifs de la protéine HC-Pro, et structure 3D des oligomères

A) En haut : localisation des régions putatives de liaison au vecteur, à l'ARN et à la capsid virale dans la séquence HC-Pro. En bas : fonctions biologiques des différentes régions de HC-Pro. La position des motifs conservés est précisée. Zn : doigt de zinc putatif, a et b : domaines de liaison à l'ARN. La flèche indique que le motif PTK est également impliqué dans la transmission. *Adaptée de Plisson et al. (2003).*

B) Modèle de l'oligomérisation de la protéine HC-Pro du *Tobacco etch virus* (TEV). Les structures 3D du dimère putatif (en orange), du tétramère (en bleu) et de l'hexamère (en jaune) sont représentées sous deux angles différents. *Adaptée de Ruiz-Ferrer et al. (2005)*

3. Détermination du rôle de Stylin-01 et Stylin-04 dans la transmission du TuMV

3.1. Présentation du *Turnip mosaic virus* (TuMV)

Les virus du genre *Potyvirus* infectent un nombre impressionnant de cultures et provoquent des dégâts considérables (Shukla et al., 1994). Ce genre regroupe plus d'une centaine d'espèces virales, dont le virus de la mosaïque du navet (TuMV). Ce virus peut être transmis par plus de 40 espèces de puceron et infecte essentiellement des plantes de la famille des *Brassicaceae*, sur lesquelles il peut causer des symptômes de gaufrage et de mosaïque au niveau des feuilles (Fig. 23). Sa particule virale de 720 nm de longueur est flexible et non enveloppée. Son génome est constitué d'un seul ARN simple brin linéaire de polarité positive d'environ 10 kb. L'ARN génomique code pour une polyprotéine qui est maturée par protéolyse en au moins 10 protéines fonctionnelles, dont la protéine HC-Pro (Merits et al., 2002; Wei et al., 2010).

La protéine HC-Pro des potyvirus

La protéine *helper component protease* (HC-Pro) a une taille d'environ 52 kDa. Son nom lui vient de la première fonction qu'on lui ait attribuée : celle de facteur assistant de la transmission par les pucerons (Govier et al., 1977). Contrairement à la protéine P2, HC-Pro est une protéine multifonctionnelle. Elle est impliquée dans un nombre impressionnant de fonctions virales telles que la sévérité des symptômes, l'amplification du génome, l'accumulation de virus (Atreya and Pirone, 1993; Kasschau and Carrington, 1995) ainsi que les mouvements à longue distance et entre les cellules (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997; Klein et al., 1994; Rojas et al., 1997). Elle est également très connue pour sa fonction de suppresseur de l'ARN interférence (Anandalakshmi et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1995), et le fait qu'elle contienne un domaine protéase riche en cystéines, qui auto-clive HC-Pro de la polyprotéine à son extrémité C-terminale (Carrington et al., 1989a, 1989b). De plus, HC-Pro peut interagir avec de nombreuses protéines virales (Choi et al., 2000; Guo et al., 2001; Merits et al., 1999) et des protéines de la plante hôte (Anandalakshmi et al., 1998; Endres et al., 2010; Guo et al., 2003; Haikonen et al., 2013; Nakahara et al., 2012), suggérant des fonctions encore plus diverses que celles déjà établies.

HC-Pro peut être divisée en trois domaines principaux (les positions indiquées correspondent à la protéine HC-Pro du *Tobacco etch virus* ou TEV) : une partie N-terminale (AA 1 à 100) importante pour la transmission par puceron, une région centrale (AA 101 à 299) en charge de la suppression de l'ARN interférence et d'autres fonctions, et enfin un domaine C-terminal (AA 300 à 459) qui porte l'activité protéolytique de la protéine (Hasiów-Jaroszewska et al., 2014; Plisson et al., 2003; Ruiz-Ferrer et al., 2005) (Fig. 24-A).

L'identification et la validation des domaines conservés de la protéine HC-Pro ont fait l'objet de nombreuses études. Un motif « PTK » (Proline-Threonine-Lysine) situé en C-terminal (Huet et al., 1994) est ainsi connu pour interagir avec le motif « DAG » (« DTVDAGK ») localisé en N-terminal de la protéine de capsid (Allison et al., 1985; Dougherty et al., 1985). En plus de ce motif, un domaine en doigt de zinc localisé cette fois en N-terminal de la protéine, a aussi été décrit comme important pour la transmission (Plisson et al., 2003; Ruiz-Ferrer et al., 2005; Thornbury et al., 1985). Il contient quatre cystéines (Huet et al., 1994; Peng et al., 1998) et le motif conservé « KITC » (Lysine, Isoleucine, Thréonine, Cystéine) qui serait impliqué dans l'interaction avec le récepteur dans les stylets de pucerons (Blanc et al., 1998; Granier et al., 1993; Robaglia et al., 1989; Seo et al., 2010).

De plus, il a rapidement été suggéré que la protéine HC-Pro adoptait une structure quaternaire complexe (Thornbury et al., 1985). Diverses études ont effectivement montré son auto-oligomérisation (Guo et al., 1999; Urcuqui-Inchima et al., 1999; Zheng et al., 2011). HC-Pro s'auto-assemble sous la forme de dimères selon une conformation en V, grâce à l'orientation antiparallèle des monomères qui interagissent entre eux (Ruiz-Ferrer et al., 2005) (**Fig. 22-B**). Ces dimères interagiraient également pour former des tétramères et hexamères et des études récentes viennent de montrer que le degré d'oligomérisation de cette protéine semblait important pour une transmission efficace du virus (Berthelot et al., 2019a, 2019b). Avant l'arrivée du puceron, les virions et les protéines HC-Pro seraient en effet distribués uniformément dans le cytoplasme sans pouvoir interagir, probablement car les protéines HC-Pro seraient dans une conformation réduite. Lorsque les stylets perforent les cellules, elles s'oxyderaient et formeraient des oligomères grâce à la formation de ponts disulfures (S-S), leur permettant de se lier à la capsid des virions.

3.2. Capacité des mutants KO Stylin-01 à transmettre le TuMV

Nous avons logiquement commencé par tester le rôle de Stylin-01 dans la transmission du TuMV. Cette protéine étant impliquée dans la transmission du CaMV, elle représentait une candidate sérieuse pour interagir avec d'autres virus non circulants.

Nous avons décidé de tirer profit des expérimentations mises en place avec le CaMV et la lignée KO Stylin-01 pour adresser cette question. Nous pensions en effet que les résultats seraient plus facilement interprétables par rapport au *silencing* qui est très variable. De nouveaux tests de transmission ont été réalisés avec ce virus et le protocole est présenté dans le matériel et méthodes complémentaires.

Avec quatre répétitions biologiques effectuées, nous avons observé un taux de transmission de 32.8% en moyenne pour les pucerons de la lignée WT. Celui-ci est un peu plus faible pour les pucerons de la lignée KO Stylin-01 (26,3 %) mais cette différence (environ 20 % plus faible) n'est pas soutenue par les tests statistiques (**Fig. 25**).

Ces résultats indiquent que Stylin-01 n'est pas impliquée dans la transmission du TuMV, ou alors de manière secondaire. Il est également possible qu'une autre protéine cuticulaire compense l'absence de Stylin-01 dans les stylets de la lignée mutée. Ce point sera discuté en conclusion du chapitre.

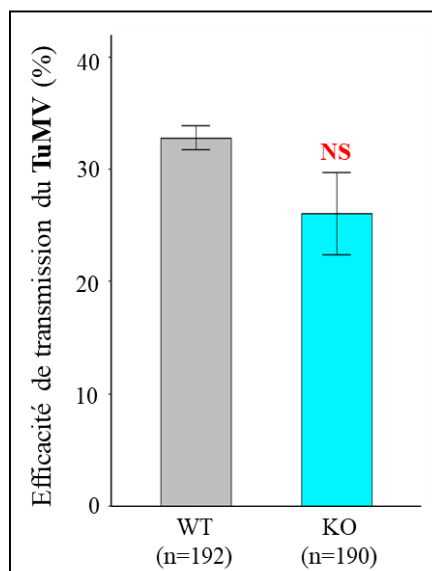


Figure 25. Taux de transmission du TuMV des lignées WT et KO Stylin-01

Représentation des taux de transmission du TuMV chez les pucerons *A. pisum* des lignées WT et KO Stylin-01. Les taux de transmission du TuMV ne sont pas significativement différents entre les deux lignées (χ^2 , $p=0,201$).

3.3. Mise en évidence du rôle de Stylin-04 dans la transmission du TuMV par ARN interférence

Au début de ma thèse, Baptiste Monsion avait recherché la localisation des sites de rétention du TuMV dans les pièces buccales de l'espèce *Aphis gossypii*. Des stylets de pucerons nourris sur plantes infectées par le TuMV avaient été observés en MET par Daniel Gargani et Bastien Cayrol. Ils n'avaient pas permis de mettre en évidence des particules virales au niveau de l'acrostyle. Du virus avait cependant été observé juste au début du canal alimentaire, un peu plus haut que l'organe (Fig. 26). Il nous a semblé très intéressant de faire le lien avec la localisation du peptide en surface 1-16 de Stylin-04, lui aussi détecté assez haut dans l'acrostyle, et sur les arêtes latérales. Nous avons donc choisi de cibler en priorité cette protéine dans nos recherches du récepteur du TuMV.

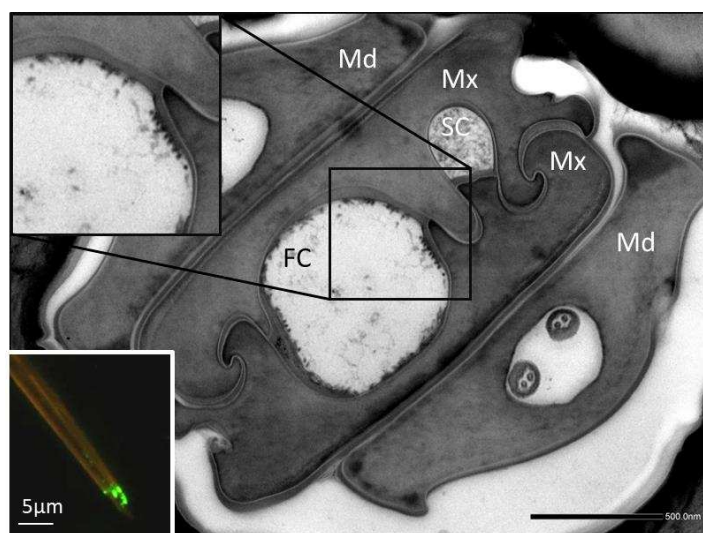


Figure 26. Coupe transversale d'un faisceau de stylets d'un puceron *Aphis gossypii*, nourri sur une plante infectée par le TuMV, observée en MET

Coupe transversale d'un faisceau de stylets du puceron *A. gossypii* nourri sur plante infectée par le TuMV, pris au niveau du canal alimentaire, juste au-dessus de l'acrostyle, et observée en microscopie électronique à transmission (barre d'échelle : 500 nm). Des particules virales sont visibles au début du canal alimentaire. Un zoom sur ces particules est proposé dans l'encadré en haut à gauche. La localisation du peptide 1-16, correspondant au peptide en surface de Stylin-04, est rappelée dans l'encadré en bas à gauche (barre d'échelle : 5 μ m).

Md : stylet mandibulaire, Mx : stylet maxillaire, FC : canal alimentaire (*food canal*), SC : canal salivaire (*salivary canal*). Cliché B. Cayrol

Nous avons tenté de diminuer l'expression du gène *stylin-04* de *M. persicae* par l'approche ARN interférence, puis nous avons réalisé des tests de transmission avec les pucerons traités (Fig. 20). Le protocole est détaillé dans le matériel et méthodes complémentaires.

Sur cinq répétitions biologiques effectuées, nous n'avons pas réussi à réduire la quantité de transcrits *stylin-04* de manière significative, l'impact du traitement sur les transcrits étant très variable d'une expérience à l'autre. Cependant, le taux de transmission du TuMV a systématiquement chuté chez les pucerons traités par rapport aux pucerons contrôles. Le taux de transmission moyen est de 22,6 % chez les pucerons contrôle contre 15,0 % seulement chez les pucerons traités, ce qui représente une réduction significative de 33,6 % du taux de transmission (Fig. 27). Ces résultats, bien qu'ils ne soient pas reliés à une diminution notable de l'expression du gène *stylin-04* dans le puceron, sont encourageants et pourraient signifier que cette protéine joue un rôle dans la transmission du TuMV. Il s'agit d'une piste que l'équipe devra continuer à creuser.

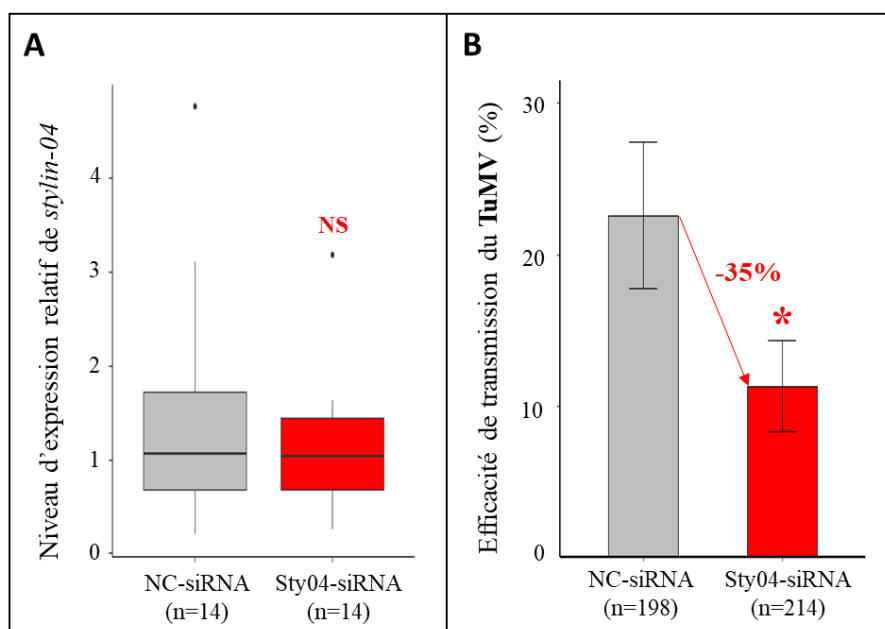


Figure 27. Effet du traitement RNAi sur la transmission du TuMV par le puceron *M. persicae*

A) Représentation des niveaux de transcrits du gène *stylin-04* de *M. persicae* normalisés par rapport à deux gènes de référence (*actin* et *EF1a*) chez les pucerons contrôles (NC-siRNA) et traités (Sty04-siRNA). La médiane est représentée par une ligne horizontale. Les niveaux d'expression de *stylin-04* ne sont pas significativement différents entre les deux conditions (ANOVA, $p=0,270$). **B)** Représentation des taux de transmission du TuMV chez les pucerons *M. persicae* contrôles (NC-siRNA) et traités (Sty04-siRNA). Le taux de transmission du TuMV est significativement réduit de 34,6 % chez les pucerons traités (χ^2 , $p=0,011$).

4. Conclusion

Pour déterminer le rôle des stylines dans la transmission des virus non circulants, nous avons commencé par développer l'approche ARN interférence sur les gènes *stylin-01* et *stylin-02*, puis nous avons recherché l'impact de ce traitement sur la transmission du CaMV. De manière générale, nous avons constaté une grande variabilité dans les données obtenues, aussi bien pour les niveaux des transcrits que pour les tests de transmission. Nous n'avons tenu compte que des tests pour lesquels un *silencing* efficace a été démontré par PCR quantitative, et un nombre important de répétitions a été nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions fiables.

Nous avons toutefois réussi à montrer que la diminution du nombre de transcrits *stylin-01* était corrélée à une baisse importante de la transmission du CaMV, y compris sous contrôle EPG. L'hypothèse la plus évidente ici était que nous avions diminué la quantité de récepteurs dans les stylets des pucerons traités, engendrant ainsi une diminution du nombre de particules virales retenues, puis relarguées.

En parallèle, nous avons réalisé des tests de transmission du CaMV avec les pucerons issus de la lignée KO *Stylin-01*, en comparaison de la lignée WT. Ici, nous avons constaté que le taux de transmission était beaucoup plus faible pour la lignée mutée. Nous avons par contre toujours une transmission résiduelle, ainsi qu'un accrochage de la protéine virale P2 sur l'acrostyle.

Même si *Stylin-01* joue un rôle majeur dans la transmission du CaMV, nous en avons conclu qu'une autre protéine jouerait aussi un rôle mineur. La protéine *Stylin-02* pourrait être la candidate idéale : elle présente une forte homologie avec *Stylin-01*, partage le même domaine C-terminal en surface de l'organe, et est également conservée parmi les espèces de pucerons ([voir chapitre 1](#)). Pour le moment, les tests de transmission réalisés avec des pucerons nourris sur des siRNA spécifiques de *Stylin-02* ne vont pas dans ce sens, mais il est possible que le *silencing* n'ait pas été suffisant pour observer un phénotype clair. Nous avons mesuré le niveau des transcrits *stylin-02* dans les lignées WT et KO *Stylin-01* par PCR quantitative afin de voir si l'absence de *Stylin-01* avait été compensée par une production plus importante de *Stylin-02*, mais nous n'avons pas observé de différence entre les deux lignées.

Même si les résultats obtenus avec les mutants KO *Stylin-01* paraissent plus simples à interpréter, il faut toutefois modérer nos conclusions. Nous disposons en effet de données dans la littérature qui montrent que pour une même espèce de puceron, le taux de transmission d'un clone à l'autre peut être différent et ceci dans les mêmes conditions expérimentales ([Bosquee et al., 2016](#); [Symmes and Perring, 2007](#)). Or, nous comparons ici deux lignées « sœurs » (issues d'œufs de puceron différents) dont les fonds génétiques ne sont pas exactement identiques. De plus, nous n'avons pas réussi à obtenir un phénotype clair concernant la capacité de la lignée KO *Stylin-01* à transmettre le CaMV (un phénotype clair s'entend ici par une absence de différence ou au contraire l'abolition totale de la transmission). Il est donc légitime de se demander si le taux de transmission observé avec la lignée KO *Stylin-01* reflète

effectivement l'absence du récepteur principal du CaMV, ou si ce clone transmet tout simplement moins bien que les autres. Il est effectivement possible que Stylin-01 ne soit pas impliquée dans la transmission du virus (hypothèse que nous ne retenons pas à l'heure actuelle, mais qu'il convient de poser). Par la suite, il est impératif de tester en parallèle un nombre suffisant de lignées contrôles pour compléter nos données.

Pour achever cette caractérisation, il serait important de mettre en évidence une interaction directe entre Stylin-01 et la protéine virale P2. Les anciens post-doctorants de l'équipe (Craig Webster, Baptiste Monsion et Caroline Hemmer) ont testé un nombre conséquent d'approches, que ce soit en système hétérologue (double hybride en levure, BiFC en tabac), ou *in vitro* (*peptide array*, co-IP, *far western blot*, GFP-Trap, etc.) qui n'ont malheureusement jamais abouties. Une hypothèse, confortée par les travaux de nos collaborateurs structuralistes, serait que les protéines Stylin-01 et Stylin-02 ne sont pas repliées dans nos conditions expérimentales, et ceci même lorsque la protéine partenaire est présente. Dans ce cas, il sera très difficile, voire impossible, d'observer une interaction.

Nous avons aussi commencé à évaluer le rôle de Stylin-01 dans la transmission d'un potyvirus, le TuMV. Les taux de transmission semblent un peu plus faibles avec le mutant, mais les différences ne sont pas significatives. Stylin-01 ne semble donc pas impliquée ou alors, si elle l'est, une autre styline pourrait compléter sa fonction dans la lignée mutée.

Une autre protéine cuticulaire dont le rôle a été évalué par l'approche ARN interférence est Stylin-04. Cette protéine paraît être un bon candidat et ceci mérite d'être approfondi car aucun récepteur n'a été caractérisé pour les potyvirus jusqu'à présent. Nos résultats devront impérativement être confirmés par d'autres approches complémentaires. Malheureusement, comme pour la protéine P2, aucune interaction directe n'a été observée entre les stylines et HC-Pro. De plus, les conditions d'interaction entre HC-Pro et des stylets disséqués n'ont toujours pas été déterminées, malgré les efforts déployés par l'ensemble de l'équipe, ce qui limite aussi la caractérisation du récepteur.

Enfin, il serait intéressant à l'avenir de tester si les autres stylines sont impliquées dans la transmission du CaMV, du TuMV, ou d'autres virus non circulants.

Chapitre 4

—

Détermination du rôle des stylines dans les interactions plante-puceron

1. Contexte de l'étude

L'acrostyle a été trouvé chez toutes les espèces de pucerons dans lesquelles il a été recherché mais en dehors de la transmission des virus, sa fonction physiologique pour le puceron lui-même n'est pas caractérisée. Puisqu'il a un rôle évident dans la rétention et le relargage de protéines virales, on peut s'attendre à ce qu'il ait aussi un rôle dans la rétention et le relargage d'autres molécules. Celles-ci pourraient provenir du contenu des cellules végétales, de la sève phloémienne, ainsi que de la salive du puceron, avec lesquels l'acrostyle est directement en contact. Nous avons émis deux hypothèses qui représentaient le point de départ de ce volet d'étude.

- **Hypothèse 1** : l'acrostyle retiendrait des **composés de la plante**. Il pourrait jouer en quelque-sort le rôle d'un piège, ou d'un filtre, pour protéger le puceron contre certaines molécules qui ont un effet toxique (ou « antibiose »). L'acrostyle les retiendrait de manière à éviter leur passage dans l'organisme de l'insecte, avant de les délivrer de façon sporadique dans la plante, par salivation. Il pourrait également retenir certaines molécules impliquées dans le déclenchement des mécanismes de défenses pour retarder ou minimiser les réponses de la plante.

- **Hypothèse 2** : l'acrostyle pourrait interagir avec des composés salivaires, en particulier des **effecteurs**, qui pourraient être momentanément retenus et concentrés à la pointe des stylets maxillaires. Ils seraient ensuite libérés massivement par salivation dans les cellules végétales visitées. De cette manière, l'acrostyle permettrait à l'insecte de délivrer une grande quantité de molécules effectrices dans les tissus à cibler, pour bloquer rapidement les défenses de la plante. Il serait un régulateur de la distribution des effecteurs dans la plante.

Des observations en microscopie électronique sont venues étayer ces hypothèses. Des composés granuleux ont en effet été observés le long de l'acrostyle chez des pucerons qui se sont nourris exclusivement sur plante saine (**Fig. 28**). Il y aurait donc d'autres composés qui s'accrochent sur l'acrostyle en dehors des particules virales.

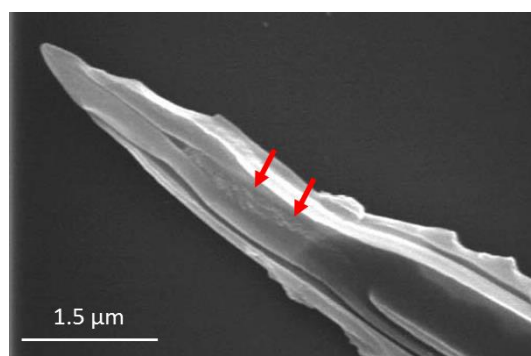


Figure 28. Observation en microscopie électronique à balayage d'un stylet maxillaire d'un puceron qui s'est nourri sur plante saine.

Les composés granuleux observés au niveau de l'acrostyle sont indiqués par des flèches rouges. Barre d'échelle : 1,5 µm. Cliché M. Uzest

Ainsi, plus largement, l'objectif de ce dernier axe de recherche était de déterminer si l'acrostyle pourrait jouer un rôle dans les interactions plante-puceron. Plusieurs approches ont été envisagées pour tenter d'identifier les partenaires de l'acrostyle et/ou des stylines (incubations directes de molécules sur stylets disséqués, recherche d'interactions en systèmes hétérologues ou *in vitro*, etc.). De plus, les techniques de validation fonctionnelle (ARN interférence et CRISPR-Cas9) devaient permettre la caractérisation des fonctions des protéines avec suivi et analyse de traits phénotypiques particuliers, tels que le taux de survie, le taux de fécondité ou bien le comportement alimentaire. Contrairement aux autres chapitres de la thèse, qui s'inséraient davantage dans un travail collectif, j'ai entièrement développé cet axe de recherche qui était nouveau dans l'équipe d'accueil.

2. Détermination du rôle des stylines et de l'acrostyle dans le comportement alimentaire des pucerons

Dès le début de ma thèse, j'ai identifié une interaction en levure entre un effecteur salivaire et la protéine Stylin-03. J'ai ensuite consacré de nombreux efforts à la validation de cette interaction, et l'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'un article dont je suis première auteure. Il sera prochainement soumis à *Molecular Plant Microbe Interactions*.

2.1. Résumé de l'étude

L'objectif de cette étude était d'identifier les partenaires potentiels des stylines et de l'acrostyle, et de caractériser le rôle de ces protéines dans l'alimentation du puceron.

Nous avons choisi de démarrer par une approche gène candidat via le système double-hybride en levure. Nous avons recherché des interactions entre les cinq stylines identifiées, et quelques effecteurs de salive qui ont été caractérisés dans la littérature, et qui sont connus pour être délivrés *in planta* : ACE1 (Wang et al., 2015c), Ap25 (Guy et al., 2016), Armet (Wang et al., 2015b), C002 (Mutti et al., 2006), MIF1 (Naessens et al., 2015), Mp10 (Bos et al., 2010) et PintO1 (Pitino and Hogenhout, 2013).

Nous avons mis en évidence une interaction entre l'effecteur Mp10, décrit chez *M. persicae* (Bos et al., 2010; Rodriguez et al., 2014), et la protéine MpStylin-03 (**Fig. 1-A - article**). Cette interaction a aussi été observée avec l'homologue de Mp10 chez *A. pisum*, que nous appellerons Mp10-like (96,7 % d'identité entre Mp10 et Mp10-like), et la protéine Stylin-03 de cette même espèce (95 % d'identité entre MpStylin-03 et ApStylin-03) (**Fig. 1-B - article**).

Mp10 et Mp10-like, produites en bactérie et purifiées par chromatographie d'affinité, ont ensuite été couplées chimiquement avec le fluorochrome Alexa-488, puis incubées respectivement sur des stylets disséqués de pucerons *M. persicae* et *A. pisum*. De cette manière, il était possible de pouvoir visualiser les protéines directement sur les stylets.

Dans les deux cas, nous avons montré que les stylets étaient marqués au niveau de l'acrostyle : le nombre de stylets marqués était significativement plus élevé que dans le cas de stylets incubés avec des protéines contrôles (BSA et Thiredoxine) (**Fig. 2-AC - article**). Ces résultats nous ont permis de conclure que les protéines Mp10 et Mp10-like s'accrochaient spécifiquement à la pointe des stylets, sur l'acrostyle. De plus, nous avons noté une diminution du nombre de stylets marqués lorsque nous incubions Mp10 sur des stylets de pucerons *M. persicae*, préalablement nourris avec des siRNA ciblant le gène *stylin-03* (Sty03-siRNA) (**Fig. 29-B**) (**Fig. 2-D - article**). La protéine Stylin-03 pourrait donc être impliquée dans l'accrochage de l'effecteur en surface de l'acrostyle.

Si l'acrostyle joue effectivement un rôle dans les interactions plante-insecte, alors la diminution de la quantité de certaines protéines dans cet organe pourrait avoir un impact sur les phases d'alimentation du puceron. C'est ce que nous avons souhaité vérifier au cours d'un séjour de trois semaines au CSIC à Madrid, dans le laboratoire du professeur Alberto Fereres. Nous avons effectué des enregistrements EPG (de 8 heures) sur arabette, pour suivre les comportements alimentaires de pucerons *M. persicae* traités par ARN interférence (**Fig. 29-A**). Nous avons choisi de cibler la protéine Stylin-03 puisque nous venions de démontrer son interaction avec l'effecteur Mp10, et la protéine Stylin-01 impliquée dans la transmission du CaMV (Webster et al., 2018).

Malgré des tendances pas toujours soutenues par les tests statistiques, plusieurs variables ont été impactées de manière similaire pour les deux traitements en comparaison des pucerons contrôles (siRNA ciblant *stylin-01* ou *stylin-03* vs NC-siRNA) (**Fig. 3 - article**). La première variable est la durée des *potential drops* (ponctions intracellulaires dans l'épiderme ou le mésophylle), et plus particulièrement la durée des sous-phases II-2 (phase associée à la salivation). La deuxième est la durée de la phase E1 (période de salivation avant l'ingestion continue de la sève). Elles sont toutes les deux plus longues chez les pucerons traités que chez les contrôles. A l'inverse, aucune différence n'a été observée concernant la phase E2 (ingestion du phloème). Ces résultats suggèrent que les individus traités s'alimentent aussi longtemps dans le phloème, mais qu'ils passent plus de temps à saliver dans les différents tissus de la plante.

Enfin, nous avons montré que cette différence de comportement n'avait pas d'impact sur la mortalité ou la fécondité des insectes (**Fig. 4 - article**). Ce résultat est cohérent avec les enregistrements EPG puisque les pucerons traités passent autant de temps à s'alimenter dans le phloème que les contrôles.

2.2. Article 4 : Cuticular proteins of aphids stylets take part in effector-plant defense dialogue

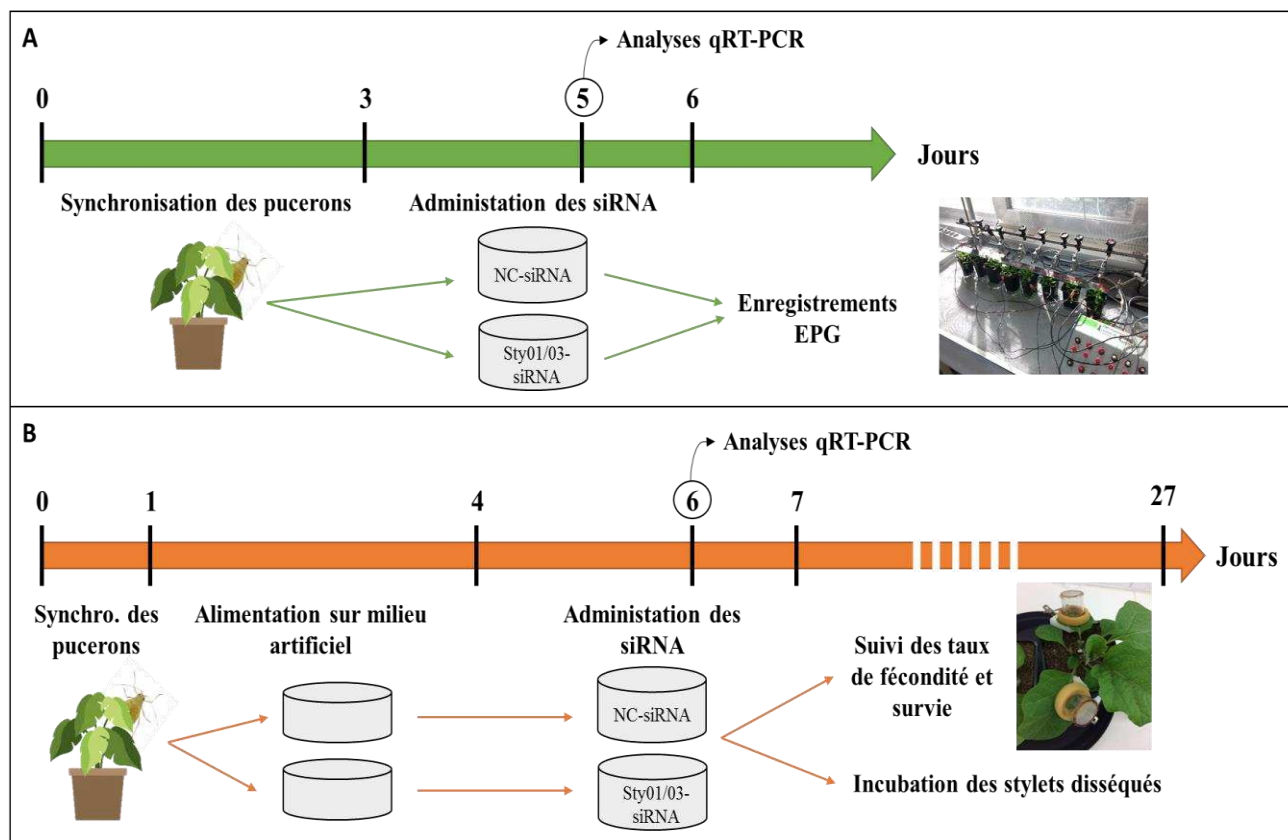


Figure 29. Recherche des propriétés des stylets, du comportement alimentaire et des traits d’histoire de vie de pucerons traités par RNAi

A) Méthode utilisée pour l’étude du comportement alimentaire des pucerons *M. persicae* traités par ARN interférence. Au jour 0, des adultes *M. persicae* sont laissés sur aubergine pour synchronisation des pucerons. Au jour 3, les larves pondues aux stades N1/N2 sont positionnées sur milieu artificiel contenant les siRNA (NC-siRNA, Sty01-siRNA ou Sty03-siRNA). Au jour 5, soit après 48h de traitement, des pools de 10 pucerons sont prélevés pour analyser les niveaux de transcrits des gènes *stylin-01* ou *stylin-03* par RT-qPCR, afin de vérifier l’efficacité des traitements. Au jour 6 (stades N3/N4), des pucerons sont récupérés pour effectuer des enregistrements EPG. **B)** Méthode utilisée pour l’étude des taux de survie et de fécondité, ainsi que des incubations sur stylets disséqués, des pucerons *M. persicae* traités par ARN interférence. Au jour 0, des adultes *M. persicae* sont laissés sur aubergine pour synchronisation des pucerons. Au jour 1, les larves N1 sont positionnées sur milieu artificiel sans siRNA (acclimatation des larves sur milieu artificiel), puis elles sont transférées au jour 4 sur milieu contenant les siRNA (NC-siRNA, Sty01-siRNA ou Sty03-siRNA). Au jour 6, soit après 48h de traitement, des pools de 10 pucerons sont prélevés pour analyser les niveaux de transcrits des gènes *stylin-01* ou *stylin-03* par RT-qPCR, afin de vérifier l’efficacité des traitements. Au jour 7, les pucerons adultes sont individualisés en *clip-cages* sur aubergine afin de mesurer les taux de mortalité et de fécondité de chaque individu. En parallèle, des adultes sont prélevés pour dissection des stylets et incubation avec la protéine Mp10.

**Acrostyle cuticular protein within the tip of aphid stylets bind the aphid effector Mp10
and impact aphid feeding behavior**

Maëlle Deshoux,¹ Baptiste Monsion,^{1#} Elodie Pichon,¹ Jaime Jiménez,^{2§} Aranzazu Moreno,²
Bastien Cayrol,¹ Gaël Thébaud,¹ Sam T. Mugford,³ Saskia A. Hogenhout,³ Stéphane Blanc,¹
Alberto Fereres,^{3*} and Marilyne Uzest^{1*}

¹ BGPI, University of Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, Cirad, TA A-54/K, Campus de Baillarguet, F-34398, Montpellier, France

² Instituto de Ciencias Agrarias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICA-CSIC), C/ Serrano 115 dpdo, Madrid 28006, Spain

³ John Innes Centre, Department of Crop Genetics, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom.

#Current address: UMR1161 Virologie, INRAE-ANSES-ENVA, 7 Avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France.

§Current address: Department of Entomology and Nematology, University of Florida, Gainesville, FL, USA.

*Corresponding authors:

A. Fereres: Phone: +34 917 452 500. Email: a.fereres@csic.es

M. Uzest: Phone: +33 499 624 857. Email: marilyne.uzest@inrae.fr

ABSTRACT

To avoid the activation of plant defenses and ensure sustained feeding, aphids use their specialized mouthparts to deliver effectors into plant cells. A recent study showed the detection of aphid effectors in plant tissues near the aphid feeding site. One of these effectors is Mp10, which locates within the cytoplasm of mesophyll plant cells and is likely delivered there via the watery saliva during aphid probing of these cells. However, while aphid effectors are functionally described, it is not clear how they are delivered into the plant, and particularly into specific plant compartment. Here, we show that Mp10 binds to the acrostyle area that is located internally at the tip of maxillary stylets. The acrostyle is likely exposed to plant components during aphid feeding and has previously been shown to harbor at least one receptor for *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) binding that is essential for the transmission of this noncirculative virus. The surface of the acrostyle is covered by cuticle proteins named stylins and we found that one of these stylins, Stylin-03, specifically binds Mp10. A direct Stylin-03-Mp10 interaction was shown by yeast-two-hybridization analysis. Moreover, less Mp10-binding to the acrostyle was observed in aphids upon RNAi-mediated knockdown of Stylin-03 production. Stylin-03 and Stylin-01 RNAi aphids also exhibited changes in feeding behavior as evidenced by the electrical penetration graph technique; behaviors associated with release of watery saliva during probing of plant cells were affected. Taken together, these data show evidence that, in addition to noncirculative virus transmission, the acrostyle plays a role in the delivery of aphid effectors into plant cells.

Keywords: Stylet, aphid effector, Mp10, cuticular proteins, acrostyle, feeding behavior, insect-plant interactions, herbivore

INTRODUCTION

Aphids are small insects of the order Hemiptera that can cause devastating crop losses (Dedryver et al. 2010). These insects have piercing-sucking mouthparts composed of two pairs of stylets that navigate between and into plant cells and enable the establishment of a feeding site in the plant vascular bundle, primarily the phloem sieve elements (SE) (Tjallingii 1995). This feeding behavior may cause direct damage of plant tissues and is also essential for the transmission of a diversity of plant pathogens, including $\pm 40\%$ of all described viral plant pathogens (Nault 1997). When feeding from the phloem, aphids digest vast amounts of the sugary phloem sap most of which is excreted by the insects as ‘honeydew’ that can become a substrate of opportunistic fungi, which prevent leaves from efficient photosynthesis. Despite aphids causing massive crop losses, molecular mechanisms that are essential for establishment of an aphid-plant interaction remain largely unknown.

There are about 5500 aphid species described. Of these, *Acyrtosiphon pisum* (pea aphid) that colonizes Fabacea (Peccoud et al. 2009) and *Myzus persicae* (green peach aphid) that colonizes over 400 plant species of around 40 families (Blackman and Eastop 2000) are two well-studied model organisms known to transmit dozens of plant viruses and abundantly used in aphid research to address diverse biological questions among which those related to the mechanisms involved in plant-aphid interactions.

Aphids secrete two types of saliva, the gelling and the watery saliva. A small amount of gelling saliva, known as salivary flange, is produced on the surface of leaves at the site of stylets insertion into the leaf cuticle (Nault and Gyrisco 1966). The gelling saliva is also secreted in the apoplast to form a protective salivary sheath surrounding the stylet bundle all along its pathway towards the SE (Miles 1999). Along the path to the vascular bundle, aphids use their stylets to probe epidermis and mesophyll cells. Recently, Jimenez et al. (Jiménez et al. 2018) found that distinct brief (4-5 sec) intracellular punctures may also occur in the phloem, in both companion and sieve element cells. Within each probe stylets puncture through the cell wall and cell membranes and reach the cell cytoplasm, excrete watery saliva, acquire some cell content and then retract. When the stylets reach and remain in the SE, larger amount of watery saliva is secreted followed by sustained phloem feeding (Tjallingii 2006).

The sheath and watery saliva of aphids are shown to contain a diversity of proteins, including those that are likely to modulate plant processes as effectors (Hogenhout and Bos 2011).

Genome and transcriptome mining approaches and mass spectrometry analyses of saliva have contributed to the identification of aphid effectors, of which only a few are functionally characterized (recently described in Boulain et al. 2018). They are produced in salivary glands, transit through aphid stylets and are flushed out into the plant. The first effector described was *A. pisum* C002 (ApC002) that is abundantly present in plant tissue. RNAi-mediated knockdown of ApC002 causes high aphid mortality and reduced sustained phloem feeding (Mutti et al. 2006 and 2008). Since then, RNAi-mediated gene silencing or *in planta* overexpression of salivary proteins allowed the identification of other effectors that modulate plant defenses or improve aphid performances such as Mp10, PintO1, ACE1, Ap25, Armet or MIF1 (Bos et al. 2010; Pitino and Hogenhout 2013; Rodriguez et al. 2014; Naessens et al. 2015; Wang et al. 2015a; Wang et al. 2015b; Guy et al. 2016). MpC002 and Mp10 were shown to be delivered inside plant tissues during aphid feeding. However, they were detected by immunogold labeling of ultrathin sections of plants at different locations. The effector MpC002 was found associated with the sheath saliva in the apoplast, whereas the effector Mp10 was detected in the cytoplasm of mesophyll cells adjacent to aphid stylets (Mugford et al. 2016). How aphids deliver these effectors in specific tissues or plant cells is unknown.

Recent microscopy studies discovered the acrostyle, a distinct anatomical cuticular structure at the tip of aphid maxillary stylets, located in the common food/salivary canal (Uzest et al. 2010). Five cuticular proteins, named stylins, have been identified at the surface of the acrostyle, of which Stylin-01 was shown to be key for *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) transmission (Webster et al. 2018; Deshoux et al. 2020). CaMV is specifically retained on and released from the acrostyle within seconds (Moreno-Lozano et al. 2005; Uzest et al. 2007; Uzest et al. 2010). The acrostyle (and stylins) strongly suspected to bear receptors of numerous noncirculative plant viruses (Powell 2005; Uzest et al. 2007), may have other functions in aphids. We hypothesized that it could bind and release effectors through protein-protein specific interactions, contributing thereby to efficient delivery of effectors at appropriate timing and in the targeted cells/tissues.

Here, we show evidence of a role of the acrostyle and stylins in binding the effector Mp10. We found that the effector Mp10, which was detected in mesophyll cytoplasm at aphid feeding sites, interacts with Stylin-03 and binds to the acrostyle. Moreover, stylin-RNAi moderately impacted aphid feeding behavior, particularly the salivation into plant cells or vascular tissues. The role of the acrostyle in effector delivery will be discussed.

RESULTS

Stylin-03 interacts with the effector Mp10 in yeast

We previously identified five cuticular proteins (stylins 01 through 05) to be localized to the acrostyle at the tip of aphid stylets (Deshoux et al. 2020). To investigate whether stylins bind aphid effectors, we conducted yeast two-hybrid assays of these five stylins and a number of effectors. The latter include Mp10 of *M. persicae* and its *A. pisum* homolog (for clarity, these are henceforth called Mp10_Mpersicae and Mp10_Apisum), as well as PintO1, C002, Armet, ACE1, Ap25 and MIF1 of *A. pisum*.

Yeast growth was detected for Ap_Stylin-03 vs Mp10_Mpersicae and Ap_Stylin-03 vs Mp10_Apisum transformations (Fig. 1A and B), unlike other combinations (Supplementary Fig. S1). Therefore, Stylin-03 interacts with Mp10 in both aphid species.

Mp10 binds to the acrostyle of *A. pisum* and *M. persicae*

Because Stylin-03 was found localized to the acrostyle (Deshoux et al. 2020), we investigated if Mp10 binds to the organ. Purified effectors and the control proteins bovine serum albumin (BSA) and thioredoxin (TRX), were conjugated to Alexa Fluor 488 and incubated onto dissected stylets in a one-step protocol to allow their direct visualization under epifluorescence microscopy without the need for further immunological detection. As fluorescence on dissected stylets is hardly quantifiable, stylets were scored « labeled » when fluorescence was detected at the acrostyle, regardless of the intensity of fluorescence.

Incubation of dissected stylets with proteins Mp10, BSA and TRX (labeled with Alexa Fluor 488) showed that the Mp10 proteins interacted with more stylets than the control proteins, in both aphid species (Fig. 2A-C). Hence, the number of labeled *A. pisum* stylets was significantly higher after incubation with Mp10_Apisum (51%) than BSA (2%) or TRX (17%). Similarly, 56% of *M. persicae* stylets were labeled when incubated with Mp10_Mpersicae, whereas only 15% and 21% were labeled for BSA and TRX, respectively.

To test if Stylin-03 at the surface of the acrostyle was involved in Mp10 binding, we used RNAi to silence Stylin-03 in *M. persicae* (Fig. 2D). Stylets of Stylin-03-silenced aphids and control aphids were then dissected and incubated with Mp10_Mpersicae. 53% of stylets of aphids fed

on control siRNA (NC) were labeled; indicating that feeding on siRNA did not affect the capacity of aphid stylets to interact with Mp10. By contrast, the number of stylets labeled at the acrostyle was significantly reduced by 36% when aphids were fed on Sty03-siRNA diets compared with control aphids (Fig. 2E). These experiments demonstrate that the effector Mp10 binds to the acrostyle in aphid stylets, likely through Stylin-03 direct interaction.

Impact of siRNA targeting *stylin-03* or *stylin-01* gene expression on *M. persicae* feeding behavior

Therefore, two Stylins are likely involved in interactions with proteins at the surface of the acrostyle, Stylin-03 and Stylin-01 (Webster et al. 2018). To investigate a possible role of these two proteins in the feeding process, we knocked down their expression in *M. persicae* by feeding nymphs on artificial diets containing siRNA complementary to the Stylin-03 or Stylin-01 sequence for 3 days, and then transferred the aphids to plants for the Electrical Penetration Graph (EPG) technique (Tjallingii 1988 and 2006), following the experimental design optimized in our laboratory for Stylin-01 (Webster et al. 2018). Several sequential and non-sequential variables including probing, salivation into SE and passive uptake of phloem sap are shown (Figure 3; Supplementary Table S1).

While in these series of experiments RNAi treatments had no impact on Stylin-03 transcripts (see Discussion), Stylin-01 transcripts were significantly reduced by 38% (Fig. 3A and F). Noticeably, despite contrasted effects on *stylins* transcripts, a few variables were impacted in the two silenced cohorts (Fig. 3). Duration of the intracellular punctures (recorded as potential drop, i.e. ‘pd waveform’) per event and per insect was significantly longer for Sty03-siRNA-treated aphids, due to an increase in the mean duration of sub-phase II-2 (1.41 ± 0.17 s vs 1.28 ± 0.17 s), whereas sub-phases II-1 and II-3 remained unchanged (Fig. 3B). The duration of the entire intracellular puncture was not impacted for Sty-01-si-RNA-treated aphids. However, sub-phase II-2 was also significantly longer for silenced aphids when compared with control groups (1.14 ± 0.13 s vs 1.01 ± 0.26 s) (Fig. 3G). The function of sub-phase II-2 is unknown (Wróblewska-Kurdyk et al. 2019), but this sub-phase has been associated with CaMV release into plant cells, and likely to intracellular salivation (Moreno et al., 2012). Interestingly, variables related to salivation into phloem SE (E1 waveforms) were also significantly impacted. Hence, the duration of E1 followed by the first E2 increased by 39.5% for Stylin-03-silenced aphids when compared with control groups (79.02 ± 15.34 s vs 56.65 ± 12.56 s) (Fig. 3D), and the mean duration of E1 waveforms was more than 30% longer in Stylin-01-silenced aphids

when compared with control groups (74.19 ± 7.39 s vs 56.11 ± 4.65 s) (Fig. 3H). Finally, time spent ingesting phloem sap (E2 waveform), was the same in Stylin-03 or Stylin-01-silenced aphids and control groups (Fig. 3E and J, respectively).

Impact of siRNA targeting *stylin-03* or *stylin-01* gene expression on *M. persicae* longevity and fecundity

To assess whether RNAi treatments impacted aphid performance, we determined the survival rate and fecundity of silenced and control aphid groups. In this experiment, the accumulation of *stylin-01* and *stylin-03* transcripts significantly decreased by 95% for aphids fed with Sty01-siRNA and by 46% for those fed with Sty03-siRNA, respectively (Fig. 4A and B).

The mean of total nymphs produced by 10 apterous adults over the 15 days of recording were similar in the three groups, with 36 ± 1.9 nymphs produced for control aphids and Stylin-01-silenced aphids, and 32.7 ± 3.8 nymphs produced for Stylin-03-silenced aphids (Fig. 4C). In the same way, longevity monitored over 22 days was similar in all aphid groups (Fig. 4D). Despite a strong reduction in *stylin-01* or *stylin-03* mRNA level, RNAi treatments did not affect aphid longevity and fecundity. These results are consistent with the experiments that showed no impact on feeding behavior variables linked to phloem ingestion.

DISCUSSION

The acrostyle, discovered ten years ago, is a well-defined anatomical structure with unique surface properties different from the rest of the cuticle of aphid stylets (Uzest et al. 2010; Deshoux et al. 2020). This organ is restricted to a region of the common canal of the stylet, downstream the food and salivary canals, and is in contact with diverse fluids and compounds. It was first characterized because of its ability to interact with a viral protein ensuring retention of a noncirculative virus during its transport from one plant to another (Uzest et al. 2007). Virus binding is transient, and occurs during brief intracellular punctures (recorded as potential drops or pds) in infected cells lasting few seconds (Palacios et al. 2002). Release of virus particles from aphid stylets is also a fast process, viruses being mostly inoculated into plant cells during the first pd (Moreno et al. 2012). The role of the acrostyle for the aphid was totally unexplored. Recent results on its surface composition, however, brought new opportunities to investigate its function through the search of stylin partners at the surface of the acrostyle (Webster et al. 2018; Deshoux et al. 2020).

In this study, we first conducted a candidate gene approach in the yeast two-hybrid system to find partners of the five stylins among a subset of partly characterized effectors. We evidenced an interaction between a cuticular protein, the RR-1 protein Stylin-03, and an effector from aphid saliva, Mp10. Moreover, binding of Mp10 on the acrostyle of dissected stylets confirmed the ability of stylins to interact with effector molecules. Ingestion of siRNA targeting specifically Stylin-03 mRNA resulted in acrostyle binding-deficient phenotype, therefore supporting Stylin-03 as Mp10-binding protein at the surface of the acrostyle.

The effector Mp10 belongs to the chemosensory protein (CSP) family, also known as OS-D-like proteins (Bos et al. 2010). Mp10 is known to suppress the reactive oxygen species (ROS) burst triggered specifically by the bacterial MAMP flg22 (Bos et al. 2010), suggesting that this effector could be a suppressor of PTI (Plant Triggered Immunity) in plant. Mp10 is a conserved effector gene, with low evolutionary rate, and may therefore be involved in fundamental function, and modulation of general plant defenses (Boulain et al. 2018; Drurey et al. 2019). Consistently, we observed Stylin-03-Mp10 interaction and binding of Mp10 on the acrostyle for two aphid species, *M. persicae* and *A. pisum*. Therefore, Mp10-acrostyle interaction is not specific to a single aphid species.

Why would Mp10 need to bind transiently to the acrostyle? Why would the acrostyle retain Mp10? We could speculate that binding the acrostyle would be a way to reach a concentration threshold required for effective and fast action in plant cells. Another hypothesis would be that binding the acrostyle would ensure optimized delivery in the targeted tissue in which Mp10 functions, and not elsewhere. We propose a model in which the acrostyle would act as a regulator of Mp10 delivery into mesophyll cells (Fig. 5), where it has been detected (Mugford et al., 2016), and hence would participate actively to plant-aphid interactions. Mp10 would be secreted in the first phases of the aphid feeding process together with the gelling saliva that forms the salivary flange or the salivary sheath. Indeed, the Mp10 activity in suppressing plant defense responses occurs over the same timescale as the aphid feeding phases implicated in Mp10 delivery (Bos et al. 2010; Drurey et al. 2019). While the stylets navigate into the apoplast, some of the egested Mp10 molecules would bind to Stylin-03 at the surface of the acrostyle. When the stylets penetrate plant cells for probing cell content, all bound Mp10 would be released from the acrostyle and flushed out into the cytoplasm with watery saliva. Disruption of effector-stylin interaction may be favored by local changes in saliva composition or shift in

pH (Miles 1999) that could induce conformational changes of Mp10. CSP have been shown to operate drastic conformational changes when bound to their ligand (Campanacci et al. 2003).

Our silencing experiments further suggest that other stylins may be involved in the aphid feeding process. Silencing in aphids is notoriously highly variable and not always efficient (Christiaens et al. 2014; Kanakala and Ghanim 2016; Mulot et al. 2016). It is the case for effectors, as exemplified for C002 (Mutti et al. 2006; Christiaens et al. 2014), and for genes encoding cuticular proteins (Liang and Gao 2017; Webster et al. 2018; Bahrami Kamangar et al. 2019), as we can also attest with the present study. Moreover, it is extremely difficult to correlate the transcript level of *stylin* genes in whole aphids to the quantity of stylins in the acrostyle, rendering functional validation and interpretation of the data highly challenging. However, our results clearly showed that feeding aphids on siRNA targeting Stylin-01 or Stylin-03 expression, whatever the measured effect on transcript levels, led to similar changes in aphid feeding behavior. Treated aphids have longer subphase II-2 during intracellular punctures and they salivate longer when they reach the phloem SE. The differences observed are sometimes low, particularly for subphase II-2, and their biological significance may be questioned since no impact was observed on aphid performance. The silencing efficiency was not optimal in our experimental conditions, and we can wonder whether a stronger reduction of *stylin* genes expression would amplify the phenotypes observed. Besides, the acrostyle contains several stylins from the same subfamily (CPR_RR-1 proteins), some of which share high degrees of identity, with potentially functional redundancy (Webster et al. 2018; Deshoux et al. 2020). Therefore, we cannot exclude that other stylins may partly compensate a reduced amount of Stylin-01 or Stylin-03 in the acrostyle. Nonetheless, what we should retain from our data is that the variables impacted by RNAi treatments are related to salivation into different plant tissues.

Altogether, our results support the role of the acrostyle as a regulator of effector delivery. A first effector, Mp10, was shown to bind the acrostyle. It will be interesting to further investigate if other effectors are susceptible to be retained in the same way or to interact with other stylins. Our previous studies already demonstrated that the acrostyle harbors virus receptors at the surface of the stylet cuticle (Uzest et al. 2007; Uzest et al. 2020; Webster et al. 2018). We here reveal another facet of its binding capacity and bring evidences of its role in effector delivery.

MATERIALS AND METHODS

Aphid colonies

All aphid species were reared in an environmental growth chamber at a temperature of 23/18°C and a photoperiod of 14/10 h (day/night). *Myzus persicae* Sulzer and *Acyrtosiphon pisum* LL01 colonies were maintained on *Solanum melongena* var. Barbentane and on *Vicia faba* var. Aguadulce, respectively.

Yeast two-hybrid constructs and assays

Cuticular proteins of the acrostyle used in this study were: Stylin-01 (ACYPI009006), Stylin-02 (ACYPI003649), Stylin-03 (ACYPI001610), Stylin-04 (ACYPI002877) and Stylin-05 (ACYPI007911) from *A. pisum* and their orthologs in *M. persicae*. Genes encoding mature proteins without signal peptides were obtained from cDNA amplification.

Open reading frames (ORFs) of *A. pisum* effectors lacking the signal peptide sequences used in this study were amplified from various plasmids: Armet (ACYPI008001) and ACE1 (ACYPI000733) from plasmids kindly provided by Dr Feng Cui (Wang et al. 2015a; Wang et al. 2015b); Ap25 (ACYPI009919) from a plasmid kindly provided by Dr Akiko Sugio (Guy et al. 2016). Sequences of C002 (ACYPI008617; Mutti et al. 2006), MIF1 (ACYPI002465; Naessens et al. 2015), PintO1 (ACYPI6346; Pitino and Hogenhout 2013) from *A. pisum*, and Mp10 from *M. persicae* were synthesized and cloned in plasmid-based transfer vectors by Proteogenix (Schiltigheim, France). In addition Mp10-like was amplified from *A. pisum* cDNA (Bos et al. 2010).

All sequences were PCR amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) and specific primers containing SapI restriction site at their 5' end (listed in Supplementary Table S2). They were further cloned in pGADT7 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) and pLexAN (Dualsystems Biotech, Zurich, Switzerland) modified plasmids (modifications described in supplementary material). Effector sequences were introduced downstream of the GAL4 activation domain (AD) in pGADT7-GG plasmid, while stylin sequences were introduced downstream of the LexA binding domain in pLexAN-GG plasmid using SapI restriction sites. The two plasmids pGADT7-GG-6His (six histidine residues fused to AD) and pLexAN-GG-6His (six histidine residues fused to the DNA-binding domain) were used as negative controls. All constructs were confirmed by sequencing.

pGADT7-GG and pLexAN-GG derived-constructs were co-transformed in the NMY51 yeast strain. Interactions were identified following the procedures described in the DUALhunter kit user manual (Dualsystems Biotech). Co-transformants were first selected onto a synthetic defined (SD) medium lacking leucine and tryptophan [-LW]. Colonies were then screened on a selective SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA] to identify interactions. Petri dishes were incubated at 28°C for 4 days.

Constructs, production and labeling of Mp10 for detection on insect stylets

Sequences encoding Mp10_Mpersicae or Mp10_Apisum mature proteins, amplified by PCR as described above, were cloned in the plasmid pETtrx1b (EMBL, Heidelberg, Germany) in fusion with a histidine tag and the gene encoding Thioredoxin (HisTRX-Mp10), using XhoI and NcoI restriction sites. All constructions were verified by sequencing. HisTRX-Mp10 fusions were produced in *E. coli* BL21 strain by induction of bacterial cultures at OD₆₀₀ = 0.6 with 0.5 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37 °C. Cell pellets were resuspended in 15 ml of phosphate-buffered saline buffer [4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3] supplemented with 1 mM Dithithreitol (PBS-DTT buffer) and 10 mM imidazole, sonicated, and incubated for 1 h at 4 °C. Cell debris were removed by centrifugation for 10 min at 12,000 g. The soluble fraction was stirred 1 h with 2 ml of Ni-nitrilotriacetic resin (Qiagen, Hilden, Germany) previously equilibrated with PBS-DTT buffer, transferred to a 5 ml column, and rinsed with 10 volumes of PBS-DTT buffer. Mp10 was finally eluted using 2 ml of PBS-DTT buffer supplemented with 500mM imidazole, dialyzed overnight in PBS-DTT buffer, and cleaved from the histidine tag and thioredoxin using AcTEV protease (Thermo Fisher Scientific, Rockford IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified Mp10 was adjusted to a final concentration of 1mg/mL, and further conjugated to Alexa Fluor 488 dye using Alexa Fluor 488 Microscale Protein Labeling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions.

In addition, His-TRX, produced in the same system, and bovin serum albumin (BSA, Promega Corporation, Madison, WI) were conjugated as described above, and used as negative controls in our experiments.

***In vitro* interactions between Mp10 and dissected aphid stylets**

Stylets from adult aphids were dissected, individualized and put on siliconized cover slides as previously described (Uzest et al. 2007). Stylets from *M. persicae* or *A. pisum* were incubated

with 10 µg of Alexa Fluor 488-conjugated Mp10 (488-Mp10) or Alexa Fluor 488-conjugated Mp10-like (488-Mp10-like), respectively, in 290 µl of MES buffer (50 mM MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid], pH 5.8 supplemented or not with 1mM DTT) for an incubation period of 2-4 h at room temperature in the dark. To maximize the chance of observing even labile interactions, we specifically designed a one-step incubation protocol and avoid extensive rinses. In parallel, Alexa Fluor 488-conjugated His-TRX (488-TRX) or Alexa Fluor 488-conjugated BSA (488-BSA) were incubated onto *A. pisum* and *M. persicae* stylets as controls. Stylets were observed with an Olympus BX60 microscope equipped for epifluorescence. To generate statistical meaningful data, for each series of experiments all stylets were incubated using identical microscope settings. Between 3 and 5 independent replicates were performed with a total of 41 to 61 stylets observed for each condition (488-Mp10, 488-TRX, 488-BSA) and each aphid species (*A. pisum* and *M. persicae*). In addition, stylets from Stylin-03-silenced *M. persicae* (see below for RNAi experiments) and stylets from control aphids were incubated with 488-Mp10. Four independent experiments were performed and a total of 58 to 76 stylets were observed.

RNA interference

To silence *stylin-03* and *stylin-01* gene expressions, short interfering RNA (siRNA) specifically targeting *stylin-03* mRNA, *stylin-01* mRNA (Sty03-siRNA, Sty01-siRNA, respectively; see sequences in Supplementary Table S2) or negative control siRNA (NC-siRNA, SR-CL000-005, Eurogentec) were delivered through a sachet to cohorts of *M. persicae* aphids at a final concentration of 1 µM in the diet, as already described (Webster et al. 2018). As maxillary stylets are cell-free tissues, RNAi treatments were applied to nymphs to target the stylet-secreting glands during stylet synthesis. Phenotypes were evaluated on neo-synthesized stylets i.e., at least after one molting event post-siRNA delivery. Although they may not reflect the silencing in the retort organs, *stylin* transcript levels were quantified in whole insects as a proxy for silencing efficiency. To evaluate the impact of siRNA treatments on feeding behavior, 3-day-old synchronized nymphs were fed for 72 h on siRNA artificial diets. The impact of siRNA treatments on aphid fitness and on stylets-binding capacity was evaluated on adults to ensure that stylets remained unchanged throughout the entire experiment, and to facilitate dissection of mouthparts. To that end, 1-day-old synchronized aphids were first fed for 72 h on artificial diet lacking siRNA. Aphids were then transferred for 72 h on a second diet containing Sty01-

siRNA, Sty03-siRNA or NC-siRNA. In these conditions, aphids became adults with their definitive stylets at the end of the treatment.

Real-time quantitative PCR

Aphids were collected after 48h on siRNA artificial diets. Total RNA was extracted from pools of ten aphids using the RNAeasy mini kit (Qiagen, Hilden Germany). 300 ng of total RNA was then treated with RQ1 RNase-Free DNase I (Promega Corporation, Madison, WI) and reverse-transcribed using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI) and oligo(dT) as primer. Real-time Quantitative PCR (qPCR) was performed in duplicates on a LightCycler 480 instrument using a LightCycler 480 SYBR green master mix (Roche, Penzberg, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The gene-specific primers used are listed in Table S2. Amplification efficiencies were analyzed with LinRegPCR free software (v. 2014.5) (Ruijter et al. 2009). Expression ratios were normalized with two internal reference genes encoding *actin* and *elongation factor 1 α* (EF1 α) from *M. persicae* and were calculated using the threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) method (Livak and Schmittgen 2001).

Analysis of aphid feeding behavior

In total, 18 to 21 silenced aphids were put individually on *Arabidopsis thaliana* and monitored for 8 h using EPG (Tjallingii 1988 and 2006). Each plant was used only once and replaced for each aphid. Silenced aphids were attached to the gold wire of an insect electrode using water-based silver conductive paint glue (EPG Systems, Wageningen, Netherlands). Wired aphids were kept on air for a fasting period, and then placed on the adaxial side of a leaf and connected to the EPG Device. The feeding behavior was recorded by a Giga-8 DC-EPG device (EPG Systems, Wageningen, The Netherlands). EPG data were acquired and analyzed using Stylet+software for Windows (EPG Systems) inside a Faraday cage to prevent electrical noise. EPG data were acquired and analyzed using Stylet+software for Windows (EPG Systems). The EPG-Excel Data Workbook developed by Sarria et al. (2009) was used to process the following EPG variables: Waveform np (non-probing behavior), C (intercellular apoplastic stylet pathway when stylets penetrate leaf tissue), pd (potential drop corresponding to short intracellular puncture), E1 (continuous salivation into phloem sieve elements before phloem ingestion), and E2 (passive phloem sap uptake from the sieve elements). They were calculated as described by Backus et al. (2007): PPW, proportion of individuals that produced a specific waveform type;

NWEI, number of waveforms per insect; WDI, waveform duration per insect; WDEI, waveform duration per insect and per event.

Aphid life table statistics

Single wingless silenced *M. persicae* adults were placed in a clip cage on the adaxial side of 6-week-old eggplant leaves. For each silencing treatment, survival of 25 to 30 aphids was followed daily over a 22-day period, and 10 individuals alive throughout the recording period were followed for nymph production. Newborn instars were counted daily and removed over a 15-day period.

Statistical analysis

All statistical analyses were carried out with R software (v. 3.4.1), with values of $p < 0.05$ considered as being statistically significant. Stylets labeling was compared using generalized linear models (GLM with binomial error, logit link function) and the chi-square test. Post hoc pairwise comparisons were made using Tukey contrasts (*multcomp* package in R). Statistical significance for transcript levels and fecundity were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences in EPG variables were analyzed using a Welch t-student test (parametric data) or by a Mann-Whitney t-test (non-parametric data). Results of each statistical test are indicated in the figure legends. Results of each statistical test are indicated in the figure legends.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge Drs Feng Cui, Akiko Sugio, and Christine Coustau for providing plasmids or antibodies. We thank Sophie Le Blaye and Alexandre Morisset for technical assistance. We are grateful to Yvan Rahbé and Freddy Tjallingii for fruitful discussions.

FUNDING

This work was supported by a grant from the Bill and Melinda Gates Foundation (GCEag, OPP1130147) and the French National Research Agency (ANR15-CE20-0011).

LITERATURE CITED

- Backus, E. A., Cline, A. R., Ellerseick, M. R., Serrano, M. S. 2007. *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) Feeding on Cotton: New Methods and Parameters for Analysis of Nonsequential Electrical Penetration Graph Data. *an.* 100:296–310
- Bahrami Kamangar, S., Christiaens, O., Taning, C., De Jonghe, K., and Smagghe, G. 2019. The cuticle protein MPCP2 is involved in Potato virus Y transmission in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Plant Diseases and Protection -New Series-*:1-7.
- Blackman, L.M., and Eastop, V.F. 2000. *Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide.* , Chichester.
- Bos, J.I.B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M.E., Win, J., and Hogenhout, S.A. 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet* 6:e1001216.
- Boulain, H., Legeai, F., Guy, E., Morlière, S., Douglas, N.E., Oh, J., Murugan, M., Smith, M., Jaquiéry, J., Peccoud, J., White, F.F., Carolan, J.C., Simon, J.-C., and Sugio, A. 2018. Fast Evolution and Lineage-Specific Gene Family Expansions of Aphid Salivary Effectors Driven by Interactions with Host-Plants. *Genome Biol Evol* 10:1554-1572.
- Campanacci, V., Lartigue, A., Hällberg, B.M., Jones, T.A., Giudici-Ortoni, M.-T., Tegoni, M., and Cambillau, C. 2003. Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:5069-5074.
- Christiaens, O., Swevers, L., and Smagghe, G. 2014. DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53:307-314.
- Dedryver, C.A., Le Ralec, A., and Fabre, F. 2010. The conflicting relationships between aphids and men: a review of aphid damage and control strategies. *C R Biol* 333:539-553.
- Deshoux, M., Masson, V., Arafah, K., Voisin, S., Guschinskaya, N., van Munster, M., Cayrol, B., Webster, C.G., Rahbé, Y., Blanc, S., Bulet, P., and Uzest, M. 2020. Cuticular Structure Proteomics in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* Reveals New Plant Virus Receptor Candidates at the Tip of Maxillary Stylets. *Journal of Proteome Research* 19:1319-1337.
- Drurey, C., Mathers, T.C., Prince, D.C., Wilson, C., Caceres-Moreno, C., Mugford, S.T., and Hogenhout, S.A. 2019. Chemosensory proteins in the CSP4 clade evolved as plant immunity suppressors before two suborders of plant-feeding hemipteran insects diverged. *bioRxiv*:173278.
- Guy, E., Boulain, H., Aigu, Y., Le Pennec, C., Chawki, K., Morlière, S., Schädel, K., Kunert, G., Simon, J.-C., and Sugio, A. 2016. Optimization of Agroinfiltration in *Pisum sativum* Provides a New Tool for Studying the Salivary Protein Functions in the Pea Aphid Complex. *Frontiers in plant science* 7:1171-1171.
- Hogenhout, S.A., and Bos, J.I.B. 2011. Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* 14:422-428.
- Jiménez, J., Tjallingii, W.F., Moreno, A., and Fereres, A. 2018. Newly Distinguished Cell Punctures Associated with Transmission of the Semipersistent Phloem-Limited Beet Yellow Virus. *Journal of virology* 92:e01076-01018.
- Kanakala, S., and Ghanim, M. 2016. RNA Interference in Insect Vectors for Plant Viruses. *Viruses* 8.
- Liang, Y., and Gao, X.W. 2017. The Cuticle Protein Gene MPCP4 of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) Plays a Critical Role in Cucumber Mosaic Virus Acquisition. *J Econ Entomol* 110:848-853.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25:402-408.

- Miles, P.W. 1999. Aphid saliva. *Biol. Rev.* 74:41-85.
- Moreno, A., Tjallingii, W.F., Fernandez-Mata, G., and Fereres, A. 2012. Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *Journal of General Virology* 93:662-667.
- Moreno-Lozano, A., Palacios, I., Blanc, S., and Fereres, A. 2005. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of Cauliflower mosaic virus by its major vectors, *Brevicorynae brassicae* and *Myzus persicae*. *Annals of the Entomological Society of America* In press.
- Mugford, S.T., Barclay, E., Drurey, C., Findlay, K.C., and Hogenhout, S.A. 2016. An Immuno-Suppressive Aphid Saliva Protein Is Delivered into the Cytosol of Plant Mesophyll Cells During Feeding. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 29:854-861.
- Mulot, M., Boissinot, S., Monsion, B., Rastegar, M., Clavijo, G., Halter, D., Bochet, N., Erdinger, M., and Brault, V. 2016. Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*. *Viruses* 8.
- Mutti, N.S., Park, Y., Reese, J.C., and Reeck, G.R. 2006. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Science* 6.
- Mutti, N.S., Louis, J., Pappan, L.K., Pappan, K., Begum, K., Chen, M.S., Park, Y., Dittmer, N., Marshall, J., Reese, J.C., and Reeck, G.R. 2008. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9965-9969.
- Naessens, E., Dubreuil, G., Giordanengo, P., Baron, O.L., Minet-Kebdani, N., Keller, H., and Coustau, C. 2015. A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune Responses. *Current biology : CB* 25:1898-1903.
- Nault, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses : a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:521-541.
- Nault, L.R., and Gyrisco, G.G. 1966. Relation of the Feeding Process of the Pea Aphid to the Inoculation of Pea Enation Mosaic Virus1. *Annals of the Entomological Society of America* 59:1185-1197.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., and Fereres, A. 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol* 83:3163-3171.
- Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., and Simon, J.-C. 2009. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:7495-7500.
- Pitino, M., and Hogenhout, S.A. 2013. Aphid Protein Effectors Promote Aphid Colonization in a Plant Species-Specific Manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions®* 26:130-139.
- Powell, G. 2005. Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *J Gen Virol* 86:469-472.
- Rodriguez, P.A., Stam, R., Warbroek, T., and Bos, J.I.B. 2014. Mp10 and Mp42 from the aphid species *Myzus persicae* trigger plant defenses in *Nicotiana benthamiana* through different activities. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 27:30-39.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* 37:e45-e45.
- Tjallingii, W.F. 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. Page 95_108 in: *Aphids: Their Biology. Nature Enemies and Control*, A.k. Minks, Harrewijn, P. J. (Eds.), ed. Elsevier, Amsterdam.

- Tjallingii, W.F. 1995. Regulation of Phloem Sap Feeding by Aphids. in: *Regulatory Mechanisms in Insect Feeding*, d.B.G. Chapman R.F., ed. Springer, Boston, MA.
- Tjallingii, W.F. 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J Exp Bot* 57:739-745.
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazevielle, C., Cot, D., and Blanc, S. 2010. The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 39:221-229.
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hebrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., and Blanc, S. 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17959-17964.
- Wang, W., Luo, L., Lu, H., Chen, S., Kang, L., and Cui, F. 2015a. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. *Scientific reports* 5:8885.
- Wang, W., Dai, H., Zhang, Y., Chandrasekar, R., Luo, L., Hiromasa, Y., Sheng, C., Peng, G., Chen, S., Tomich, J.M., Reese, J., Edwards, O., Kang, L., Reeck, G., and Cui, F. 2015b. Armet is an effector protein mediating aphid-plant interactions. *Faseb J* 29:2032-2045.
- Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., Deshoux, M., Gargani, D., Calevro, F., Jimenez, J., Moreno, A., Krenz, B., Thompson, J.R., Perry, K.L., Fereres, A., Blanc, S., and Uzest, M. 2018. Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *Journal of Virology* 92.
- Wróblewska-Kurdyk, A., Gniłka, R., Danciewicz, K., Grudniewska, A., Wawrzęńczyk, C., and Gabryś, B. 2019. β -Thujone and Its Derivatives Modify the Probing Behavior of the Peach Potato Aphid. *Molecules*. 24:1847

FIGURES

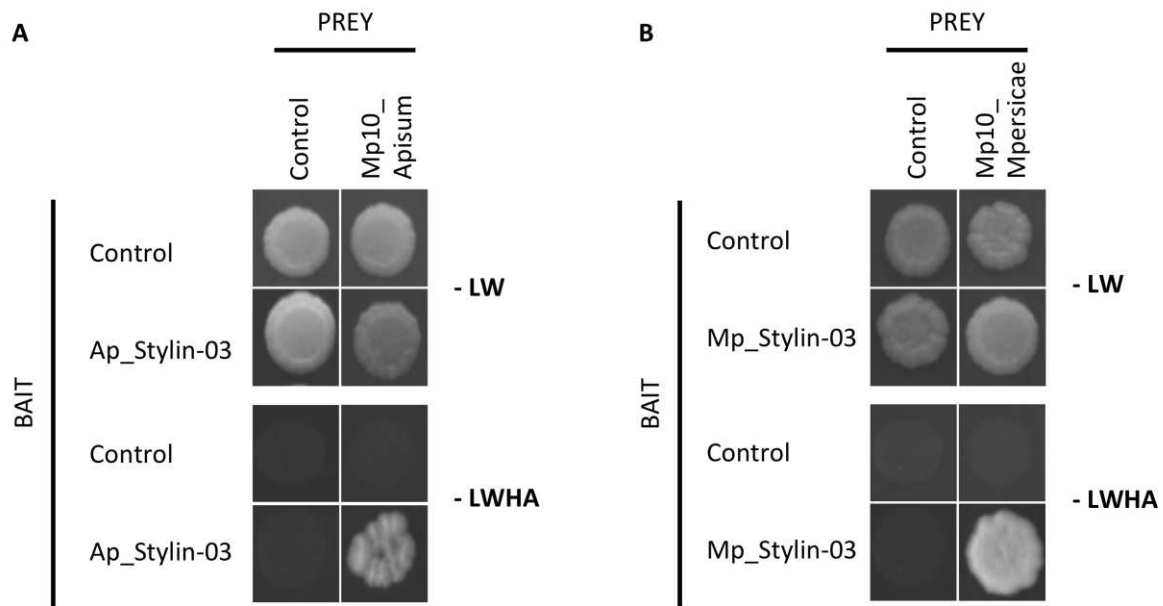


Fig. 1. The cuticular protein Stylin-03 interacts specifically with the aphid effector Mp10 in yeast. NMY51 yeast strains carrying the bait vector pLexAN containing Ap_Stylin-03 (from *A. pisum*) (A), or Mp_Stylin-03 (from *M. persicae*) (B) were transformed with the prey vector pGADT7 containing a saliva effector of the same aphid species (Mp10_Apisum and Mp10_Mpersicae, respectively). Strains were spotted on synthetic defined (SD) nonselective medium (-LW, lacking leucine and tryptophan) and SD selective medium (-LWHA, lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine) and incubated at 28°C for 4 days.

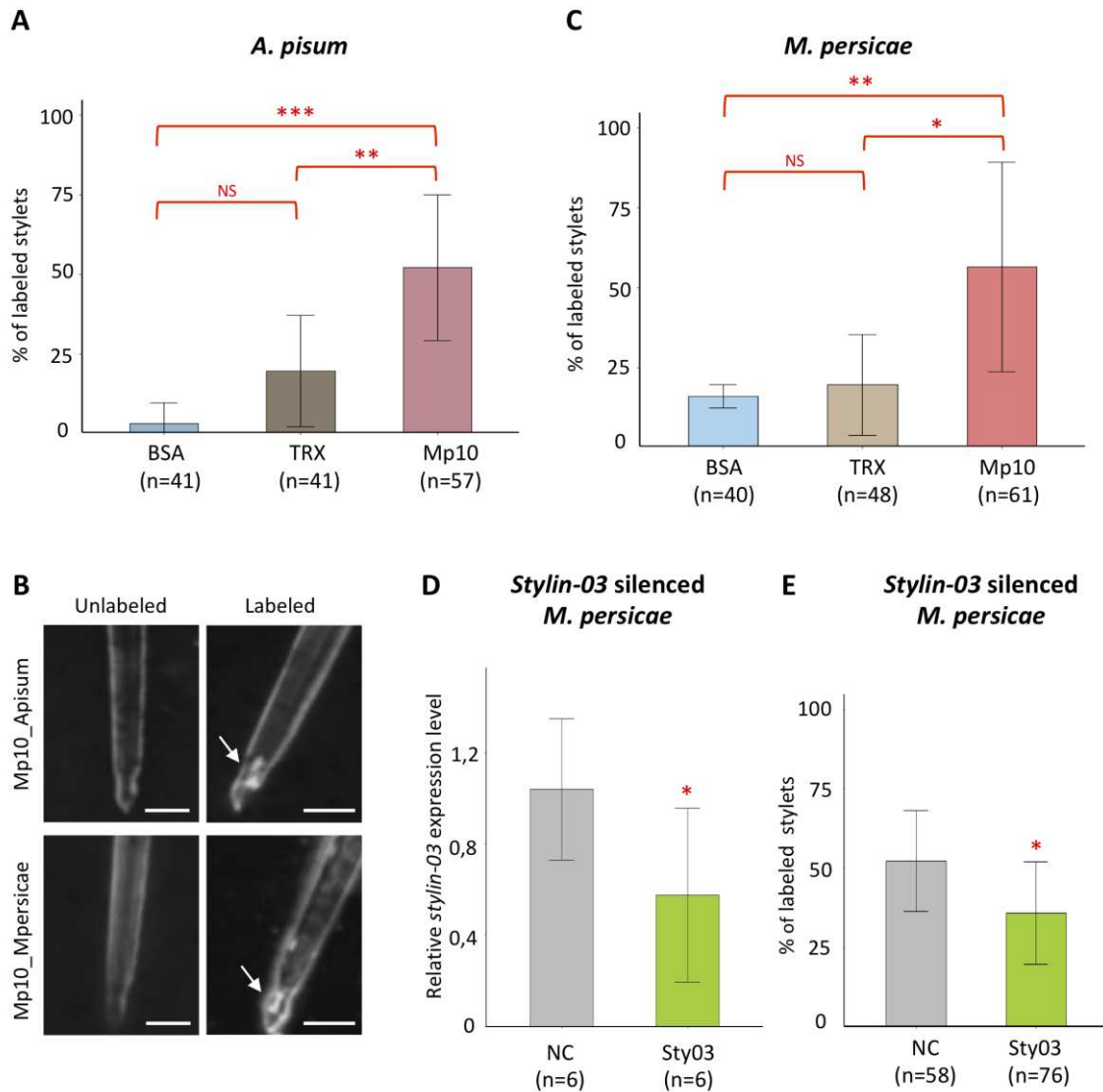
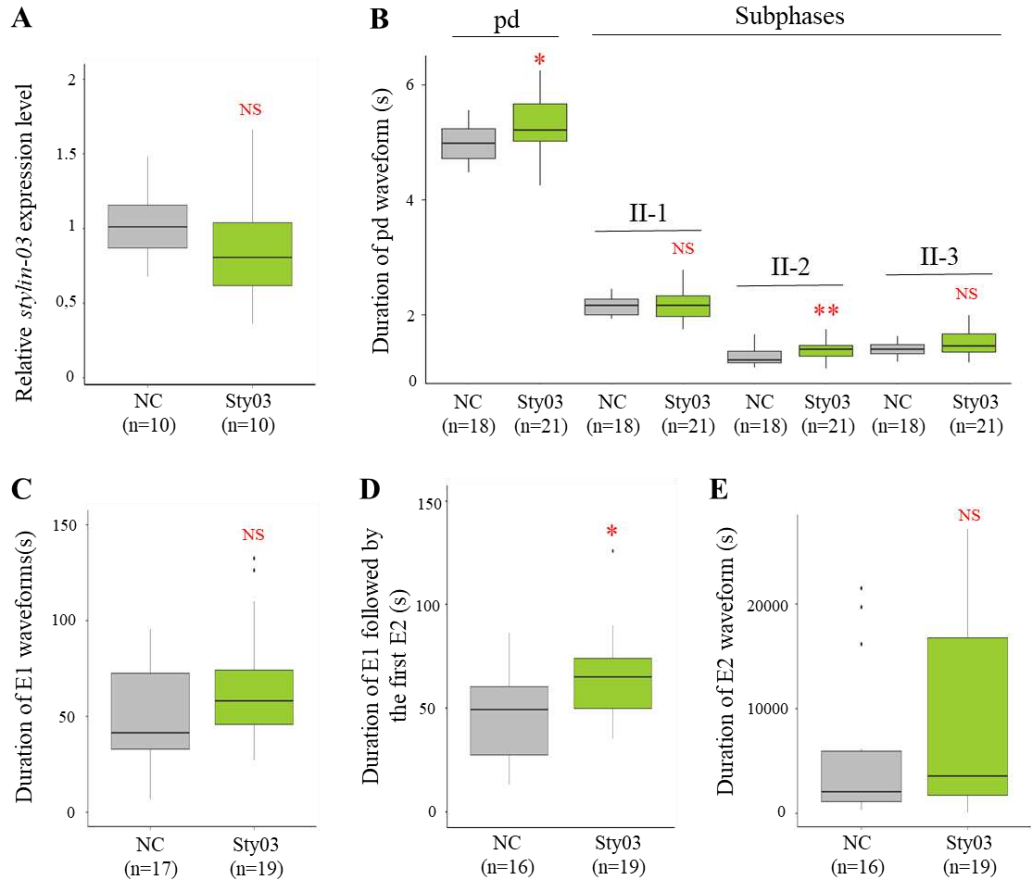


Fig. 2. Mp10 binds to the acrostyle of dissected stylets. **A**, Proportion of *A. pisum* stylets labeled on the acrostyle after incubation with BSA, TRX and Mp10 fused to a fluorochrome. The number of labeled stylets is significantly higher after incubation with Mp10_Apisum (51%) than BSA (2%) (Tukey tests, $p < 1 \times 10^{-3}$) or TRX (17%) (binomial GLM, Tukey tests, $p = 4 \times 10^{-3}$). BSA and TRX conditions do not differ significantly (Tukey tests, $p = 0.089$). **B**, Examples of different stylets observed after incubation with Alexa Fluor 488-labeled Mp10_Apisum and Mp10_Mpersicae. Half of the samples revealed fluorescence at the tip of maxillary stylets, on the acrostyle. Scale bars represent 5 μ m. **C**, The number of labeled *M. persicae* stylets is higher after incubation with Mp10_Mpersicae (56%) than BSA (15%) (Tukey tests, $p = 4 \times 10^{-3}$) or TRX (21%) (Tukey tests, $p = 0.013$). BSA and TRX conditions do not differ significantly (Tukey tests, $p = 0.76$). There is no difference between *M. persicae* and *A. pisum*, whatever the protein tested (Tukey tests, $0.46 < p < 1$). **D**, Transcript level of *stylin-03* normalized against two reference genes, the *actin* and *EF1a* genes. Relative expression level of *stylin-03* is reduced by 46% in treated *Myzus persicae* (Sty03-siRNA) compared with the control aphids (NC-siRNA) (ANOVA, $p = 0.044$). **E**, The number of labeled stylets is reduced by 36% when *M. persicae* aphids were treated with Sty03-siRNA (34%), compared with control *M. persicae* aphids treated with NC-siRNA (53%) (binomial GLM, $p = 0.025$). Number of observed stylets are indicated by n. Bars represent standard deviations. Asterisks indicate statistically significant differences as follows: ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. NS, not significant.

Stylin-03 silenced aphids



Stylin-01 silenced aphids

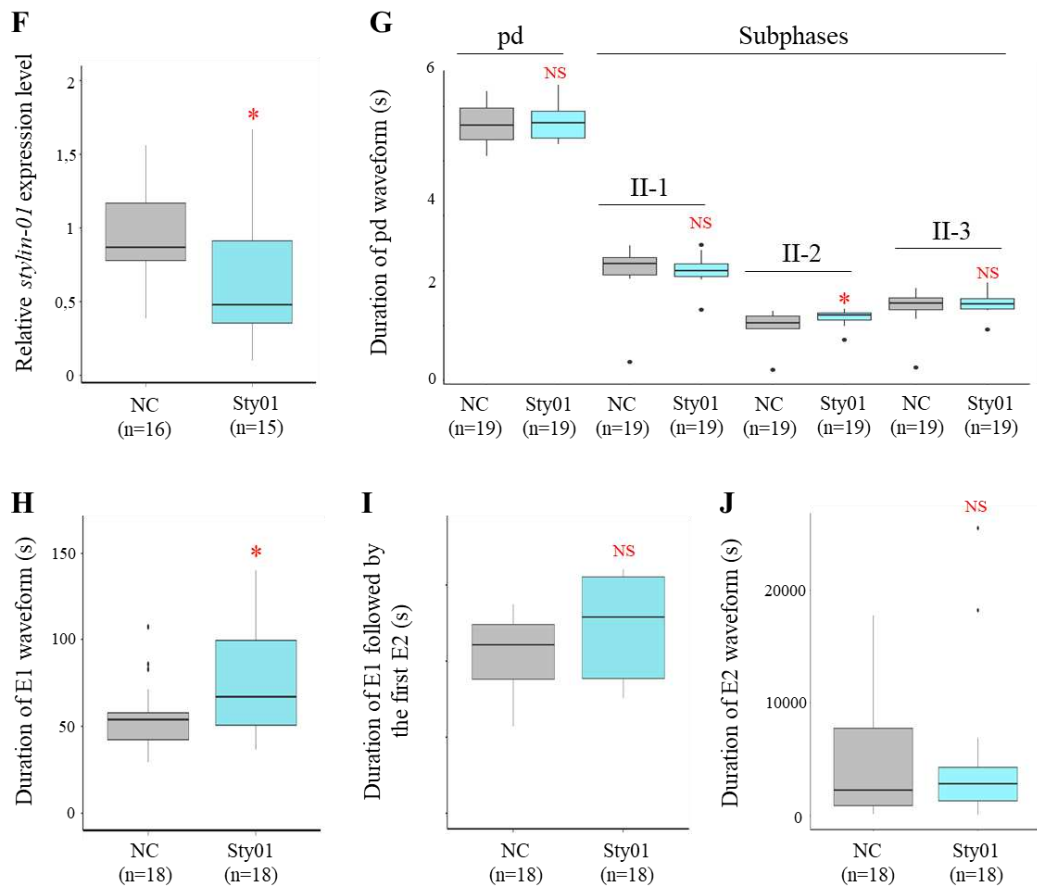


Fig. 3. Boxplots showing the consequence of *stylin-03* and *stylin-01* RNAi on *M. persicae* feeding behavior on *Arabidopsis thaliana* plants. **A-E**, Results associated with *stylin-03* gene knockdown (Sty03) compared to control groups (NC). **A**, Transcript level of *stylin-03* normalized against two reference genes, the actin and EF1 α genes in Sty03-siRNA-treated aphids compared with NC-siRNA group (n=10 pools of 10 aphids each). The relative expression level of *stylin-03* decreased by 20% in treated aphids when compared with control group. However, this reduction was not significant (ANOVA, p=0.26). **B**, Mean duration of intracellular punctures (potential drops, pds) and pd sub-phases (II-1, II-2, II-3). The mean duration of pd significantly increased in Stylin-03-silenced aphids when compared with control groups (Student t-test, p=0.026). This increase is due to sub-phase II-2 (Student t-test, p=10⁻³). The sub-phases II-1 and II-3 remained unchanged (Student t-test, II-1: p=0.53, II-3: p=0.10). **C**, Mean duration of E1 waveform, associated with salivation into phloem sieve elements. The mean duration of E1 increased for treated aphids when compared with control groups, but not significantly (Mann-Whitney test, p=0.093). **D**, Mean duration of E1 followed by the first E2. The duration of E1 followed by the first E2 increased significantly for treated aphids when compared with control groups (Mann-Whitney test, p=0.037). **E**, Mean duration of E2 waveform associated with passive ingestion of phloem sap. No significant difference was observed between the two groups (Mann-Whitney test, p=0.32). **F-J**: Results associated with *stylin-01* gene knockdown (Sty01) compared to control groups (NC). **F**, Transcript level of *stylin-01* normalized against two reference genes, the actin and EF1 α genes, in Sty01-siRNA-treated *M. persicae* compared with the NC-siRNA group (n=16 pools of 10 aphids each). The relative expression level of *stylin-01* significantly decreased by 38% in treated aphids (ANOVA, p=0.026). **G**, Mean duration of pds and pd sub-phases. The duration of pd was identical between conditions (Student t-test, p=0.87) but the sub-phase II-2 was longer in Stylin-01-silenced aphids when compared with control groups (Student t-test, p=0.040). The sub-phases II-1 and II-3 remained unchanged (Student t-test, II-1: p=0.50, II-3: p=0.85). **H**, Mean duration of E1 waveform. The mean duration of E1 significantly increased for treated aphids when compared with control groups (Student t-test, p=0.046). **I**, Mean duration of E1 followed by the first E2. No significant difference was observed between the two groups (Mann-Whitney test, p=0.104). **J**, Mean duration of E2 waveform. No significant difference was observed between the two groups (Mann-Whitney test, p=0.94). The number (n) of aphids recorded for each EPG variable is indicated in the x-axis. Asterisks indicate statistically significant differences as follows: ***, p<0.001; *, p<0.05. NS, not significant.

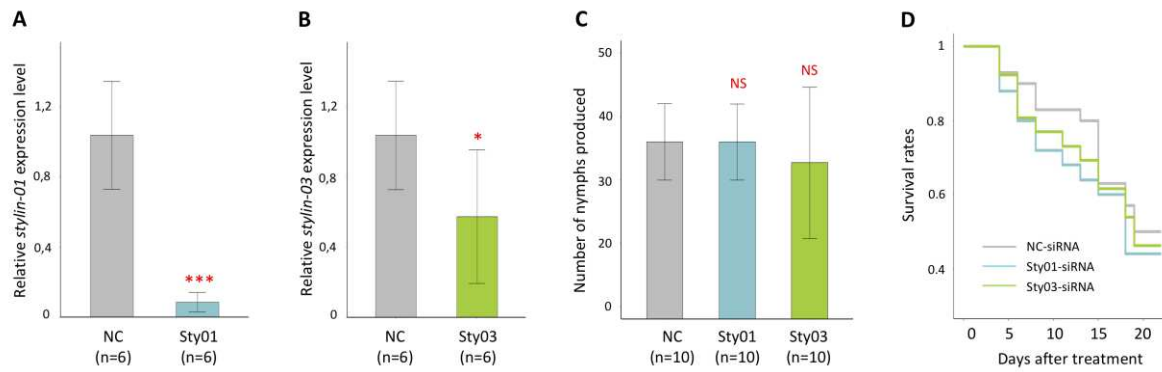


Fig. 4. Silencing *stylin-01* or *stylin-03* in *M. persicae* has no impact on aphid fecundity and longevity. **A-B**, Transcript level of *stylin-01* or *stylin-03* normalized against two reference genes, the *actin* and *EF1 α* genes. **A**, Relative expression level of *stylin-01* is significantly reduced by 95% in treated *Myzus persicae* (Sty01) compared with the control aphids (NC) (ANOVA, $p=2.2\times 10^{-5}$). **B**, Relative expression level of *stylin-03* (Sty03) is significantly reduced by 46% compared with the control aphids (ANOVA, $p=0.044$). **C**, Number of nymphs produced for each condition. Data shown are means (mean \pm standard deviation) of total nymphs produced over 15 days per apterous adult ($n=10$). No significant difference was observed between the three groups (ANOVA, $0.45 < p < 1.00$). **D**, Survival curves of treated aphids. The different lines represent the survival curves for the three groups of aphids. Results are reported as means ($n=30$, 25 and 26 aphids for NC, Sty01 and Sty03 groups, respectively). Asterisks in panels A and B indicate statistically significant differences as follows: ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. NS, not significant.

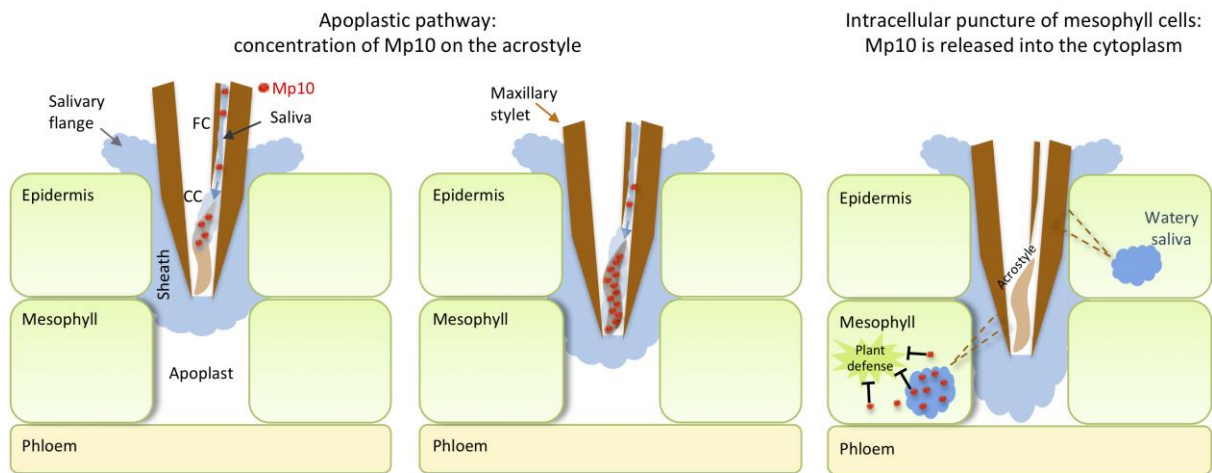


Fig. 5. Model for the regulation of Mp10 delivery through acrostyle binding. One maxillary stylet tip inside plant tissue is represented in brown. Food canal (FC), common canal (CC) and acrostyle are indicated. During the apoplastic pathway, Mp10 (red dots) contained in the gelling saliva binds Stylin-03 at the surface of the acrostyle. While puncturing cells along the stylet track (pictured as brown dotted lines), watery saliva is secreted and flushed out. All Mp10 accumulated on the acrostyle is then released in mesophyll cells where effector molecules can modulate plant responses.

Supplemental Material

Supplementary Material and Methods gives information on the construction of modified plasmids used in the yeast two hybrid experiments.

Supplementary Fig. S1 shows that other stylins-effectors combinations do not allow yeast growth on selective media.

Supplementary Table S1 shows non-sequential and sequential EPG variables of Stylin-01 or Stylin-03-silenced aphids and control aphids.

Supplementary Table S2 indicates the oligonucleotides used in this study.

Supplementary Material and methods

Modification of original plasmids to construct pLexAN-GG & pGADT7-GG.

Briefly, the multi-cloning sites (MCS) of pLexAN (Dualsystems Biotech, Zurich, Switzerland) and pGADT7 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) plasmids were removed and replaced by an insert containing *ccdB* and chloramphenicol resistance ORFs (as in Gateway plasmids), flanked by SapI recognition site producing cohesive ends (AGC and TGA) corresponding to serine and Stop codons, respectively.

1) Deletion of SapI restriction site in pLexAN and pGADT7 plasmids

For both plasmids, a SapI restriction site close to the plasmid origin of replication (ColE1) was first removed by PCR mutagenesis using Phusion polymerase in GC buffer supplemented with 4% DMSO and specific primers:

ColE1>: 5'-CCTCGCTCACTGACTCGCTG-3'

MutSapI-ColE1<: 5'-AAGCGGAAGtGCGCCCAATAC-3'

followed by purification, DpnI treatment, phosphorylation and ligation steps.

2) pLexAN-GG plasmid

Sequences corresponding to *ccdB* and CmR ORFs (insert) were amplified from a former GoldenGate plasmid (Gateway-based vector) by PCR using Phusion polymerase and the two following primers:

SacI-SapI-K7ccdB>: 5'-AGTAGAGCTCAGCCGAAGAGCTTAGGCACCCCAGGCTT-3'

Stop-SapI-K7ccdB<: 5'-ATTATCACGAAGAGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACA-3'

SapI-free pLexAN plasmid digested by SacI and SmaI was ligated with the PCR product digested by SacI, and transformed in *E. coli* DB3.1 strain. Colonies were screened on LB agar plates supplemented with kanamycin (50 µg/ml final concentration) and chloramphenicol (25 µg/ml final concentration).

3) pGADT7-GG plasmids

Sequences corresponding to *ccdB* and CmR ORFs (insert) were amplified from GoldenGate plasmid by PCR using Phusion polymerase and the two following primers:

Ser-SapI-K7ccdB> 5'-GCCGAAGAGCTTAGGCACCCCAGGCTT-3'

XhoI-SapI-K7ccdB<5'-

CGATTCTCGAGTTATCACGAAGAGCTGTGTATAAGGGAGCCTGACA-3'

SapI-free pGADT7 plasmid was digested by NdeI and cohesive extremities were filled-in using Klenow and dNTPs. This plasmid was then restricted with XhoI and ligated with the insert digested by XhoI, and transformed in *E. coli* DB3.1 strain. Colonies were screened as described above.

4) Cloning *stylin* genes and effector sequences in pLexAN-GG and pGADT7-GG

To clone *stylin* genes or effector sequences flanked with SapI restriction sites into modified pLexAN-GG and pGADT7-GG, a Golden Gate reaction was performed using SapI and T4 DNA ligase. Golden Gate (GG) cloning is seamless. Recombinant plasmids resemble original ones and just lack the MCS. We took advantage of the positive selection of recombinant clones using *ccdB* in modified vectors.

	ACE1	Ap25	Armet	C002	MIF1	Mp10	PintO1	Control
Stylin-01								
Stylin-02								
Stylin-03								
Stylin-04								
Stylin-05								
Control								

Supplementary Figure S1. Yeast growth was detected for Stylin-03 vs Mp10 unlike other combinations. Interactions between the five *A. pisum* Stylins (BD fusions) and seven *A. pisum* effectors (AD fusions) were assayed by a yeast-two-hybrid experiment. Three dilutions (1/10, 1/100, and 1/1000) of yeast cultures adjusted to an OD of 0.2 were spotted on a selective SD medium lacking leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA]. Yeast transformations and interaction analyses were performed twice with identical results. Photos were taken after 4 days of growth at 28°C.

Supplementary Table S1. Feeding behavior of *M. persicae* adults previously fed for 72h on siRNA targeting *stylin-01* or *stylin-03* gene recorded on *Arabidopsis thaliana*

A. Non-sequential EPG variables (Mean values \pm standard deviation) for Sty01-siRNA treated aphids (Sty01), Sty03-siRNA treated (Sty03) aphids compared to control aphids (NC).

	Aphids	PPW	NWEI	p	WDI	p	WDEI	p
Np								
	Sty01	19/19	17.47 \pm 1.97	0.339	4221.36 \pm 1016.85	0.525	227.68 \pm 45.58	1.000
	NC	19/19	20.58 \pm 2.53		4004.32 \pm 691.94		226.17 \pm 42.37	
	Sty03	21/21	12.48 \pm 1.84	0.247	2591.16 \pm 439.52	0.568	222.86 \pm 31.42	0.749
	NC	18/18	15.78 \pm 2.32		3484.47 \pm 734.50		250.69 \pm 55.51	
Probe								
	Sty01	19/19	17.32 \pm 1.92	0.325	24577.43 \pm 1016.82	0.525	1859.37 \pm 1559.34	0.686
	NC	19/19	20.47 \pm 2.52		24794.68 \pm 691.94		2015.94 \pm 1494.75	
	Sty03	21/21	12.43 \pm 1.84	0.247	26207.84 \pm 439.52	0.568	4407.21 \pm 6266.74	0.223
	NC	18/18	15.61 \pm 2.30		25314.53 \pm 734.50		3573.37 \pm 6204.97	
C								
	Sty01	19/19	21.26 \pm 2.13	0.374	13544.29 \pm 1136.60	0.566	695.51 \pm 63.22	0.931
	NC	19/19	24.37 \pm 2.71		14460.56 \pm 1097.78		703.12 \pm 86.62	
	Sty03	21/21	15.38 \pm 2.19	0.184	13447.41 \pm 1285.88	0.528	1002.96 \pm 70.20	0.183
	NC	18/18	18.94 \pm 2.38		14670.68 \pm 1432.42		1132.36 \pm 306.99	
pd								
	Sty01	19/19	155.53 \pm 12.39	0.270	732.15 \pm 58.11	0.337	4.70 \pm 0.07	0.871
	NC	19/19	178.37 \pm 16.22		821.62 \pm 71.20		4.68 \pm 0.09	
	Sty03	21/21	131.05 \pm 14.20	0.320	680.78 \pm 72.56	0.521	5.28 \pm 0.10	<u>0.026</u>
	NC	18/18	150.78 \pm 13.49		744.84 \pm 64.91		4.98 \pm 0.07	
II-1								
	Sty01	19/19	155.53 \pm 12.39	0.270	298.84 \pm 24.93	0.952	1.90 \pm 0.14	0.390
	NC	19/19	178.37 \pm 16.22		294.65 \pm 30.85		1.99 \pm 0.13	
	Sty03	21/21	131.05 \pm 14.20	0.320	272.16 \pm 29.50	0.385	2.19 \pm 0.06	0.530
	NC	18/18	150.78 \pm 13.49		307.59 \pm 27.42		2.13 \pm 0.04	
II-2								
	Sty01	19/19	155.53 \pm 12.39	0.270	168.16 \pm 12.26	0.318	1.14 \pm 0.03	<u>0.040</u>
	NC	19/19	178.37 \pm 16.22		148.63 \pm 15.06		1.01 \pm 0.07	
	Sty03	21/21	131.05 \pm 14.20	0.320	175.44 \pm 18.72	0.776	1.41 \pm 0.04	<u>0.010</u>
	NC	18/18	150.78 \pm 13.49		182.37 \pm 15.29		1.28 \pm 0.04	
II-3								
	Sty01	19/19	155.53 \pm 12.39	0.270	207.86 \pm 18.58	0.700	1.39 \pm 0.05	0.852
	NC	19/19	178.37 \pm 16.22		197.09 \pm 20.67		1.33 \pm 0.09	
	Sty03	21/21	131.05 \pm 14.20	0.320	188.92 \pm 20.98	0.623	1.51 \pm 0.05	0.103
	NC	18/18	150.78 \pm 13.49		202.65 \pm 18.15		1.41 \pm 0.03	
E1								
	Sty01	18/19	4.26 \pm 0.64	0.858	320.47 \pm 51.44	0.099	74.19 \pm 7.39	<u>0.046</u>
	NC	18/19	3.79 \pm 0.57		212.05 \pm 38.12		56.11 \pm 4.65	
	Sty03	19/21	3.38 \pm 0.63	0.682	205.91 \pm 41.47	0.921	66.58 \pm 6.81	0.093
	NC	17/18	3.72 \pm 0.66		197.83 \pm 40.73		51.44 \pm 6.41	
E2								
	Sty01	18/19	3.79 \pm 0.58	0.918	10447.41 \pm 1546.50	0.608	4769.65 \pm 1552.64	0.938
	NC	18/19	3.47 \pm 0.54		9306.55 \pm 1568.87		5210.88 \pm 1375.08	
	Sty03	19/21	3.14 \pm 0.57	0.754	12005.06 \pm 1772.49	0.418	8411.84 \pm 2061.88	0.317
	NC	16/18	3.44 \pm 0.63		9928.69 \pm 1795.18		5423.90 \pm 1779.13	
Number of single E1								
	Sty01	19/19	0.32 \pm 0.17	0.209				
	NC	19/19	0.47 \pm 0.14					
	Sty03	21/21	0.28 \pm 0.11	0.423				
	NC	18/18	0.24 \pm 0.14					

PPW, proportion of individuals that produced a specific waveform type; **NWEI**, number of waveform events per insect; **WDI**, waveform duration (s) per insect; **WDEI**, waveform duration (s) per event and per insect; **Non-probe (Np)**, non-probe activity; **Probe**, probe activity. Waveforms: **C**, intercellular stylet pathway; **pd**, short intracellular punctures; **II-1**, pd sub-phase II-1, **II-2**, pd sub-phase II-2, **II-3**, pd sub-phase II-3; E shows phloem-

related activities: **E1**, correlates with salivation into phloem sieve elements; **E2**, regards as ingestion from phloem.

P-values according to a Student t-test for Gaussian distribution variables and Mann Whitney U-test for non-Gaussian distribution variables. Underline-type indicates significant differences ($p \leq 0.05$).

B. Sequential EPG variables (Mean values \pm standard error).

Sequential variables	Aphids	PPW	WDEI	p
Time from start of EPG to 1st probe				
	Sty01	19/19	363.32 \pm 72.24	0.603
	NC	19/19	426.05 \pm 88.86	
	Sty03	21/21	301.51 \pm 43.75	0.234
	NC	18/18	439.64 \pm 69.84	
Time from the beginning of the 1st probe to first pd				
	Sty01	19/19	279.66 \pm 118.35	1.00
	NC	19/19	444.49 \pm 169.02	
	Sty03	21/21	212.48 \pm 81.72	0.443
	NC	18/18	285.99 \pm 127.20	
Time from the beginning of that probe to 1st E				
	Sty01	19/19	2094.57 \pm 252.15	0.542
	NC	19/19	2527.87 \pm 451.50	
	Sty03	21/21	3082.26 \pm 435.60	1.00
	NC	18/18	2899.43 \pm 344.33	
Duration of E1 followed by the first E2				
	Sty01	18/19	91.27 \pm 16.87	0.104
	NC	18/19	61.36 \pm 11.08	
	Sty03	19/21	79.02 \pm 15.34	<u>0.037</u>
	NC	16/18	56.65 \pm 12.56	
Duration of E1 followed by first sustained E2 (>10 min)				
	Sty01	16/19	87.56 \pm 17.21	0.707
	NC	16/19	50.79 \pm 3.76	
	Sty03	18/21	62.52 \pm 5.66	<u>0.015</u>
	NC	14/18	42.41 \pm 5.00	

PPW, proportion of individuals that produced a specific waveform type; **WDEI**, waveform duration (s) per event and per insect; **Probe**, probe activity. Waveforms: **pd**, short intracellular punctures; E shows phloem-related activities: **E1**, correlates with salivation into phloem sieve elements; **E2**, regards as ingestion from phloem.

P-values according to a Student t-test for Gaussian distribution variables and Mann Whitney U-test for non-Gaussian distribution variables. Underline-type indicates significant differences ($p \leq 0.05$).

Supplementary Table S2. List of oligonucleotides used in this study.

Primers' name	Sequence (5' to 3')	Comments
Primers for yeast two-hybrid constructs		
Sty01-Mp-For	taagctcttctagcTACCCCGCTGGACAGAGC	Stylin-01 from <i>M. persicae</i>
Sty01-Mp-Rev	taagctcttctcaTACCCCGCTGGACAGAGC	
Sty02-Mp-For	taagctcttctagcTACCCCGCCCAAGGTCCC	Stylin-02 from <i>M. persicae</i>
Sty02-Mp-Rev	taagctcttctcaCTGGTACTGGGGTTCGGGT	
Sty03-Mp-For	taagctcttctagcCAACAGTATCAACCCACAACCTCTAT	Stylin-03 from <i>M. persicae</i>
Sty03-Mp-Rev	taagctcttctcaCTACTTAATTTTGTGTAAGCTGGTTCC	
Sty04-Mp-For	taagctcttctagcCAGACGGTGCAACCAGCACC	Stylin-04 from <i>M. persicae</i>
Sty04-Mp-Rev	taagctcttctcaTTTGTGTAATTGTGGTGGTTCTAGTTTG	
Sty01-Ap-For	taagctcttctagcTACCCCGCATCACTGAACCC	Stylin-01 from <i>A. pisum</i>
Sty01-Ap-Rev	taagctcttctcaCTGGTATTTTGGTTTCGGGGG	
Sty02-Ap-For	taagctcttctagcTACCCCGCTCAAGGCCCC	Stylin-02 from <i>A. pisum</i>
Sty02-Ap-Rev	taagctcttctcaCTGGTACTGTGGTTCGGGTGT	
Sty03-Ap-For	taagctcttctagcCAACAGTTTCAACCCACGACTC	Stylin-03 from <i>A. pisum</i>
Sty03-Ap-Rev	taagctcttctcaCTTAATTTTGTGTAAGCTGGTTCCG	
Sty04-Ap-For	taagctcttctagcCAGACGGTGCAGCCTGCA	Stylin-04 from <i>A. pisum</i>
Sty04-Ap-Rev	taagctcttctcaTTTGTGTAATTGTGGTGGTTCTAGTTTG	
Sty05-Ap-For	taagctcttctagcCAATTCCAATGCCCAAGAAGAAC	Stylin-05 from <i>A. pisum</i>
Sty05-Ap-Rev	taagctcttctcaTTGTTTTTATTCTTGTCTGTTGCT	
ACE1-For	taagctcttctagcGCAGGAATAAAAACTGCTC	ACE1 from <i>A. pisum</i>
ACE1-Rev	taagctcttctcaAGGTTGACTTGTTCACCC	
Ap25-For	ttaagctcttctagcACAAAACTGAAAAATCTGACAAAG	Ap25 from <i>A. pisum</i>
Ap25-Rev	taagctcttctcaTTTTTTTGACGATTTATTGTTATT	
Armet-For	ttaagctcttctagcCAATCGCGAACATTTACCG	Armet from <i>A. pisum</i>
Armet-Rev	taagctcttctcaTAACTCTTCCTTGACGTAAGATGGT	
C002-For	ttaagctcttctagcGATTGGTCTGCCGCTG	Armet from <i>A. pisum</i>
C002-Rev	taagctcttctcaAAAACGTGCAAGGAAACTTCCAA	
MIF1-For	ttaagctcttctagcATGCCTCATTTCCGTTTGAAA	MIF1 from <i>A. pisum</i>
MIF1-Rev	taagctcttctcaTAACTCTTCCTTGACGTAAGATGGT	
Ap-Mp10-For	ttaagctcttctagcGCGCCGAAAAAGATG	Mp10 from <i>A. pisum</i>
Ap-Mp10-Rev	taagctcttctcaGAAGAGAAGAAAAAAGGTGTTGTC	
Mp-Mp10-For	ttaagctcttctagcGCGCCGAAAAAGATG	Mp10 from <i>M. persicae</i>
Mp-Mp10-Rev	taagctcttctcaAAATTTGACAACACCTTTTTTCTT	
PintO1-For	ttaagctcttctagcAGTCTCTACCAGCCGC	PintO1 from <i>A. pisum</i>
PintO1-Rev	taagctcttctcaCAATAATTCACGATCGATG	
Primers for cloning in the plasmid pETtrx1b		
Xho-Mp-Mp10-For	atctccatggccGCGCCGAAAAAGATG	Mp10 from <i>M. persicae</i>
Nco1-Mp-Mp10-Rev	ggtgctcgagtaAAATTTGACAACACCTTTTTTCTTC	

Xho-Ap-Mp10-For	atctccatggccGCGCCGCAAAAAGATG	Mp10 from <i>A. pisum</i>
Nco1-Ap-Mp10-Rev	ggcgctcgagtaAAATTTAACAACCCCTTTTTCTTCTCT	

Primers for RT-qPCR

qSty01_Mp_For	ACATTTGTCGTATCGTCATTG	Stylin-01 from <i>M. persicae</i>
qSty01_Mp_Rev	GCTGGGTGCTGAATCTT	(Webster <i>et al.</i> , 2018)
qSty03_Mp_For	GATGGATCTTATAAATGGGCGT	Stylin-03 from <i>M. persicae</i>
qSty03_Mp_Rev	GATTGGCTGGGATCTTGAG	
qActin_Mp_For	CGTTACCAACTGGGACGATATC	Actin from <i>M. persicae</i>
qActin_Mp_Rev	GGTTCAATGGAGCTTCTGTAA	(Webster <i>et al.</i> , 2018)
qEF1 α _Mp_For	AAAATGGACAAACCCGTGAA	EF1- α from <i>M. persicae</i>
qEF1 α _Mp_Rev	GCTGTATGGTGGTTCAGTAGAA	(Webster <i>et al.</i> , 2018)

siRNA for silencing

NC-siRNA	Reference SR-CL00-005 (Kaneka Eurogentec S.A., Seraing, Belgium)	SiRNA duplex negative control
Sty01-siRNA	AUCCCAUUCGAGAUGCAAG(+dTdT)	Targeting Stylin-01 mRNA (<i>M. persicae</i>)
Sty03-siRNA	CACCAAUCAGCGUGAAAUA(+dTdT)	Targeting Stylin-03 mRNA (<i>M. persicae</i>)

2.3. Tentatives de validation de l'interaction Stylin-03/Mp10

Tout au long de ma thèse, j'ai testé beaucoup de techniques et de conditions différentes pour tenter de valider l'interaction entre Mp10 et Stylin-03 observée dans le système double-hybride en levure. Ces approches sont toutes décrites dans le matériel et méthodes complémentaires et ne sont présentées que très brièvement dans cette section car malheureusement, aucune d'elles ne m'a permis d'obtenir une interaction.

J'ai d'abord essayé de définir les domaines de Stylin-03 impliqués dans l'interaction en levure, cette fois en utilisant des fragments tronqués de cette protéine, mais sans succès. Il semblerait que les protéines entières soient nécessaires pour qu'il y ait interaction entre les deux partenaires. J'ai ensuite recherché une interaction *in vitro* en réalisant des expériences de *far western blot*, des co-immunoprécipitations ou encore du GST *pull-down* ; puis *in planta*, en utilisant l'approche BiFC chez le tabac, *N. benthamiana*.

Enfin, nous avons incubé la protéine Mp10 sur des lames *peptide array* comportant chacune 384 peptides issus de protéines cuticulaires RR-1 et RR-2 (voir Webster et al., 2017 pour plus d'informations). Des interactions avec plusieurs peptides ont été détectées mais aucun d'eux ne correspondait à Stylin-03, ou à une protéine identifiée dans les stylets. Nous ne savons donc pas si ces interactions ont une signification biologique. Il n'a pas non plus été possible de dégager de consensus sur la base de leurs séquences.

Nous émettons plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer l'échec de ces approches. La plus évidente est que les conditions d'interactions *in vitro* ou en systèmes hétérologues ne sont pas celles qui permettent aux deux protéines d'interagir. Par ailleurs, Stylin-03 n'adopte peut-être pas une conformation propice aux interactions dans ces conditions, comme cela a effectivement été observé pour Stylin-01 et Stylin-02 (voir chapitre 3). L'équipe de P. Bron (CBS, Montpellier) travaille actuellement sur la structure de la protéine Stylin-03, et il semblerait que celle-ci ne soit pas non plus repliée *in vitro*, malgré les nombreuses conditions testées.

Il est également possible que l'interaction soit particulièrement labile et que certains protocoles nécessitant beaucoup d'étapes d'incubation et de rinçages successifs ne soient pas du tout adaptés. Nous avons d'ailleurs pris en compte cette possibilité lors des incubations *in vitro* avec Mp10 sur stylets disséqués : le fait d'utiliser une protéine fluorescente nous a permis d'éviter les nombreux rinçages nécessaires aux incubations avec des anticorps, et d'augmenter nos chances de préserver une interaction en surface de l'acrostyle.

Nous pourrions aussi penser que l'interaction observée en levure est peut-être artificielle, mais les interactions sur stylets ne vont pas dans ce sens.

3. Etude du comportement de la lignée KO Stylin-01

Nous avons caractérisé le comportement alimentaire des pucerons de la lignée KO Stylin-01, en comparaison de la lignée WT, grâce à des enregistrements EPG effectués dans notre laboratoire. Les pucerons utilisés pour déterminer la durée moyenne des cinq ponctions intracellulaires (en lien avec la transmission des virus, [voir chapitre 3, section 2.2](#)) ont aussi été enregistrés sur des fèves pendant 8h. Les variables analysées sont présentées dans la **Table 1**.

Les enregistrements EPG ont permis de mettre en évidence des différences entre les deux lignées, notamment au niveau des ponctions intracellulaires. Le nombre moyen de ponctions par insecte est en effet réduit de 40 % pour la lignée KO Stylin-01 ($106,69 \pm 12,85$ s), par rapport à la lignée WT ($149,33 \pm 16,96$ s) (**Fig. 30-A**), tandis que la durée moyenne de ces ponctions est similaire chez les deux lignées (**Fig. 30-B**). Par contre, nous avons constaté des différences significatives au niveau des sous-phases II-1 et II-3, qui sont respectivement plus longues de 6,9 % ($2,33 \pm 0,05$ s vs $2,17 \pm 0,05$ s) et 3,8 % ($2,09 \pm 0,07$ s vs $2,06 \pm 0,01$ s) chez le mutant KO Stylin-01. La sous-phase II-2 quant à elle, semble aussi plus longue mais cette tendance n'est pas soutenue par les tests statistiques.

D'autres différences ont également été relevées au moment de la prise alimentaire dans le phloème. La lignée KO Stylin-01 réalise en effet deux fois moins d'évènements E1 (phase de salivation dans le phloème) que la lignée WT ($1,96 \pm 0,34$ s vs $3,71 \pm 0,75$ s) (**Fig. 30-C**). Seule la phase E1 précédant la première phase E2 (supérieure à 10 min) est plus longue de 38,7 % ($70,93 \pm 18,15$ s vs $43,49 \pm 3,83$ s), tandis que la durée moyenne de la phase E1 est identique entre les deux lignées (**Fig. 30-DE**). Le nombre d'évènements E2 (ingestion du phloème) est réduit de 21,8 % chez la lignée KO Stylin-01 ($1,29 \pm 0,56$ s vs $1,65 \pm 0,25$ s) (**Fig. 30-F**), et de 80,7 % si l'on considère seulement les évènements E2 dits « efficaces », c'est-à-dire ceux dont la longueur est supérieure à 10 min ($1,50 \pm 0,23$ s vs $2,71 \pm 0,38$ s) (**Fig. 30-G**). Il n'y a pas de différence dans la durée de la phase E2 pour les deux lignées (**Fig. 30-H**).

Ainsi, les pucerons de la lignée KO Stylin-01 salivent plus longtemps que les contrôles, au moment des ponctions intracellulaires dans l'épiderme et le mésophylle de la plante (phases de salivation II-1 rallongées) mais surtout lors de la première piqûre dans le phloème.

Dans le chapitre précédent ([voir section 2.2](#)), nous n'avions pas observé de différence au niveau de la durée des ponctions intracellulaires lorsque nous nous contentions de regarder les cinq premières. Ce ne serait donc pas les premières piqûres d'essai qui seraient impactées mais des ponctions plus tardives dans l'alimentation, ou alors les différences ne seraient visibles statistiquement parlant qu'avec un plus grand nombre de données/piqûres analysées.

Quoiqu'il en soit, c'est la deuxième fois que nous observons un impact sur les phases de salivation suite à la diminution ou l'absence de Stylin-01, et ce quel que soit le système utilisé (RNAi/CRISPR-Cas9),

l'espèce de puceron (*M. persicae* / *A. pisum*), ou encore la plante hôte (*A. thaliana* ou *V. faba*). Ces résultats nous confortent dans l'idée que Stylin-01 joue un rôle clé dans les phases de salivation du puceron. En complément, il aurait été intéressant de pouvoir caractériser les propriétés des stylets et le comportement alimentaire de pucerons KO Stylin-03, mais nous n'avons pas encore réussi à générer ces mutants.

En ce qui concerne les autres variables (nombre de ponctions intracellulaires, et nombre d'évènements E1/E2), l'interprétation des différences n'est pas évidente. Comme précédemment évoqué avec les phénotypes de transmission des virus, il est possible que les deux lignées « sœurs », n'ayant pas le même fond génétique, n'aient pas exactement le même comportement alimentaire. Des enregistrements EPG avec d'autres lignées contrôles sont donc nécessaires pour pouvoir conclure si ces modifications sont liées, ou non, à l'absence de Stylin-01.

Figure 30. Comparaison du comportement alimentaire des pucerons *A. pisum* des lignées WT et KO Stylin-01

Représentation des variables EPG chez les pucerons issus de lignées WT et KO Stylin-01. La médiane est représentée par une ligne horizontale. **A)** Nombre moyen de ponctions intracellulaires (*potential drop* ou *pd*) par puceron. Le nombre de *pd* est significativement réduit de 40 % chez la lignée KO par rapport à la lignée WT (Student t-test, $p=0,045$). **B)** Durée moyenne d'une ponction intracellulaire et des différentes sous-phases. Les *pds* ont des durées similaires entre les deux lignées. Par contre, la sous-phase II-1 est significativement plus longue (6,9 %) chez la lignée KO Stylin-01 (Student t-test, $p=0,026$), ainsi que la sous-phase II-3 (3,8 %) (Mann-Wintney, $p=5,97 \times 10^{-7}$). La sous phase II-2, quant à elle, reste similaire dans les deux cas (Mann-Wintney, $p=0,638$) **C)** Nombre moyen d'évènements E1. Le nombre d'évènements E1 est significativement réduit de 91,8 % chez la lignée KO Stylin-01 par rapport à la lignée WT (Mann-Wintney, $p=0,031$). **D)** Durée moyenne de la phase E1. La durée de la phase E1 est identique chez les deux lignées (Mann-Wintney, $p=0,835$). **E)** Durée moyenne de la phase E1 précédant la première phase E2 (>10 min). La durée de cette phase est significativement plus longue de 38,7 % chez la lignée KO Stylin-01 par rapport à la lignée WT (Mann-Wintney, $p=0,030$). **F)** Nombre moyen d'évènements E2. Le nombre d'évènements E2 est significativement réduit de 21,8 % chez la lignée KO Stylin-01 par rapport à la lignée WT (Mann-Wintney, $p=0,009$). **G)** Nombre moyen d'évènements E2 (dont la durée est supérieure à 10 min). Le nombre d'évènements E2 (>10 min) est significativement réduit de 80,7 % chez la lignée KO Stylin-01 par rapport à la lignée WT (Mann-Wintney, $p=0,011$). **H)** Durée moyenne de la phase E2. La durée de la phase E2 est identique chez les deux lignées (Mann-Wintney, $p=0,270$).

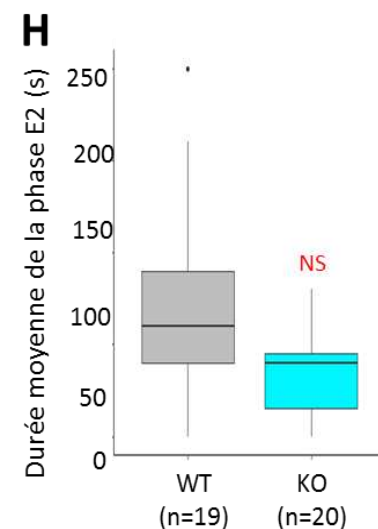
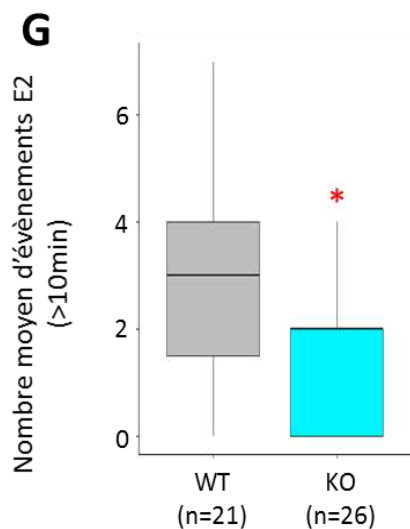
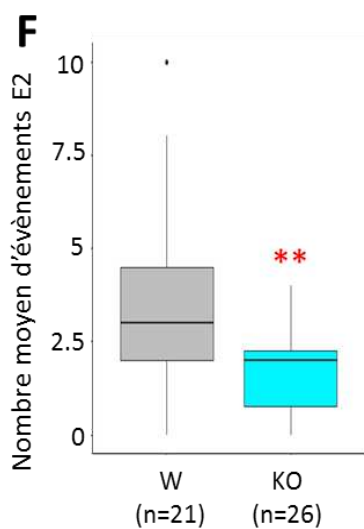
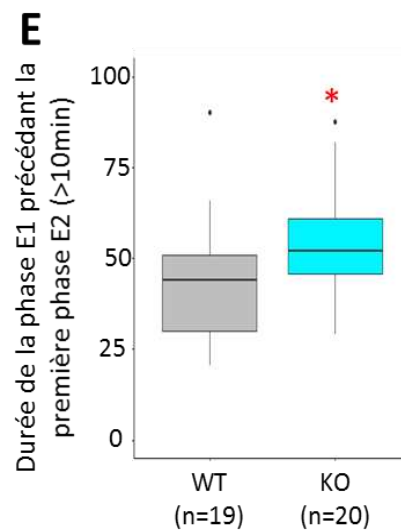
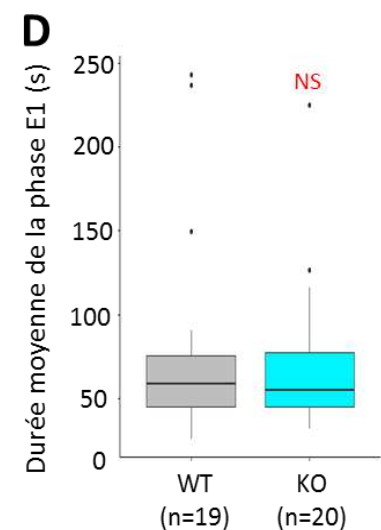
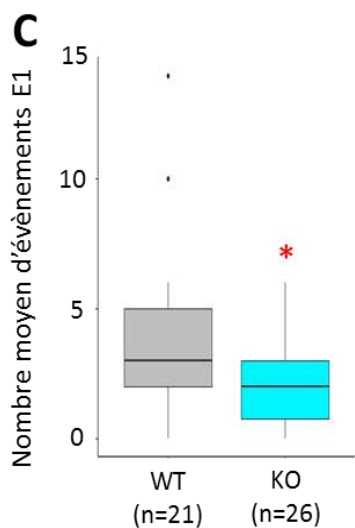
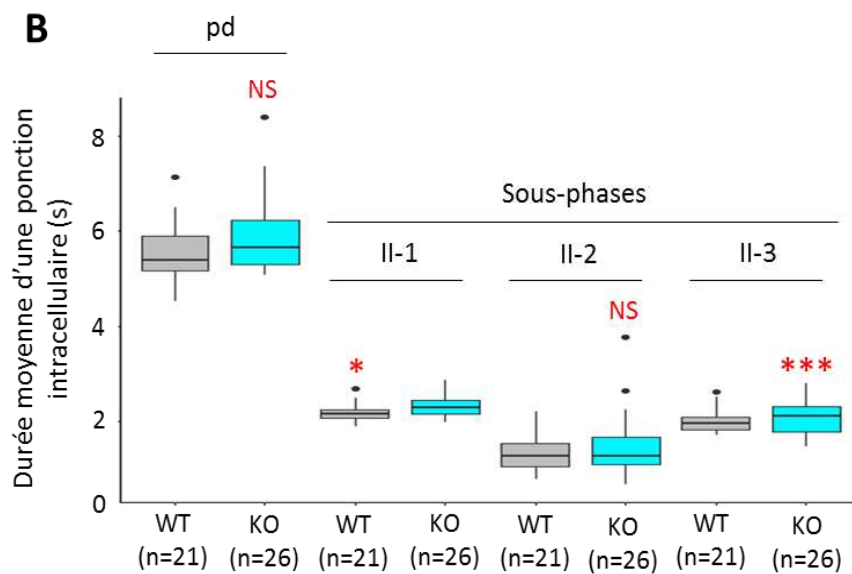
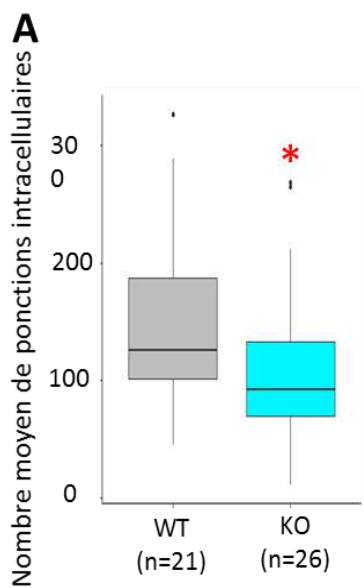


Table 1. Comportement alimentaire des lignées WT et KO Stylin-01 sur fève (*Vicia faba*)**A. Variables EPG non-séquentielles (moyenne ± écart-type)**

	Lignée	PPW	NWEI	p	WDI	p	WDEI	p
Np								
	KO	26/26	15,81±2,46	0,740	2602,04±486,80	0,156	181,02±25,41	0,440
	WT	21/21	17,57±3,19		3847,56±787,41		208,20±25,05	
Probe								
	KO	26/26	15,58±2,38	0,708	25966,86±486,96	0,378	3013,04±484,19	0,714
	WT	21/21	17,52±3,16		25000,21±783,89		3199,85±910,82	
C								
	KO	26/26	17,73±2,46	0,630	6573,58±597,69	0,279	530,26±124,86	0,824
	WT	21/21	20,38±3,25		7672,16±842,81		511,12±102,28	
pd								
	KO	26/26	106,69±12,85	<u>0,045</u>	623,01±74,35	0,058	5,88±0,15	0,144
	WT	21/21	149,33±16,96		822,99±98,54		5,54±0,14	
II-1								
	KO	26/26			281,01±23,06	0,108	2,33±0,05	<u>0,026</u>
	WT	21/21			271,10±23,94		2,17±0,05	
II-2								
	KO	26/26			147,42±24,14	0,193	1,48±0,13	0,624
	WT	21/21			169,01±22,28		1,31±0,09	
II-3								
	KO	26/21			177,77±16,39	<u>0,009</u>	2,09±0,07	<u>5,97e⁻⁷</u>
	WT	21/21			246,08±19,49		2,01±0,06	
E1								
	KO	20/26	1,96±0,34	<u>0,031</u>	150,33±38,20	0,105	68,82±9,94	0,835
	WT	19/21	3,71±0,75		411,98±175,79		77,83±14,94	
E2								
	KO	20/26	1,29±0,56	<u>0,009</u>	9949,74±1732,13	0,421	6206,47±637,08	0,270
	WT	19/21	1,65±0,25		12076,32±1785,51		4086,46±376,59	

PPW - *proportion of individuals that produced a specific waveform type* : proportion d'individus produisant cette phase.

NWEI - *number of waveform events per insect* : nombre d'évènements par insecte.

WDI - *waveform duration (s) per insect* : durée moyenne de la phase par insecte.

WDEI - *waveform duration (s) per event and per insect* : durée moyenne de la phase par nombre d'évènements et par insecte.

Non-probe (Np), phase de non-alimentation ; **Probe**, phase d'alimentation. Phases : **C**, passage intercellulaire des stylets ; **pd**, ponction intracellulaire ; **II-1**, **II-2**, **II-3**, sous-phases II d'une ponction intracellulaire ; **E** activités associées au phloème : **E1**, salivation dans les tubes criblés ; **E2**, ingestion du phloème.

Les « p-valeurs » sont celles du test de Student pour les variables paramétriques, et du test de Mann Whitney pour les variables non-paramétriques. Les valeurs soulignées sont celles qui sont significatives ($p \leq 0,05$).

B. Variables EPG séquentielles (moyenne ± écart-type)

	Lignée	PPW	WDEI	p
Durée entre le début de l'enregistrement et la première phase d'alimentation (phase C)				
	KO	26/26	215,75±71,79	0,289
	WT	21/21	328,37±113,93	
Durée entre le début de l'enregistrement et la première phase d'alimentation dans le phloème				
	KO	26/26	11898,53±2103,97	0,589
	WT	21/21	9462,13±2003,35	
Durée de la phase E1 précédant la première phase E2				
	KO	26/26	58,94±5,66	<u>0,050</u>
	WT	21/21	45,15±3,77	
Durée de la phase E1 précédant la première phase E2 (dont la longueur est supérieure à 10min)				
	KO	26/26	70,93±18,15	<u>0,030</u>
	WT	21/21	43,49±3,83	
Nombre de phases E1 sans phase E2				
	KO	26/26	0,05±0,05	0,426
	WT	21/21	0,12±0,06	
Nombre de phases E2 (dont la durée est supérieure à 10min)				
	KO	26/26	1,50±0,23	<u>0,011</u>
	WT	21/21	2,71±0,38	

PPW - *proportion of individuals that produced a specific waveform type* : proportion d'individus produisant cette phase

WDE - *waveform duration (s) per event*: durée moyenne de la phase par évènement

Phases : **C**, passage intercellulaire des stylets ; **E** activités associées au phloème : **E1**, salivation dans les tubes criblés du phloème ; **E2**, ingestion du phloème.

Les « p-valeurs » sont celles du test de Student pour les variables paramétriques, et du test de Mann Whitney pour les variables non-paramétriques. Les valeurs soulignées sont celles qui sont significatives ($p \leq 0,05$).

4. Conclusion

Pour déterminer le rôle des stylines dans l'alimentation du puceron, nous avons réalisé des enregistrements EPG pour suivre le comportement alimentaire de pucerons traités par RNAi, ou issus de la lignée KO Stylin-01. Nous avons observé que Stylin-01 et Stylin-03 seraient toutes les deux impliquées dans les phases de salivation, plus précisément lorsque le puceron libère de la salive aqueuse dans les différents tissus de la plante. Ces résultats appuient considérablement notre hypothèse selon laquelle les protéines stylines pourraient être impliquées dans la rétention des effecteurs en surface de l'acrostyle. En effet, nous pensons que durant ces phases de recherche, le puceron salive et concentre les effecteurs à la pointe de ses stylets. A cause de la diminution des protéines dans l'acrostyle chez les pucerons traités/mutés, cette accumulation ne serait pas suffisante, et ceux-ci mettraient en moyenne plus de temps pour concentrer et/ou délivrer la même quantité de molécules que les contrôles. Ceci impliquerait des phases de salivation (II-1, II-2 ou E1) plus longues.

Pour identifier les partenaires potentiels des stylines, nous avons aussi recherché des interactions avec quelques effecteurs de la salive dans le système double-hybride en levure, et réalisé des incubations directes sur stylets disséqués. L'ensemble de ces approches nous a permis de montrer que Mp10 interagissait *in vitro* avec l'acrostyle, peut-être avec un peptide accessible de Stylin-03 (le peptide 1-15), mais cela reste à démontrer. En effet, la diminution du nombre de stylets marqués chez les pucerons traités par RNAi ne nous permet pas de le confirmer avec certitude, car nous ne pouvons pas exclure un effet indirect du traitement (stylets déstructurés) sur le phénotype observé. De plus, nous n'avons pas réussi à valider d'interaction *in vitro* ou dans un autre système hétérologue. Comme alternative, il aurait été intéressant de pouvoir réaliser des incubations sur des stylets de pucerons KO Stylin-03 avec Mp10-like, mais nous n'avons pas réussi à générer ces mutants. Par contre, nous allons démarrer des essais d'incubation sur des stylets disséqués de la lignée KO Stylin-01, pour voir si Stylin-01 pourrait être impliquée dans la rétention de cet effecteur.

Mp10 présente des homologies de séquence avec des protéines de la famille des **CSP** (*chemosensory proteins*), aussi appelées protéines OS-D-like, qui auraient des fonctions olfactives et gustatives chez de nombreux insectes (Jacobs et al., 2005; Monteforti et al., 2002; Nagnan-Le Meillour et al., 2000). Les protéines de cette large famille ont souvent été retrouvées au niveau d'organes sensoriels : dans les antennes des fourmis, des guêpes ou des abeilles (Calvello et al., 2003, 2005; Ishida et al., 2002) ou encore dans les pièces buccales avec l'exemple de la pyrale du cactus, *Cactoblastis cactorum* (Maleszka and Stange, 1997). Ces protéines interagiraient préférentiellement avec de petites molécules hydrophobes, notamment des phéromones. C'est entre autre le cas d'une CSP retrouvée dans les antennes de la noctuelle du chou, *Mamestra brassica* (Jacquin-Joly et al., 2001), qui a été montrée comme pouvant interagir avec au minimum trois ligands différents, impliquant des changements majeurs dans sa conformation

(Campanacci et al., 2003). De plus, certaines ont été décrites comme indispensables au développement de l'insecte, suggérant qu'elles ont, de manière générale, des fonctions très diverses. Par exemple, lorsque la quantité de protéines CSP5 de l'abeille *Apis mellifera* est diminuée par ARN interférence, ses embryons présentent de très lourdes malformations et ne sont plus viables (Maleszka et al., 2007). Plus intéressant encore, des protéines appartenant à une autre famille très proche des CSP, les OBP (*odorant-binding proteins*), ont été décrites chez les moustiques comme sécrétées via la salive dans des cellules de l'hôte pour manipuler sa physiologie (Calvo et al., 2006). Elles interagiraient notamment avec deux cytokines (l'histamine et la noradrénaline) afin de neutraliser leur rôle dans la réponse immunitaire de l'hôte (propriétés coagulantes ou médiatrices d'une réponse allergique). Il n'est donc pas étonnant que, chez le puceron, ces protéines puissent être impliquées dans la manipulation de la plante. Les protéines CSP du puceron seraient présentes aussi bien dans les antennes que dans les pattes et la tête (Jacobs et al., 2005) mais leurs fonctions dans ces organes, en dehors de la salive, n'ont pas encore été caractérisées.

Dans la salive, l'effecteur Mp10 serait impliqué dans le contournement des voies de défenses conservées de la plante. Des études ont en effet démontré qu'il supprimait certaines réactions basales comme la production d'espèces réactives de l'oxygène (Bos et al., 2010; Rodriguez et al., 2014) et qu'il n'était pas sous forte pression de sélection (Boulain et al., 2018). Il est probable que Mp10 ait un rôle générique pour tous les pucerons et dans ce cas, qu'il ait le même mode d'action chez des espèces spécialistes et généralistes. Il ne serait donc pas surprenant de voir une interaction entre Mp10 et l'acrostyle à la fois chez *M. persicae* et *A. pisum*, si Mp10 joue la même fonction chez ces deux espèces. Pour le confirmer, il faudrait déterminer les réactions de défenses de la plante dans lesquelles Mp10-like est impliqué chez *A. pisum*.

De plus, Mp10 a été détecté dans le cytoplasme des cellules du mésophylle adjacentes au trajet des stylets, où il est très vraisemblablement délivré avec la salive aqueuse (Mugford et al., 2016). A l'inverse, il n'a pas été détecté dans l'apoplaste ni dans les tissus vasculaires de la plante, suggérant que l'effecteur n'y est pas présent ou alors en quantité trop faible pour être détecté.

Nous proposons donc le modèle hypothétique suivant (**Fig. 5 - article**) : Mp10 pourrait être concentré dans la salive gélifiée au niveau de l'acrostyle via une interaction directe avec la protéine Stylin-03, lors du passage des stylets dans l'apoplaste des cellules végétales. La protéine serait ensuite libérée dans le cytoplasme de la première cellule visitée avec la salive aqueuse. Ainsi, le puceron délivrerait une concentration élevée d'effecteurs en un temps très court, pour pouvoir neutraliser les réactions de défenses engendrées par la plante.

Discussion générale

Lors de mon arrivée dans l'équipe en 2015, l'acrostyle était seulement connu pour porter les récepteurs du CaMV, dont la nature protéique avait été démontrée (Uzest et al., 2007, 2010). Des peptides conservés de protéines RR-2 avaient été détectés dans l'organe (Uzest et al., 2010; Webster et al., 2017), les protéines Stylin-01 et Stylin-02 affleurant à la surface venaient tout juste d'être identifiées (Webster et al., 2018), mais aucun rôle de ces protéines cuticulaires n'avait été mis en évidence. Tout restait encore à découvrir concernant les propriétés et les fonctions de cet organe particulier.

Dans le cadre de l'ANR StylHook et d'un autre projet financé par la fondation Bill et Melinda Gates, plusieurs équipes ayant des compétences très diverses ont pris part à ces questions. Elles regroupaient de nombreuses disciplines complémentaires : analyses protéomiques et transcriptomiques, biologie structurale, ingénierie des matériaux polymères et enfin entomologie. C'est dans ce contexte que j'ai eu la chance de démarrer mon projet de thèse.

Les deux objectifs principaux de ce travail de thèse étaient de caractériser le rôle de l'acrostyle, d'une part dans la transmission des virus retenus dans les stylets de puceron, et d'autre part dans les interactions plante-insecte. J'ai consacré beaucoup de temps à ce deuxième volet d'étude qui était totalement nouveau dans l'équipe. En amont, un travail collectif, dans lequel je me suis beaucoup investi au cours de la première moitié de ma thèse a été nécessaire, d'abord pour caractériser le protéome des stylets de puceron, puis pour développer des outils de validation fonctionnelle.

1. La première analyse protéomique sur stylets de puceron

L'équipe de Philippe Bulet (Biopark, Archamps) a mis au point un nouveau protocole permettant d'extraire de manière efficace des protéines de cuticules d'insectes à partir d'une faible quantité de matériel biologique (Masson et al., 2018), ceci dans le but de réussir à l'appliquer sur des objets aussi petits que des stylets de pucerons. Ainsi, une analyse protéomique de plusieurs structures cuticulaires, dont les stylets, venait d'être réalisée sur le puceron du pois lors de mon arrivée en thèse. Elle nous a permis d'obtenir un listing de protéines identifiées de manière reproductible dans trois lots de stylets. Mon rôle dans cette étude a été de valider chacune de ces protéines grâce à des immuno-marquages de stylets disséqués, pour vérifier si les protéines ou peptides identifiés en spectrométrie de masse étaient présents. De plus, j'ai pu déterminer précisément leur localisation, et mettre en évidence celles qui constituent l'acrostyle, ou mieux encore, celles qui sont exposées en surface de l'organe. Nous avons ainsi pu définir le protéome des stylets du puceron du pois, qui est aussi le premier protéome de pièces buccales d'arthropode jamais défini.

Au total, nous avons confirmé la présence de 15 à 38 protéines cuticulaires dans les stylets (ce nombre dépend de si nous tenons compte, ou non, de toutes les protéines identifiées sur la base des peptides

partagés). Elles proviennent de deux grandes familles de protéines cuticulaires : les CPR (deux sous-familles, RR-1 et RR-2) et les CPAP3.

Nous savons désormais que des protéines RR-2 sont enfouies dans de la chitine, tout le long des stylets maxillaires. Elles n'ont, pour le moment, jamais été détectées à la surface mais leurs régions N- et C-terminales étant peu immunogènes, nous n'avons pas pu couvrir la totalité de leurs séquences avec des anticorps. De plus, la plupart de ces protéines partagent de fortes homologues de séquences et ni la spectrométrie de masse, ni les immuno-marquages n'ont permis de les distinguer les unes des autres. Il est probablement impossible d'aller plus loin dans leur identification avec les outils dont nous disposons actuellement. L'analyse transcriptomique menée en parallèle par nos collaborateurs Yvan Rahbé et Natalia Guschinskaya (Inra, Lyon), a aussi fait ressortir que les gènes codant pour des RR-2 étaient les plus exprimés dans les glandes rétortiformes (glandes qui synthétisent les stylets entre chaque mue). Puisque ces protéines sont généralement décrites comme étant localisées dans les cuticules rigides des insectes (Cohen and Moussian, 2016), nous pensons qu'elles seraient en quelque sorte les « briques » qui constituent les stylets, avec la chitine qui serait le « ciment ».

De manière surprenante, toutes les RR-1 identifiées apparaissent concentrées à la pointe des stylets maxillaires, principalement au niveau de l'acrostyle. Elles possèdent chacune au moins un peptide directement accessible à la surface, suggérant l'importance de ces protéines pour les fonctions de cet organe. Nous n'avons pas détecté de RR-1 dans le reste des stylets mais il faudrait le confirmer avec d'autres immuno-marquages en augmentant cette fois la durée des traitements chitinase.

En ce qui concerne les CPAP3, c'est la première fois que des protéines de cette famille sont détectées dans les stylets, au niveau de l'acrostyle. Nous ne pouvons pas totalement exclure la présence de peptides appartenant à ces protéines qui couvriraient la surface des stylets car leurs séquences sont plus grandes, et nous n'avons pas encore testé suffisamment d'anticorps pour en couvrir la totalité.

Nous avons recensé au minimum neuf protéines cuticulaires dans l'acrostyle : quatre RR-1, trois RR-2 et deux CPAP3. Cette liste est venue compléter des données de l'équipe qui avait déjà détecté la présence de plusieurs protéines RR-2 et de deux RR-1 (Stylin-01 et Stylin-02).

Parmi ces protéines, au moins cinq possèdent des peptides directement accessibles : les quatre RR-1 et une CPAP3, désormais renommées Stylin-01 à -05. Elles représentent toutes des candidates sérieuses, susceptibles d'interagir avec des protéines virales ou des composés de salive ou de plante. Nous nous sommes focalisés par la suite sur les quatre protéines RR-1, particulièrement accessibles à cet endroit-là. Nous avons recherché leurs partenaires dans différents systèmes hétérologues, notamment le système double-hybride en levure, et *in vitro*. En parallèle, nous avons aussi développé les approches nécessaires pour l'étude de leurs fonctions.

Lorsque j'ai démarré ma thèse, l'ARN interférence était la seule approche de validation fonctionnelle disponible chez le puceron. Nous avons mis au point cette approche sur les gènes *stylin-01* à *-04* en faisant ingérer des siRNA spécifiques à des larves *M. persicae*. De plus, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Gaël Le Trionnaire (IGEPP, Inra, Rennes), nous avons eu la chance de participer à la mise en place du système CRISPR-Cas9 pour la toute première fois chez le puceron. Le développement de cette approche a été une réussite puisque nous avons obtenu les premiers pucerons KO *Stylin-01*, nous permettant de caractériser une première lignée mutée.

2. Détermination du rôle de l'acrostyle dans les interactions plante-insecte

Une part importante de mon travail de thèse a été de définir la fonction physiologique de l'acrostyle et des protéines stylines pour l'insecte lui-même. Plusieurs hypothèses sur le rôle de cet organe avaient déjà été proposées, mais n'avaient pas été vérifiées avant ma thèse (Uzest et al., 2010).

Premièrement, l'acrostyle pourrait avoir un rôle mécanique. Il permettrait de renforcer suffisamment la pointe des stylets pour percer les parois des cellules végétales.

Deuxièmement, il pourrait être impliqué dans la régulation des flux à l'intérieur du canal commun, en jouant sur les propriétés hydrophobes des stylets (liés à la présence de lipides et de cires dans la cuticule). Il constituerait une sorte de poche hydrophile favorisant le contact avec le flux de sève et facilitant le passage du phloème dans le canal alimentaire. Cet équilibre entre « surface hydrophobe » et « poche hydrophile » pourrait également engendrer des turbulences dans le canal commun, permettant à la sève et à la salive de se mélanger continuellement, facilitant ainsi l'assimilation des nutriments.

Troisièmement, puisque l'acrostyle expose des protéines en surface de la cuticule dont certains motifs sont impliqués dans des interactions protéine-protéine, il pourrait être impliqué dans la rétention et le relargage de composés importants pour le processus d'alimentation du puceron. Etant donné qu'il est à la confluence des canaux alimentaire et salivaire, il pourrait s'agir de composés de plante ou de salive. L'acrostyle jouerait ainsi un rôle dans les interactions plante-insecte qui conduisent à l'installation durable des pucerons sur la plante visitée. Durant ma thèse, je me suis intéressée à cette troisième hypothèse : les protéines RR-1 pourraient en effet retenir des composés en surface de l'organe comme cela venait d'être suggéré avec *Stylin-01*, qui interagirait déjà avec la protéine virale P2 dans les stylets (Webster et al., 2018).

Dès le début de ma thèse, j'ai observé une interaction dans le système double-hybride en levure entre l'effecteur salivaire Mp10 et MpStylin-03, puis entre leurs homologues Mp10-like et ApStylin-03 chez *A. pisum*. Ces interactions nous ont permis de montrer par la suite que Mp10 et Mp10-like étaient spécifiquement retenus *in vitro* sur l'acrostyle de stylets disséqués, des pucerons *M. persicae* et *A. pisum*.

De plus, nous avons noté une diminution du nombre de stylets marqués lorsque nous incubions Mp10 sur des stylets de pucerons *M. persicae*, préalablement nourris avec des siRNA ciblant le gène *stylin-03*. Enfin, nous avons observé qu'impacter les protéines Stylin-01 et Stylin-03 perturbait le comportement alimentaire des pucerons (à la fois *M. persicae* et *A. pisum*). Ces protéines seraient toutes les deux impliquées dans les phases de salivation durant l'alimentation de l'insecte lorsque celui-ci libère de la salive aqueuse.

Pourquoi et comment le puceron concentrerait-il Mp10 sur l'acrostyle ?

La libération des effecteurs dans les différents tissus de la plante est loin d'être un mécanisme entièrement compris. Suite aux travaux de Sam Mugford qui a montré que Mp10 était détecté dans les cellules du mésophylle qui bordent le trajet intercellulaire des stylets (Mugford et al., 2016), nous avons émis l'hypothèse que l'effecteur pouvait être retenu sur l'acrostyle dans la salive gélifiée, au moment du passage des stylets dans l'apoplaste (Fig. 5 – article du chapitre 4). Il serait ensuite relargué en plus grande quantité dans le cytoplasme des cellules du mésophylle avec la salive aqueuse. L'accrochage et le décrochage successifs de l'effecteur sur l'acrostyle se ferait via une interaction avec Stylin-03, et pourraient être liés à des changements de conformation de Mp10, qui ont déjà été rapportés pour la famille des CSP auquel il appartient (Campanacci et al., 2003). Ces changements pourraient être dépendants des différences de composition ou de pH entre les deux salives ou entre les tissus de la plante. Nous pouvons également imaginer qu'un autre composé, de salive ou de plante, prendrait la place de l'effecteur.

Le puceron pourrait concentrer les molécules Mp10 à la pointe de ses stylets pour différentes raisons. L'hypothèse 1 est que ceci permettrait au puceron de les délivrer dans le bon tissu de la plante. Il a été montré en microscopie confocale que Mp10, fusionné à la GFP, était localisé dans le cytoplasme des cellules de l'hôte, deux jours après son agro-infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana* (Rodriguez et al., 2014). Si le site d'action de Mp10 est bien le cytoplasme des cellules, où il neutraliserait notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bos et al., 2010), alors le puceron n'a pas intérêt à « gaspiller » des molécules en les délivrant dans l'apoplaste. Or, les mouvements des stylets dans la plante sont rapides, ils passent en quelques secondes de l'apoplaste au cytoplasme et inversement. Nous pensons que le puceron n'a peut-être pas le temps d'adapter sa production de Mp10 aussi vite et qu'il retiendrait l'effecteur lorsque ses stylets se trouvent dans certains tissus de la plante (probablement dans l'apoplaste). Pour le moment Mp10 n'a jamais été détecté dans les tubes criblés du phloème. Il est donc possible que l'effecteur soit produit et délivré uniquement dans les phases précoces d'alimentation.

La seconde hypothèse est que concentrer des effecteurs à la pointe des stylets permettrait au puceron d'en délivrer une quantité suffisante pour neutraliser les défenses de la plante. Il s'agirait en quelque sorte d'un « seuil » à dépasser au-delà duquel l'effecteur pourrait efficacement bloquer ces défenses.

Enfin, la littérature démontre que Mp10 aurait une double activité, d'activation et de suppression des voies de défenses de l'hôte. Son rôle en tant qu'effecteur a bien été démontré puisqu'il est notamment connu pour supprimer la production de ROS dans les cellules végétales (Bos et al., 2010). Pourtant, lorsqu'il est transitoirement exprimé dans le tabac, Mp10 déclenche aussi des chloroses et de la mort cellulaire, qui sont dépendantes de la présence de l'ubiquitine ligase SGT1, suggérant que M10 serait reconnu par un récepteur de type NB-LRR (Bos et al., 2010; Rodriguez et al., 2014). La troisième hypothèse est donc que le puceron délivrerait Mp10 dans le but d'induire efficacement certains mécanismes de défenses de la plante : il serait impliqué dans le contournement des réponses de type PTI (suppression des ROS), mais déclencherait ensuite l'ETS. Dans le cas d'une interaction compatible, l'induction des voies ETS pourrait activer l'action d'autres molécules du puceron, comme d'autres effecteurs par exemple.

L'acrostyle retient-il d'autres effecteurs salivaires ?

La salive du puceron est un mélange complexe de protéines salivaires. Nous pouvons donc supposer que l'acrostyle n'accroche pas uniquement Mp10 mais tout un panel d'effecteurs différents. Une étude a confirmé la sécrétion d'au moins 51 protéines salivaires, rien que dans la salive aqueuse du puceron *A. pisum* (Boulain et al., 2018). Plusieurs d'entre elles pourraient correspondre à des effecteurs qui n'ont pas encore été caractérisés. De plus, ce nombre pourrait s'avérer beaucoup plus grand puisque 3603 gènes sont désormais connus pour être exprimés dans les glandes salivaires de cette même espèce.

Nous avons recherché des interactions dans le système double-hybride en levure entre les stylines et les quelques effecteurs qui sont déjà connus pour être délivrés dans la plante, mais sans succès. A l'heure actuelle, il est impossible de dire si ceci est effectivement dû à une absence d'interaction, ou plutôt aux limites du système (conditions non appropriées pour que les protéines interagissent). Il est également possible que ces effecteurs interagissent avec d'autres protéines cuticulaires de l'acrostyle, qui n'auraient pas encore été détectées en surface de l'organe (par exemple d'autres RR-2 ou CPAP3). Pour toutes ces raisons, nous allons initier d'autres études avec ces effecteurs au laboratoire (incubations *in vitro* sur stylets disséqués et *peptide array*).

Nous allons dans un premier temps nous concentrer sur les effecteurs Armet, C002 et PintO1. Contrairement à Mp10, les effecteurs MpC002 et MpPintO1 ont été détectés par immuno-marquages dans la gaine salivaire de *M. persicae* et non dans la salive aqueuse (Mugford et al., 2016). De plus, ApC002 serait synthétisé au niveau des glandes salivaires principales qui produisent la salive gélifiée (Mutti et al., 2008) tandis qu'Armet, à l'inverse, a été détectée par *western blot* uniquement dans la salive aqueuse des pucerons *A. pisum*, ainsi que dans le phloème des fèves infestées (Wang et al., 2015b). Nous faisons donc l'hypothèse que ces protéines pourraient éventuellement être retenues sur l'acrostyle à des moments différents et/ou délivrés dans des tissus distincts, durant l'alimentation de l'insecte. Nous pensons aussi que C002 et PintO1 pourraient interagir différemment avec l'acrostyle selon l'espèce de pucerons. Contrairement à Mp10, ces deux effecteurs sont sous pression de sélection (Boulain et al.,

2018), et ont une fonction hôte-spécifique (Pitino and Hogenhout, 2013). *M. persicae* étant une espèce généraliste, et *A. pisum* une espèce spécialiste, il serait intéressant de déterminer si ces espèces retiennent leurs effecteurs de la même façon, et dans le cas contraire, si ceci à un lien avec leur capacité à s'alimenter ou non, sur une large variété d'hôtes.

Il faudrait aussi, dans un second temps, trouver le moyen de tester une liste plus exhaustive de protéines salivaires pour identifier d'autres effecteurs capables d'interagir avec les stylines et/ou l'acrostyle. Une banque d'ADNc réalisée à partir des glandes salivaires principales et/ou accessoires pourrait par exemple être criblée dans le système double-hybride en levure face aux cinq stylines. Il serait aussi intéressant de mesurer l'impact du *silencing* des autres protéines cuticulaires de l'acrostyle sur les phases de salivation ou de manière plus générale, sur l'alimentation du puceron.

Comment valider le rôle de l'acrostyle dans la rétention de composés salivaires ?

Toutefois, il sera sans doute très difficile de confirmer la rétention des effecteurs sur l'acrostyle *in vivo*. Une première chose à faire serait de détecter Mp10 directement sur l'acrostyle de pucerons en microscopie électronique à transmission, avec un anticorps spécifique. Il faudrait que nous arrivions à collecter les pucerons au bon moment, c'est-à-dire au moment des phases de salivation durant lesquelles Mp10 est retenu. Nous pourrions par exemple envisager de réaliser des expériences sous EPG et de récupérer les pucerons lorsque les stylets sont dans l'apoplaste des cellules de la plante. Le design expérimental d'une telle approche paraît néanmoins relativement difficile à mettre en place.

Une alternative pourrait être de regarder où est délivré Mp10 dans la plante lorsque des pucerons traités/mutés s'alimentent, et comparer la quantité de molécules relarguées à la fois chez ces pucerons et chez les pucerons contrôles. Nous pourrions aussi regarder quelles sont les voies de défenses qui ont été induites dans des plantes *A. thaliana* (pour qui les interactions plante-puceron sont les mieux décrites) en réponse à l'infestation de pucerons *M. persicae* ayant ingéré des siRNA ciblant *stylin-03*, ou ciblant Mp10. Nous pourrions, par exemple, réaliser une étude transcritomique pour voir quels sont les gènes qui ont été dérégulés et si les deux cohortes de pucerons induisent les mêmes réponses. Il faut cependant noter que le *silencing* de Mp10 n'a, jusqu'à présent, jamais été rapporté dans la littérature.

De plus, une seule étude a recherché où étaient délivrés les effecteurs dans la plante pendant l'alimentation du puceron. Or elle traite du cas de seulement trois effecteurs chez une seule espèce de puceron (Mugford et al., 2016). Il est donc évident que des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre où et comment sont délivrés les effecteurs dans la plante et pourquoi le puceron a tout intérêt à accrocher des molécules effectrices à la pointe de ses stylets durant son alimentation.

Enfin, quel que soit le nombre d'effecteurs retenus sur l'acrostyle, une telle observation soulève tout de même de nombreuses interrogations. En effet, l'acrostyle n'est autre qu'un tube au travers duquel transitent des molécules. Le liquide qui passe à l'intérieur du canal commun n'est *a priori* pas

entièrement en contact avec la surface de cet organe. Même si certaines molécules comme Mp10, s'y accrochent, il paraît impossible que l'acrostyle en retienne la totalité. Nous sommes donc encore loin d'avoir élucidé le rôle complexe de cet organe.

L'acrostyle pourrait-il retenir des composés de la plante ?

Nous avons émis une autre hypothèse concernant la nature des composés pouvant interagir avec l'acrostyle : il pourrait aussi s'agir de molécules de la plante. L'acrostyle retiendrait certaines molécules aux effets toxiques pour le puceron, en évitant qu'elles ne passent dans son organisme durant l'alimentation de l'insecte. Il les recracherait ensuite dans la plante par salivation. Ces molécules pourraient être, par exemple, des composés antimicrobiens ou des produits de gènes de défense. L'acrostyle pourrait également retenir certaines molécules impliquées dans le déclenchement des mécanismes de défenses pour retarder ou minimiser les réponses de la plante. Nous pensons par exemple aux protéines qui fixent les ions Ca^{2+} et qui sont responsable des flux calciques dans les cellules végétales.

Nous n'avons pas eu le temps d'initier des expérimentations pour répondre à cette question dans le cadre de la thèse. Une première approche à mettre en œuvre serait le criblage d'une banque d'*A. thaliana* contre les stylines dans le système double-hybride en levure.

3. Détermination du rôle de l'acrostyle dans la transmission des virus de plante

L'acrostyle jouerait donc un rôle clef pour l'insecte lui-même, en retenant certaines molécules comme des effecteurs de salive. Les virus auraient exploité cette capacité pour s'y accrocher eux-mêmes, et assurer leur transmission de plante à plante.

Un autre objectif de ma thèse était de déterminer le rôle de l'acrostyle et/ou des stylines dans la transmission de deux virus non circulants. J'ai participé aux études de l'équipe en appliquant les approches de validation fonctionnelle sur les gènes *stylins*, puis j'ai recherché leur implication d'une part dans la transmission du CaMV, déjà connu pour interagir avec l'acrostyle via le facteur assistant P2, et d'autre part dans la transmission d'un potyvirus, le TuMV.

Dans un premier temps, nous avons recherché les rôles de Stylin-01 et de Stylin-02 dans la transmission du CaMV. L'ARN interférence a montré qu'une diminution de l'expression du gène *stylin-01* chez *M. persicae* entraînait une baisse de la transmission. La diminution des transcrits *stylin-02* n'a par contre pas eu d'impact sur la capacité des pucerons à transmettre le virus.

Des tests de transmission ont aussi été réalisés avec des pucerons *A. pisum* de la lignée KO Stylin-01, nous permettant d'observer une différence considérable avec le taux de transmission des pucerons

contrôles. Néanmoins, il reste une transmission résiduelle et la fusion P2-GFP s'accroche toujours sur l'acrostyle de cette lignée.

L'ensemble de ces résultats nous amène à proposer plusieurs hypothèses. La première est que le CaMV aurait plusieurs récepteurs. Stylin-01 serait en effet le récepteur principal, mais d'autres protéines pourraient également interagir avec la protéine virale P2. La seconde hypothèse est que l'absence de Stylin-01 est partiellement compensée par une autre protéine qui, lorsque Stylin-01 est présente, n'est pas accessible et pas (ou peu) utilisée par le virus. Cette protéine pourrait être Stylin-02 dont la séquence est très proche de Stylin-01, en particulier au niveau du domaine C-terminal détecté en surface de l'acrostyle. L'utilisation combinée de siRNA ciblant Stylin-01 et Stylin-02, ou n'importe quelle autre protéine cuticulaire des stylets pourrait être envisagée, ainsi que générer des double-mutants par la technologie CRISPR-Cas9. Enfin, nous ne pouvons pas non plus écarter la possibilité que les taux de transmission du CaMV diffèrent d'un clone à l'autre, indépendamment de la mutation introduite dans le génome par CRISPR/Cas9. Nous devons absolument mesurer les taux de transmission d'autres lignées non mutées avant de tirer des conclusions catégoriques.

Quoiqu'il en soit, Stylin-01 est pour l'instant le meilleur candidat récepteur du CaMV, et le seul caractérisé à ce jour pour les virus non circulants.

Dans un second temps, je me suis focalisée sur la transmission du TuMV, un potyvirus qui est utilisé en routine dans l'équipe. Nous n'avons pas encore déterminé avec précision les sites d'attachement de ce virus dans les stylets, mais nos premières observations en MET de stylets de pucerons *A. gossypii* nourris sur plante infectée ont permis d'observer du virus non pas dans le canal commun mais au début du canal alimentaire, soit un peu plus haut que l'acrostyle.

Les tests de transmission du TuMV avec des pucerons de la lignée KO suggèrent que Stylin-01 ne serait pas impliquée dans la transmission de ce virus, ou du moins qu'elle ne serait pas le récepteur principal. Il y aurait donc d'autres récepteurs dans les stylets de puceron et il semblerait que tous les virus à stratégie *helper* n'utilisent pas les mêmes récepteurs.

Nous avons pu constater que des pucerons *M. persicae* ayant ingéré des siRNA ciblant *stylin-04* transmettaient systématiquement moins le TuMV. Malheureusement nous n'avons pas encore réussi à prouver par PCR quantitative que le gène *stylin-04* avait bien été impacté par le traitement. Stylin-04 représente toutefois une candidate sérieuse et des études complémentaires devront être réalisées. L'équipe envisage notamment de refaire des essais en contrôlant le comportement alimentaire des pucerons par EPG, comme cela avait été fait pour la caractérisation du rôle de Stylin-01 dans la transmission du CaMV.

Pour compléter ces travaux, il serait important de regarder si des pucerons nourris avec des siRNA *stylin-04* sont également affectés dans leur capacité à transmettre d'autres espèces de potyvirus. Une étude vient d'ailleurs de montrer, via l'approche ARN interférence, qu'une réduction de l'expression du gène *mpcp2* chez *M. persicae* était associée à une diminution de transmission du *Potato virus Y* (PVY)

(Kamangar et al., 2019). Ce gène, qui code pour une protéine RR-2, était déjà connu pour interagir *in vitro* avec la protéine HC-Pro du *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Dombrovsky et al., 2007b). Cependant, la protéine MPCP2 n'a pas été détectée en protéomique dans les stylets de puceron, et le comportement des pucerons traités n'a pas été contrôlé dans cette étude. Des expérimentations complémentaires sont nécessaires pour pouvoir conclure sur son rôle dans la transmission du PVY. Cette protéine reste néanmoins considérée comme une candidate intéressante car elle est citée pour deux potyvirus différents. De plus il s'agit d'une protéine RR-2, proche des protéines que nous avons identifiées dans les stylets. Il n'est donc pas exclu que les potyvirus utilisent différents récepteurs, mais à ce stade, nous ne pouvons que spéculer.

Par la suite, notre étude devra être élargie à d'autres virus non circulants, notamment ceux transmis selon la stratégie capsidale, comme le CMV. Une étude a déjà montré une interaction entre Stylin-01 et la protéine de capsidale du CMV dans le système double-hybride en levure (Liang and Gao, 2017). Ces résultats préliminaires constituent une première piste mais doivent être validés biologiquement, d'autant plus que l'équipe avait quant à elle, mis en évidence une interaction *in vitro* entre des peptides de protéines RR-2 et la capsidale du CMV (Webster et al., 2017). Il est de nouveau possible que deux récepteurs soient impliqués. Pour l'instant, l'équipe envisage de réaliser d'abord des tests de transmission du CMV avec les lignées KO Stylin-01. Le protocole doit néanmoins être adapté, car actuellement les pucerons *A. pisum* ont du mal à s'alimenter sur les plantes sur lesquelles passe le virus (la courgette). Des expérimentations sont actuellement en cours pour définir ce protocole.

4. Interactions effecteurs/virus

Virus et effecteurs seraient donc retenus sur l'acrostyle. Pour le moment, nous ne savons pas s'ils pourraient s'accrocher en même temps sur cet organe, et dans ce cas, entrer en compétition pour un seul et même récepteur, ou s'ils seraient au contraire retenus de manière indépendante. Plusieurs scénarios sont en effet possibles.

Nous pouvons facilement imaginer que l'accrochage de l'un favorise le décrochage de l'autre. Par exemple, lorsque l'insecte concentre ses effecteurs sur l'acrostyle, ceux-ci décrocheraient les particules virales déjà retenues à la surface de l'organe, permettant aux virus d'être relargués dans la plante et donc d'assurer leur transmission.

Les effecteurs pourraient aussi favoriser l'accrochage de certains virus en surface de l'acrostyle, en tant que cofacteur. En ce qui concerne le CaMV, c'est cependant peu probable car nous n'avons pas besoin d'ajouter de la salive pour accrocher *in vitro* la protéine P2 sur stylets disséqués. Pour les potyvirus, nous n'en savons rien car nous n'avons toujours pas déterminé les conditions d'accrochage de la protéine HC-Pro sur les stylets disséqués. Il en est de même pour la capsidale du CMV.

Enfin, lorsque des particules virales viennent saturer l'acrostyle, on peut imaginer que le puceron n'arriverait plus à concentrer ses effecteurs et que son alimentation en serait perturbée, l'obligeant à quitter la plante sur laquelle il se trouve. Il se déplacerait alors sur un nouvel hôte, où un autre composé (de salive ou de plante) viendrait décrocher les particules virales. Le puceron propagerait ainsi plus rapidement et plus efficacement les virus non circulants.

Il serait donc intéressant pour l'équipe de creuser ces questions dans le futur, d'autant plus que peu de choses sont connues concernant les mécanismes de décrochage des virus. Certains, comme le CMV ou le PVY, sont en effet connus pour être inoculés au moment de la sous-phase II-1, lors de la première piqûre d'essai dans les cellules végétales (Martin et al., 1997). D'autres, comme le CaMV, sont inoculés au moment de la sous-phase II-2 (Moreno et al., 2005, 2012). Le comportement alimentaire représenté par cette deuxième sous-phase reste peu clair, et une étude a émis l'hypothèse qu'elle pourrait représenter une phase différente de salivation, probablement via l'injection d'un autre type de salive (Moreno et al., 2012).

Durant ma thèse, j'ai initié quelques essais préliminaires en recherchant des interactions dans le système double-hybride en levure entre l'effecteur Mp10 et des protéines virales (P2, HC-Pro et la capside du CMV), mais aucune interaction n'a été observée. Si nous trouvions des conditions adéquates pour saturer les stylets avec la protéine Mp10, nous pourrions aussi réaliser des tests de compétition *in vitro*, en pré-incubant des stylets disséqués avec Mp10, puis avec la protéine virale P2. De cette manière, nous pourrions déjà voir s'ils utilisent les mêmes sites d'accrochage dans l'acrostyle.

5. Conclusion sur les approches de validation fonctionnelle

L'approche ARN interférence a été développée au laboratoire sur nos gènes candidats. Le protocole mis au point avec *stylin-01* (ingestion de siRNA à des larves *M. persicae*) est désormais utilisé en routine dans l'équipe. Il n'a cependant pas permis d'éteindre totalement l'expression des gènes *stylins* et son efficacité s'est révélée très variable et peu reproductible d'une expérience à l'autre.

Nous pourrions essayer d'autres méthodes décrites dans la littérature pour diminuer l'expression des gènes chez le puceron, comme par exemple la pulvérisation de siRNA sur les insectes (Thairu et al., 2017), ou l'ingestion non pas de siRNA mais de dsRNA par des pucerons *M. persicae* (Mulot et al., 2016, 2018). Néanmoins, leur mise en place prendrait de nouveau un certain temps alors qu'elles ne semblent pas non plus efficaces sur tous les gènes, et n'éteignent jamais totalement leur expression.

De plus, dans notre contexte, nous nous heurtons à un grand nombre de contraintes telles que le tissu à cibler (les glandes rétortiformes dans la tête) ou encore la fenêtre de temps où le traitement doit être efficace (avant la synthèse des nouveaux stylets, donc quelques heures avant la mue). Or, nous mesurons les niveaux des transcrits à un temps précis alors que l'expression des gènes cuticulaires étudiés varient

énormément au cours du développement. Nous mesurons aussi les niveaux de transcrits dans le puceron entier et nous savons que les stylines sont localisées dans tout l'exosquelette. Il est donc tout à fait possible que ces niveaux reflètent ceux d'autres tissus de l'insecte et en aucun cas ceux des glandes rétortiformes. Autrement dit, nous pensons que la quantité de transcrits mesurée reflète difficilement le nombre de protéines dans l'acrostyle au moment où nous recherchons les phénotypes.

Nous nous interrogeons ainsi sur l'intérêt de mesurer l'expression des gènes par PCR quantitative, d'autant plus que nous avons parfois observé des phénotypes sans avoir au préalable réussi à valider l'efficacité des traitements. Il faudrait sans doute développer d'autres méthodes pour le prouver. Nous avons déjà tenté de « quantifier » les stylines présentes dans l'insecte ou dans la tête par *western blot* en comparant pucerons traités et pucerons contrôles, mais les résultats n'ont pas été convaincants. Nous avons aussi essayé d'évaluer les protéines dans l'acrostyle en réalisant des immuno-marquages sur stylets de pucerons traités. Néanmoins, la fluorescence est difficile à quantifier, notamment car les stylets ne sont pas toujours disposés de la même manière sur les lames de microscopie, et parce que les stylets de l'espèce *M. persicae* sont plus petits que ceux d'*A. pisum*.

Nous avons obtenu des lignées KO Stylin-01 grâce aux travaux de l'équipe de Gaël Le Trionnaire, qui a réussi à mettre en place le système CRISPR-Cas9 chez le puceron. Nous avons caractérisé, dans le cadre de ma thèse, une première lignée KO.

Jusqu'à présent, nous avons l'habitude au laboratoire de travailler avec des pucerons qui se multipliaient par parthénogénèse, c'est-à-dire avec des individus provenant d'un seul et même clone. L'interprétation des données et les comparaisons entre deux traitements étaient donc en théorie plus « simples ». Pour générer les lignées KO, il a fallu induire la reproduction sexuée afin d'injecter les ARN guides et l'enzyme Cas9 directement dans des œufs. Nous possédons ainsi des lignées KO distinctes, provenant de l'éclosion d'œufs différents. Nos lignées contrôles correspondent quant à elles à l'éclosion d'œufs non injectés mais issus des mêmes croisements. Nous sommes donc face à des lignées de pucerons qui n'ont plus le même fond génétique, ce qui complique l'interprétation des résultats.

De plus, les études de CRISPR-Cas9 chez d'autres insectes ont jusqu'ici ciblé des gènes impliqués dans le développement, la fécondité et la survie des insectes, engendrant par exemple de lourdes malformations des embryons (Bi et al., 2016; Huang et al., 2016; Li et al., 2017a; Liu et al., 2017), ou encore un changement de pigmentation des yeux (Khan et al., 2017). A notre connaissance, nous sommes les premiers à utiliser des insectes génétiquement modifiés par CRISPR-Cas9 pour comparer des phénotypes liés à la transmission de pathogènes. Or nous savons que deux clones d'une même espèce de puceron peuvent transmettre un même virus avec des taux très différents (Bosquee et al., 2016; Symmes and Perring, 2007). Nous ne l'avons pas mesuré mais nous pouvons aussi supposer qu'ils possèdent des comportements alimentaires différents. Etant donné que nous n'avons pas obtenu de phénotypes clairs comme l'abolition totale de la transmission du CaMV, il est pour nous moins évident de relier formellement ces phénotypes à l'absence de Stylin-01, en nous limitant seulement à la comparaison de

deux lignées. Pour la suite de nos expériences, nous envisageons de multiplier les lignées contrôles dans nos essais afin de conforter les résultats très prometteurs que nous avons obtenus.

En combinant ces deux approches de validation fonctionnelle, nous avons observé plusieurs phénotypes en commun, et nous avons pu tirer de nombreuses conclusions sur le rôle des protéines stylines.

6. Conclusion de la thèse

Grâce au travail de plusieurs équipes réunissant de nombreuses disciplines, des avancées conséquentes ont finalement été obtenues sur le sujet. Pour la première fois, nous avons caractérisé le protéome des stylets de puceron, nous permettant d'identifier au moins trois protéines candidates supplémentaires dans l'acrostyle, en plus de Stylin-01 et de Stylin-02. En parallèle, nous avons également développé au laboratoire deux approches de validation fonctionnelle pour les stylines, l'ARN interférence et le système CRISPR-Cas9.

Nous avons pu caractériser les fonctions de trois stylines (**Fig. 31**). Stylin-01 représente ainsi, non seulement le meilleur candidat récepteur du CaMV mais également le premier à avoir été identifié dans les stylets de pucerons. Stylin-04 est une candidate sérieuse qui pourrait être impliquée dans la transmission d'un potyvirus, et dont la caractérisation devra être approfondie. Enfin, j'ai montré que Stylin-03 interagit avec un effecteur de salive, Mp10, et démontré pour la première fois que l'acrostyle joue bel et bien un rôle pour le puceron lui-même, puisqu'il serait impliqué dans les phases d'alimentation de l'insecte.

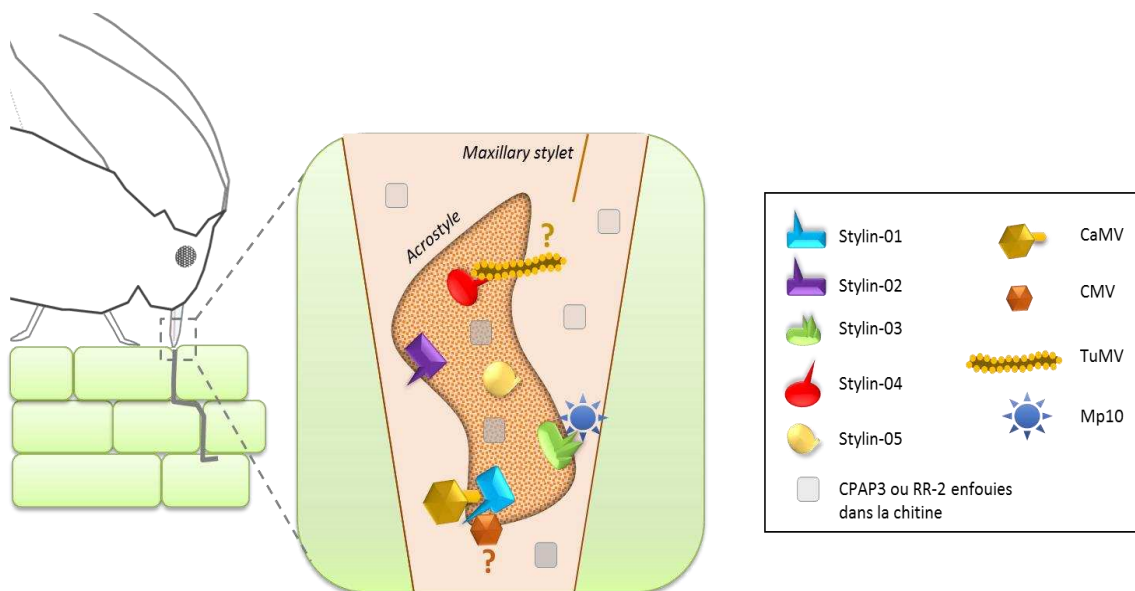


Figure 31. Représentation schématique des protéines cuticulaires identifiées à la pointe des stylets maxillaires de pucerons

Les cinq stylines dans l'acrostyle et leurs partenaires respectifs sont représentés en couleur. La légende des symboles est indiquée dans l'encadré.

Pour aller plus loin dans les mécanismes d'interaction, il faudrait réussir à obtenir la structure 3D des styletines, en interaction avec leurs différents partenaires. Ceci nous permettrait notamment de connaître les sites actifs de ces protéines pour pouvoir, dans le futur, développer des compétiteurs ou autres agents bloquants et ainsi neutraliser leurs fonctions.

Or, travailler avec nos protéines candidates s'est toujours révélé compliqué, que ce soit les protéines cuticulaires ou leurs partenaires (virus et effecteurs). Nous avons tenté beaucoup d'approches différentes pour identifier des interactions protéine-protéine mais sans succès. L'équipe de Patrick Bron (CBS, Montpellier) a observé en RMN 1D que les styletines n'étaient pas du tout repliées *in vitro*. Il n'existe d'ailleurs aucune donnée structurale dans la littérature concernant les protéines cuticulaires des arthropodes en général. Ces protéines ne sont peut-être correctement repliées que dans le matériau cuticule où elles sont enchâssées dans de la chitine. Nous avons tenté de forcer leur repliement, même partiellement, notamment en ajoutant des oligomères de chitine dont la production a été prise en charge par l'équipe de Laurent David (Université Lyon 1). Aucun de ces essais n'a pour l'instant donné de pistes prometteuses, mais l'équipe va continuer, dans le futur, à collaborer avec nos collègues structuralistes et chimistes pour casser ce verrou.

En conclusion, ces avancées pourraient s'avérer très importantes pour la lutte contre le puceron. Bien qu'ils soient encore éloignés d'une possible application au champ, ces résultats démontrent qu'il serait pertinent de cibler l'acrostyle pour limiter les dégâts engendrés par ce ravageur. En effet, cibler cet organe multifacette pourrait permettre à la fois de bloquer les interactions vecteur/virus, et ainsi diminuer la dissémination des maladies virales, mais peut-être aussi limiter l'installation de l'insecte sur la plante hôte en altérant son comportement alimentaire. L'ARN interférence et le système CRISPR-Cas9 ont déjà montré dans nos conditions qu'il était possible de limiter la dispersion d'un virus transmis par puceron avec ces approches. De plus, puisque le protéome des pièces buccales a été obtenu, et que les stylets sont les appendices indispensables à la survie de l'insecte, ses protéines pourraient représenter de nouvelles cibles. Enfin, puisque l'acrostyle n'a, pour le moment, jamais été identifié chez d'autres hémiptères et bien qu'il faille toujours le vérifier, cibler cet organe permettrait de lutter contre le puceron de manière spécifique.

Matériel et méthodes complémentaires

1. Anticorps

Les anticorps dirigés contre les stylines sont des anticorps produits en lapin contre des peptides spécifiques des stylines. Ils sont décrits dans l'article du chapitre 1 de la thèse. L'anticorps anti-Mp10 est un anticorps polyclonal de poulet (Mugford et al., 2016) qui a été fourni par Saskia Hogenhout (JIC, Norwich, UK). L'anticorps anti-his-tag est un anticorps commercial monoclonal de souris (MA1 21315, Thermo Fisher Scientific).

Les anticorps secondaires sont *goat-anti rabbit* – Alexa-488 (W3006F, Fisher Scientific), *goat-anti-rabbit* – AP (A3687, Sigma-Aldrich), *goat-anti-mouse* – AP (A3562, Sigma-Aldrich) ou *goat-anti-chicken* – AP (25593, Euromedex).

Pour les immuno-marquages des mues, les anticorps sont utilisés au 1/300^{ème}. Pour les *western blot*, les anticorps primaires et secondaires sont respectivement dilués au 1/3000^{ème} et au 1/1500^{ème}, et pour les *peptide array*, au 1/5000^{ème} et au 1/10.000^{ème}.

2. Immuno-marquage des mues

Les mues du puceron *A. pisum* sont incubées en SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 1 % pendant une nuit avant d'être rincées en éthanol 70 %, puis en tampon PBS 1 X (0,137 M NaCl, 0,0043 M Na₂HPO₄, 0,0014 M KH₂PO₄, 0,0027 M KCl, pH 7,4). Elles sont ensuite saturées pendant 3 h dans une solution de blocage (PBS 1 X, BSA 5 %, Tween20 0,02 %), et incubées toute la nuit dans l'anticorps primaire. En parallèle, les mues servant ici de contrôle négatif sont incubées dans une solution de blocage sans l'anticorps. Après rinçages en PBS 1 X + Tween20 0,02 %, les mues sont incubées 1 h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé à un Alexa-488. Enfin, après les derniers rinçages, les mues sont mises dans du glycérol 10 % pour observation en microscopie confocale, en mode « Z-stack » et au grossissement x10 (ZEISS, laser 488 nm, BP 450-490, LP515).

3. Recherche d'interactions protéine/protéine

3.1. Western blot et far western blot

L'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes a été conduite suivant la technique décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Pour la dénaturation des échantillons, 1 volume de tampon de dissociation 4 X (100 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 0,5 % β-mercaptoéthanol, 30 % Glycérol, 0,05 % Bleu de bromophénol) est ajouté à 3 volumes d'échantillon à analyser. L'échantillon est ensuite chauffé 5 min à 105°C puis 10 µl est déposé sur un gel SDS-PAGE (*polyacrylamide dodécylsulfate de sodium*) dont la concentration varie en fonction de la taille des protéines à observer (de 12 à 15 %). L'électrophorèse s'effectue en tampon Tris-glycine-SDS (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % SDS) à 200 V sous une intensité de 20 mA pendant environ 1 h.

Pour une coloration non spécifique des protéines, les gels sont ensuite immergés dans un bain au bleu de Coomassie (45 % méthanol, 10 % acide acétique, 2,5 g/l de Bleu de Coomassie R250) pendant 1 h sous agitation. L'excès de colorant est éliminé par bains successifs dans une solution de décoloration (45 % méthanol, 10 % acide acétique).

Pour le *western blot*, le gel est ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose (Optitran, BA-S 85, VWR) par transfert semi-sec dans un appareil EBU 4000 (C.B.S Scientific) sous un ampérage de 2 mA/cm² pendant 2 h avec du tampon Tris-Glycine-Méthanol (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Méthanol). La membrane est saturée 15 min en tampon de blocage (TS 1 X [0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4], lait écrémé en poudre 5 %, Tween20 0,05%) pour saturer les sites aspécifiques. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit puis, après trois rinçages en tampon TS, avec l'anticorps secondaire AP pendant 1 h. La membrane est enfin rincée deux fois en tampon TS et incubée 5 min en tampon de révélation (100 mM, Tris pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl). Les protéines sont alors révélées par réaction enzymatique colorée. La membrane est incubée avec 10 ml de tampon de révélation supplémenté avec 35 µl de 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP) qui est un substrat de la phosphatase alcaline, et 45 µl de Nitroblue Tetrazolium Chloride (NBT) qui catalyse la réaction enzymatique. Une coloration violet foncé se développe au niveau de la protéine reconnue par l'anticorps. La réaction est arrêtée par rinçage à l'eau.

Pour le *far western blot*, après saturation dans la solution de blocage, la membrane est incubée 24 h en présence du composé avec lequel l'interaction est testée (40-50 µg). La membrane est ensuite rincée trois fois en tampon TS pendant 10 min puis les incubations avec les anticorps et la révélation sont identiques au protocole décrit pour le *western blot*.

En ce qui concerne la recherche d'une interaction entre Stylin-03 et Mp10, différentes fusions de Mp10 ont été déposées sur gel SDS-page (His-Mp10, TRX-Mp10 ou TRX seule en contrôle), puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est alors incubée avec Stylin-03 purifiée dont la présence au niveau des fusions Mp10 est recherchée via un anticorps spécifique. L'interaction a également été testée dans l'autre sens en chargeant Stylin-03 sur gel et en incubant la membrane avec Mp10.

3.2. Co-immunoprécipitation

Des co-IP ont été réalisées en utilisant des Dynabeads® (Novex by Life technologies) selon le protocole du fournisseur. Brièvement, les billes sont pré-incubées avec un anticorps dirigé contre Stylin-03, puis incubées avec les protéines Stylin-03 et His-Mp10 préalablement purifiées. Après plusieurs rinçages successifs, les éluats sont récupérés et déposés sur gel SDS-page, puis la présence de Mp10 est recherchée en *western blot*, grâce à l'anticorps anti-his-tag. L'interaction a également été recherchée

dans l'autre sens (incubation des billes avec l'anticorps anti-his-tag et His-Mp10, puis vérification de l'accrochage de Stylin-03).

3.3. GST pull-down

La séquence du gène codant pour Stylin-03 a été clonée par Bastien Cayrol dans le plasmide PGEX-3X en fusion avec celle codant pour la Gluthatione-S-Transférase (GST). La fusion a ensuite été produite dans la bactérie *E. coli* de la même manière que TRX-Mp10 ([voir article du chapitre 4](#)).

Les essais de GST pull-down ont ensuite été effectués avec le kit *MagneGSTTM protein purification system* de Promega, selon le protocole du fournisseur. Brièvement, des billes magnétiques sont incubées avec la fusion GST-Sty03 ou avec la GST seule (contrôle) puis avec His-Mp10 purifiée. Comme précédemment, la présence de His-Mp10 dans les éluats est recherchée avec l'anticorps anti-his-tag.

3.4. Peptide array

Des lames *peptide-array* ont été produites. Une collection de peptides de 18 acides aminés chevauchants couvrant la totalité des séquences des protéines cuticulaires (RR-1 ou RR-2) du puceron *A. pisum* a été déposée sur membrane de nitrocellulose, elle-même fixée sur lame de verre (384 peptides au total déposés en double). Le protocole d'utilisation de ces lames a déjà été décrit dans une étude menée par l'équipe, visant à rechercher des interactions *in vitro* avec certains virus de plante, comme le CMV ([Webster et al., 2017](#)).

Brièvement, la lame *peptide array* (*Intavis proteomic solution*) est saturée pendant 3 h dans une solution de blocage (TS 1 X, lait écrémé en poudre 5 %, Tween20 0,05 %). Elle est ensuite incubée avec 40-50 µg de la protéine dont on souhaite observer l'interaction (TRX-Mp10, His-Mp10, TRX seule etc.), diluée dans du TBS-T (TS 1 X, Tween20 0,05 %), 24 h à 4°C sous agitation. Après trois rinçages de 30 min en TBS-T, la lame est incubée avec l'anticorps primaire dans une solution de blocage pendant une nuit, sous agitation, à 4°C (anticorps anti-Mp10 ou anti-his-tag). Après trois rinçages de 30 min en TBS-T, la lame est incubée avec l'anticorps secondaire dans la solution de blocage, à température ambiante pendant 2 à 4 h. La lame est rincée une fois pendant 30 min puis deux fois pendant 10min en TBS-T. L'interaction est ensuite révélée pendant plusieurs minutes avec 5 ml de tampon de révélation dans lequel ont été rajoutés 16,5 µl de BCIP et 33 µl de NBT, comme pour un *western blot*.

3.5. BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*)

Les fusions EYFP ont été clonées par Caroline Hemmer et transformées dans la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (souche GV3101) par électroporation (C= 25µF, PC = 200 ohm, V=2.7kV) sur milieu LB sélectif (Spectinomycine 50µg/ml, Gentamicine 20µg/ml et Rifampicine 50µg/ml).

Les agrobactéries sont mises en pré-culture une nuit à 28°C dans du LB (Luria Bertani) liquide, toujours avec antibiotiques, puis centrifugées 10 min. Les culots sont re-suspendus dans 1ml d'un milieu adéquat

pour l'infiltration (10 mM MES pH 5,6, 10 mM MgCl₂, 20 mM acétylsyringone) puis mis en culture 1 h à 28°C. Ils sont ensuite dilués dans le même tampon de manière à atteindre une DO₆₀₀ finale de 0,2. Les cultures de chaque construit EYFP sont mélangées et agro-infiltrées à la main à l'aide d'une seringue sous des feuilles de tabac *N. benthamiana* âgées de 4 à 6 semaines. Au total, 2 à 3 patches de chaque culture sont agro-infiltrées par feuille (trois répliques). Enfin, les feuilles sont poinçonnées 48 h après agro-infiltration et la fluorescence est observée en microscopie confocale au grossissement x20 (ZEISS, laser 488 nm, BP 450-490, LP515).

4. Tests de transmission du CaMV et du TuMV avec les pucerons

A. *pisum* issus des lignées contrôle et KO

Les pucerons du pois *A. pisum* issus des lignées contrôle et KO sont élevés sur des plants de fèves (*Vicia faba* cv. Robin Hood) et maintenus dans une pièce à 18°C avec une photopériode de 16/8 h (jour/nuit).

Pour les tests de transmission, des adultes issus des deux lignées sont mis à pondre sur une plante pendant deux jours. Les larves de stade L1-L2 sont récupérées pour les tests de transmission et sont mises à jeûner dans des tubes en verre pendant 1 h pour favoriser leur prochaine prise alimentaire.

Pour le CaMV : les larves sont installées pendant **2 min** sur navet (*Brassica rapa* cv. Just Right) infecté avec la souche Cabb B-JI du CaMV (23 jours post-infection).

Pour le TuMV : les larves sont installées pendant **2 min** sur navet infecté avec la souche C42 du TuMV (23 jours post-infection).

Une même plante source est utilisée pour chaque couple contrôle/KO. Les pucerons sont ensuite transférés sur des navets sains âgés de 8 jours (**2 pucerons/navet**, 48 plantes par lignée) pendant au moins 2 h pour inoculation. Les pucerons sont ensuite tous retrouvés et éliminés manuellement, les traitements étant vivement déconseillés dans le laboratoire de confinement. Les symptômes sont suivis pendant 30 jours.

5. Tests de transmission du TuMV avec des pucerons *M. persicae* traités avec des siRNA ciblant *stylin-04*

Le protocole est le même que celui présenté dans l'article du [chapitre 3](#). Brièvement, des larves âgées de 0 à 3 jours sont traitées avec des siRNA contrôle (NC-siRNA), ou des siRNA ciblant le gène *stylin-04* (Sty04-siRNA), par ingestion sur un milieu artificiel. Les Sty04-siRNA correspondent en fait à un mélange de deux siRNA différents, dont les séquences sont listées dans la **Table 2**. Au jour 6, après 72 h de traitement, entre 2 et 6 pools de 10 pucerons sont prélevés pour analyser les niveaux de transcrits du gène *stylin-04* par RT-qPCR avec le couple d'amorces qSty04_Mp_For/qSty04_Mp_Rev (**Table 2**). En parallèle, des pucerons sont récupérés pour effectuer les tests de transmission. Pour cela, les pucerons

sont mis à jeûner dans des tubes en verre pendant 1 h, puis installés pendant **2 minutes** sur navet (*Brassica rapa* cv. Just Right) infecté avec la souche C42 du TuMV (23 jours post-infection) pour l'acquisition du virus. Une même plante source est utilisée pour chaque couple NC/*stylin*. Les pucerons sont ensuite transférés individuellement sur des navets sains âgés de 8 jours (**1 puceron/navet**, 72 plantes par traitement NC et *stylin*) pendant 2 h minimum pour inoculation. Les symptômes sont enfin suivis pendant 30 jours.

Table 2. Liste complémentaire des amorces et siRNA utilisés dans l'étude RNAi du gène *stylin-04*

Nom	Séquence (5' en 3')	Commentaires
RT-qPCR		
qSty04_Mp_For	CCATTCAACGAGCAGTAGCC	Amplifie <i>stylin-04</i> (<i>M. persicae</i>)
qSty04_Mp_Rev	CGGGTTTGGAATCATTACATA	
siRNA		
Sty04-siRNA	CAGCAAUCGUUCGAUCUCU(+dTdT) AUGCGUUUCACCGAAUAA(+dTdT)	Cible les ARNm de <i>stylin-04</i> (<i>M. persicae</i>)

Bibliographie

- Abdellatef, E., Will, T., Koch, A., Imani, J., Vilcinskis, A., and Kogel, K.-H. (2015). Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid *Sitobion avenae*. *Plant Biotechnol. J.* *13*, 849–857.
- Adams, M.J. (1991). Transmission of plant viruses by fungi. *Ann. Appl. Biol.* *118*, 479–492.
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* *17*, 73–90.
- Allison, R.F., Dougherty, W.G., Parks, T.D., Willis, L., Johnston, R.E., Kelly, M., and Armstrong, F.B. (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* *147*, 309–316.
- Ammar, E.D. (1994). Propagative Transmission of Plant and Animal Viruses by Insects: Factors Affecting Vector Specificity and Competence. In *Advances in Disease Vector Research*, K.F. Harris, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 289–331.
- Ammar, E.-D., Gargani, D., Lett, J.M., and Peterschmitt, M. (2009). Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch. Virol.* *154*, 255–262.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 13079–13084.
- Andersen, S.O. (1998). Amino acid sequence studies on endocuticular proteins from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *28*, 421–434.
- Andersen, S.O. (2000). Studies on proteins in post-ecdysial nymphal cuticle of locust, *Locusta migratoria*, and cockroach, *Blaberus craniifer*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *30*, 569–577.
- Andersen, S.O., and Højrup, P. (1987). Extractable proteins from abdominal cuticle of sexually mature locusts, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* *17*, 45–51.
- Andersen, S.O., Rafn, K., and Roepstorff, P. (1997). Sequence studies of proteins from larval and pupal cuticle of the yellow meal worm, *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *27*, 121–131.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., and Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus : still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* *86*, 183–195.
- Apostolou, A., Shen, Y., Liang, Y., Luo, J., and Fang, S. (2008). Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp. Cell Res.* *314*, 2454–2467.
- Arakane, Y., Lomakin, J., Gehrke, S.H., Hiromasa, Y., Tomich, J.M., Muthukrishnan, S., Beeman, R.W., Kramer, K.J., and Kanost, M.R. (2012). Formation of Rigid, Non-Flight Forewings (Elytra) of a Beetle Requires Two Major Cuticular Proteins. *PLoS Genet.* *8*, e1002682.
- Atamian, H.S., Chaudhary, R., Cin, V.D., Bao, E., Girke, T., and Kaloshian, I. (2013). In Planta Expression or Delivery of Potato Aphid *Macrosiphum euphorbiae* Effectors Me10 and Me23 Enhances Aphid Fecundity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *26*, 67–74.
- Atreya, C.D., and Pirone, T.P. (1993). Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 11919–11923.

- Awata, H., Watanabe, T., Hamanaka, Y., Mito, T., Noji, S., and Mizunami, M. (2015). Knockout crickets for the study of learning and memory: Dopamine receptor Dop1 mediates aversive but not appetitive reinforcement in crickets. *Sci. Rep.* 5, 15885.
- Awolola, T.S., Oduola, O.A., Strode, C., Koekemoer, L.L., Brooke, B., and Ranson, H. (2009). Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector *Anopheles gambiae* sensu stricto from Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1139–1145.
- Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., Osakabe, M., Vontas, J., and Van Leeuwen, T. (2017). A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 80, 79–90.
- Bak, A., Gargani, D., Macia, J.-L., Malouvet, E., Vernerey, M.-S., Blanc, S., and Drucker, M. (2013). Virus Factories of Cauliflower Mosaic Virus Are Virion Reservoirs That Engage Actively in Vector Transmission. *Journal of Virology* 87, 12207–12215.
- Balch, R.E. (1952). Studies of the balsam woolly aphid, *Adelges piceae* (Ratz.) (Homoptera: Phylloxeridae) and its effects on balsam fir, *Abies balsamea* (L.) Mill (Science Service, Division of Forest Biology, Dominion Entomological Laboratory).
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., and Lee, R.F. (1989). The Continuous Challenge of Citrus Tristeza Virus Control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27, 291–316.
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., and Williamson, M.S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 41–51.
- Bassett, A.R., and Liu, J.-L. (2014). CRISPR/Cas9 and Genome Editing in *Drosophila*. *J. Genet. Genomics* 41, 7–19.
- Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., and Liu, J.-L. (2013). Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Rep.* 4, 220–228.
- Baumann, L., and Baumann, P. (1995). Soluble salivary proteins secreted by *Schizaphis graminum*. *Entomol. Exp. Appl.* 77, 57–60.
- Berger, P.H., and Pirone, T.P. (1986). The effect of helper component on the uptake and localization of potyviruses in *Myzus persicae*. *Virology* 153, 256–261.
- Berthelot, E., Macia, J.-L., Martinière, A., Morisset, A., Gallet, R., Blanc, S., Khelifa, M., and Drucker, M. (2019a). Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses, turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *Sci. Rep.* 9, 9374.
- Berthelot, E., Ducouso, M., Macia, J.-L., Bogaert, F., Baecker, V., Thébaud, G., Gallet, R., Yvon, M., Blanc, S., Khelifa, M., et al. (2019b). Turnip Mosaic Virus Is a Second Example of a Virus Using Transmission Activation for Plant-to-Plant Propagation by Aphids. *J. Virol.* 93, e01822-18, /jvi/93/9/JVI.01822-18.atom.
- Bi, H.-L., Xu, J., Tan, A.-J., and Huang, Y.-P. (2016). CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in *Spodoptera litura*. *Insect Sci.* 23, 469–477.

- Bilgi, V., Fosu-Nyarko, J., and Jones, M. (2017). Using Vital Dyes to Trace Uptake of dsRNA by Green Peach Aphid Allows Effective Assessment of Target Gene Knockdown. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 80.
- Blackman, R.L., and Eastop, V.F. (2000). Aphids on the world's crops: an identification and information guide. *Aphids Worlds Crops Identif. Inf. Guide*.
- Blanc, S., Cerutti, M., Usmany, M., Vlak, J.M., and Hull, R. (1993a). Biological Activity of Cauliflower Mosaic Virus Aphid Transmission Factor Expressed in a Heterologous System. *Virology* *192*, 643–650.
- Blanc, S., Cerutti, M., Chaabihi, H., Louis, C., Devauchelle, G., and Hull, R. (1993b). Gene II Product of an Aphid-Nontransmissible Isolate of Cauliflower Mosaic Virus Expressed in a Baculovirus System Possesses Aphid Transmission Factor Activity. *Virology* *192*, 651–654.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J., and Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* *79*, 3119–3122.
- Blanc, S., Drucker, M., and Uzest, M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* *52*, 403–425.
- Bogdanove, A.J. (2014). Principles and applications of TAL effectors for plant physiology and metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* *19*, 99–104.
- Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* *28*, 113–138.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* *60*, 379–406.
- Bos, J.I.B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M.E., Win, J., and Hogenhout, S.A. (2010). A Functional Genomics Approach Identifies Candidate Effectors from the Aphid Species *Myzus persicae* (Green Peach Aphid). *PLoS Genet.* *6*, e1001216.
- Bosquee, E., Yin, R.L., Bragard, C., Yong, L., Chen, J.L., and Francis, F. (2016). Transmission Efficiency of Cucumber Mosaic Virus by *Myzus persicae* According to Virus Strain and Aphid Clone from China. *Asian J. Plant Pathol.* *10*, 61–66.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* *464*, 418–422.
- Boulain, H., Legeai, F., Guy, E., Morlière, S., Douglas, N.E., Oh, J., Murugan, M., Smith, M., Jaquiéry, J., Peccoud, J., et al. (2018). Fast Evolution and Lineage-Specific Gene Family Expansions of Aphid Salivary Effectors Driven by Interactions with Host-Plants. *Genome Biol. Evol.* *10*, 1554–1572.
- Bouligand, Y. (1972). Twisted fibrous arrangements in biological materials and cholesteric mesophases. *Tissue Cell* *4*, 189–217.
- Bouvaine, S., Boonham, N., and Douglas, A.E. (2011). Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *J. Gen. Virol.* *92*, 1467–1474.
- Bradley, R.H.E., Sylvester, E.S., and Wade, C.V. (1962). Note on the Movements of the Mandibular and Maxillary Stylets of the Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)1. *Can. Entomol.* *94*, 653–654.

- Braendle, C., Davis, G.K., Brisson, J.A., and Stern, D.L. (2006). Wing dimorphism in aphids. *Heredity* 97, 192–199.
- Brault, V., Herrbach, É., and Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38, 302–312.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., and Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333, 524–538.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., and Lamb, C. (1994). Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* 6, 1703.
- Budnik, K., Laing, M.D., and da Graça, J.V. (1996). Reduction of yield losses in pepper crops caused by potato virus Y in KwaZulu-Natal, South Africa, using plastic mulch and Yellow sticky traps. *Phytoparasitica* 24, 119–124.
- Calandra, T., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 791.
- Calvello, M., Guerra, N., Brandazza, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Dani, F.R., Turillazzi, S., and Pelosi, P. (2003). Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 1933–1943.
- Calvello, M., Brandazza, A., Navarrini, A., Dani, F.R., Turillazzi, S., Felicioli, A., and Pelosi, P. (2005). Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 297–307.
- Calvo, E., Mans, B.J., Andersen, J.F., and Ribeiro, J.M.C. (2006). Function and Evolution of a Mosquito Salivary Protein Family. *J. Biol. Chem.* 281, 1935–1942.
- Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2006). Recognition and Delivery of Effector Proteins into Eukaryotic Cells by Bacterial Secretion Systems. *Traffic* 7, 929–939.
- Campanacci, V., Lartigue, A., Hällberg, B.M., Jones, T.A., Giudici-Orticoni, M.-T., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2003). Moth chemosensory protein exhibits drastic conformational changes and cooperativity on ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 5069–5074.
- Carolan, J.C., Fitzroy, C.I.J., Ashton, P.D., Douglas, A.E., and Wilkinson, T.L. (2009). The secreted salivary proteome of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* characterised by mass spectrometry. *PROTEOMICS* 9, 2457–2467.
- Carolan, J.C., Caragea, D., Reardon, K.T., Mutti, N.S., Dittmer, N., Pappan, K., Cui, F., Castaneto, M., Poulain, J., Dossat, C., et al. (2011). Predicted Effector Molecules in the Salivary Secretome of the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*): A Dual Transcriptomic/Proteomic Approach. *J. Proteome Res.* 10, 1505–1518.
- Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D., and Dougherty, W.G. (1989a). A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J.* 8, 365–370.
- Carrington, J.C., Freed, D.D., and Sanders, T.C. (1989b). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J. Virol.* 63, 4459–4463.
- Casteel, C.L., Walling, L.L., and Paine, T.D. (2006). Behavior and biology of the tomato psyllid, *Bactericerca cockerelli*, in response to the Mi-1.2 gene. *Entomol. Exp. Appl.* 121, 67–72.
- Charpentier, E., and Doudna, J.A. (2013). Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature* 495, 50–51.

- Chaudhari, P., Ahmed, B., Joly, D.L., and Germain, H. (2014). Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. *Virulence* 5, 703–709.
- Chaudhary, R., Atamian, H.S., Shen, Z., Briggs, S.P., and Kaloshian, I. (2014). GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8919–8924.
- Cheng, R.H., Olson, N.H., and Baker, T.S. (1992). Cauliflower mosaic virus: A 420 subunit (T = 7), multilayer structure. *Virology* 186, 655–668.
- Cherqui, A., and Tjallingii, W.F. (2000). Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J. Insect Physiol.* 46, 1177–1186.
- Chihara, C.J., Silvert, D.J., and Fristrom, J.W. (1982). The cuticle proteins of *Drosophila melanogaster*: Stage specificity. *Dev. Biol.* 89, 379–388.
- Chinchilla, D., and Boller, T. (2012). Innate immunity: pattern recognition in plants. *Eff. Plant–Microbe Interact.* 1–32.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.-S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 230–232.
- Choi, I.-R., Stenger, D.C., and French, R. (2000). Multiple Interactions among Proteins Encoded by the Mite-Transmitted Wheat Streak Mosaic Tritimovirus. *Virology* 267, 185–198.
- Chougule, N.P., Li, H., Liu, S., Linz, L.B., Narva, K.E., Meade, T., and Bonning, B.C. (2013). Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8465–8470.
- Christiaens, O., Swevers, L., and Smagghe, G. (2014). DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* 53, 307–314.
- Chung, S.H., Rosa, C., Scully, E.D., Peiffer, M., Tooker, J.F., Hoover, K., Luthe, D.S., and Felton, G.W. (2013). Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15728–15733.
- Cilia, M., Tamborindéguy, C., Fish, T., Howe, K., Thannhauser, T.W., and Gray, S. (2011). Genetics Coupled to Quantitative Proteomics Links Heritable Aphid and Endosymbiont Protein Expression to Circulative Polerovirus Transmission. *J. Virol.* 85, 2148–2166.
- Cohen, E., and Moussian, B. (2016). *Extracellular composite matrices in arthropods* (New York, NY: Springer Berlin Heidelberg).
- Cooper, W.R., Dillwith, J.W., and Puterka, G.J. (2010). Salivary Proteins of Russian Wheat Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ. Entomol.* 39, 223–231.
- Cooper, W.R., Dillwith, J.W., and Puterka, G.J. (2011). Comparisons of Salivary Proteins From Five Aphid (Hemiptera: Aphididae) Species. *Environ. Entomol.* 40, 151–156.
- Cornman, R.S. (2010). The Distribution of GYR- and YLP-Like Motifs in *Drosophila* Suggests a General Role in Cuticle Assembly and Other Protein-Protein Interactions. *PLOS ONE* 5, e12536.
- Cox, D.L., and Willis, J.H. (1985). The cuticular proteins of *Hyalophora cecropia* from different anatomical regions and metamorphic stages. *Insect Biochem.* 15, 349–362.

- Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C., and Carrington, J.C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549–559.
- Cronshaw, J., and Sabnis, D.D. (1990). Phloem Proteins. In *Sieve Elements: Comparative Structure, Induction and Development*, H.-D. Behnke, and R.D. Sjolund, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 257–283.
- Cryan, J.R., and Urban, J.M. (2012). Higher-level phylogeny of the insect order Hemiptera: is Auchenorrhyncha really paraphyletic? *Systematic Entomology* 37, 7–21.
- Cui, Y., Sun, J.-L., and Yu, L. (2017). Application of the CRISPR gene-editing technique in insect functional genome studies – a review. *Entomol. Exp. Appl.* 124–132.
- Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., and Quiot, J.-B. (2003). Spatial Pattern Analysis of Sharka Disease (Plum pox virus Strain M) in Peach Orchards of Southern France. *Phytopathology* 93, 1543–1552.
- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Van Loon, L.C., Dicke, M., et al. (2005). Signal Signature and Transcriptome Changes of Arabidopsis During Pathogen and Insect Attack. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18, 923–937.
- Dedryver, C.-A. (2007). Pucerons: des dégâts et des hommes. *Biofutur* 22–25.
- Dedryver, C.-A., Le Ralec, A., and Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biol.* 333, 539–553.
- De Vos, M.D., and Jander, G. (2009). *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ.* 32, 1548–1560.
- De Vos, M., Kim, J.H., and Jander, G. (2007). Biochemistry and molecular biology of Arabidopsis–aphid interactions. *BioEssays* 29, 871–883.
- Diezel, C., Dahl, C.C. von, Gaquerel, E., and Baldwin, I.T. (2009). Different Lepidopteran Elicitors Account for Cross-Talk in Herbivory-Induced Phytohormone Signaling. *Plant Physiol.* 150, 1576–1586.
- Dixon, A.F.G. (1998). *Aphid Ecology An optimization approach* (Springer Science & Business Media).
- Dogimont, C., Bendahmane, A., Chovelon, V., and Boissot, N. (2010). Host plant resistance to aphids in cultivated crops: Genetic and molecular bases, and interactions with aphid populations. *C. R. Biol.* 333, 566–573.
- Dolling, W.R. (1991). *Hemiptera*. (Oxford University Press, USA).
- Dombrovsky, A., Sobolev, I., Chejanovsky, N., and Raccach, B. (2007a). Characterization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins from *Myzus persicae*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 146, 256–264.
- Dombrovsky, A., Gollop, N., Chen, S., Chejanovsky, N., and Raccach, B. (2007b). In vitro association between the helper component–proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* 88, 1602–1610.
- Dong, Z., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, X., Zhao, P., and Xia, Q. (2016). Identification and Characterization of Novel Chitin-Binding Proteins from the Larval Cuticle of Silkworm, *Bombyx mori*. *J. Proteome Res.* 15, 1435–1445.

- Dougherty, W.G., Willis, L., and Johnston, R.E. (1985). Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes. *Virology* 144, 66–72.
- Douglas, A., E. (2003). *Advances in Insect Physiology* (Elsevier). Russell Jurenka (Iowa State University, Ames, USA).
- Douglas, A.E., François, C.L.M.J., and Minto, L.B. (2006). Facultative ‘secondary’ bacterial symbionts and the nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol. Entomol.* 31, 262–269.
- Douris, V., Papapostolou, K.-M., Ilias, A., Roditakis, E., Kounadi, S., Riga, M., Nauen, R., and Vontas, J. (2017). Investigation of the contribution of RyR target-site mutations in diamide resistance by CRISPR/Cas9 genome modification in *Drosophila*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 87, 127–135.
- Drucker, M., Froissart, R., Hébrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Espérandieu, P., Mani, J.-C., Pugnière, M., Roquet, F., Fereres, A., et al. (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 2422–2427.
- Drucker, M., and Then, C. (2015). Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Current Opinion in Virology* 15, 63–68.
- Dubrow, Z., Sunitha, S., Kim, J.-G., Aakre, C.D., Girija, A.M., Sobol, G., Teper, D., Chen, Y.C., Ozbaki-Yagan, N., Vance, H., et al. (2018). Tomato 14-3-3 Proteins Are Required for Xv3 Disease Resistance and Interact with a Subset of *Xanthomonas euvesicatoria* Effectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 31, 1301–1311.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related protein: Research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant Physiol.* 31, 105–124.
- Edwards, O., and Singh, K.B. (2006). Resistance to insect pests: What do legumes have to offer? *Euphytica* 147, 273–285.
- Ellis, C., Turner, J.G., and Devoto, A. (2002). Protein complexes mediate signalling in plant responses to hormones, light, sucrose and pathogens. *Plant Mol. Biol.* 50, 971–980.
- Elzinga, D.A., De Vos, M., and Jander, G. (2014). Suppression of Plant Defenses by a *Myzus persicae* (Green Peach Aphid) Salivary Effector Protein. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 747–756.
- Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H., and Vance, V. (2010). Two Plant Viral Suppressors of Silencing Require the Ethylene-Inducible Host Transcription Factor RAV2 to Block RNA Silencing. *PLOS Pathog.* 6, e1000729.
- Etzler, M.E. (1986). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine* (Elsevier).
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., and Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56, 5–51.
- Febvay, G., Delobel, B., and Rahbé, Y. (1988). Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* 66, 2449–2453.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4, 307–316.

- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* *18*, 265–276.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., et al. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res.* *23*, 1229–1232.
- Fereres, A., and Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research* *141*, 158–168.
- Fineran, P.C., and Charpentier, E. (2012). Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology* *434*, 202–209.
- Forbes, A.R. (1966). Electron Microscope Evidence for Nerves in the Mandibular Stylets of the Green Peach Aphid | *Nature*.
- Forbes, A.R. (1969). The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Can. Entomol.* *101*, 31–41.
- Forbes, A.R. (1977). Chapter 3 - The mouthparts and feeding mechanism of aphids. In *Aphids As Virus Vectors*, K.F. Harris, and K. Maramorosch, eds. (Academic Press), pp. 83–103.
- Foyer, C.H., Verrall, S.R., and Hancock, R.D. (2015). Systematic analysis of phloem-feeding insect-induced transcriptional reprogramming in *Arabidopsis* highlights common features and reveals distinct responses to specialist and generalist insects. *J. Exp. Bot.* *66*, 495–512.
- Francki, R.I.B. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Viruses. *Arch. Virol.* *2*, 450.
- Fu, Q., Li, P., Xu, Y., Zhang, S., Jia, L., Zha, X., Xiang, Z., and He, N. (2011). Proteomic analysis of larval integument, trachea and adult scale from the silkworm, *Bombyx mori*. *PROTEOMICS* *11*, 3761–3767.
- Furch, A.C.U., Zimmermann, M.R., Will, T., Hafke, J.B., and van Bel, A.J.E. (2010). Remote-controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima*. *J. Exp. Bot.* *61*, 3697–3708.
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., and Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 10242–10297.
- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* *31*, 397–405.
- Galán, J.E., and Collmer, A. (1999). Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science* *284*, 1322–1328.
- Gamir, J., Darwiche, R., Hof, P. van't, Choudhary, V., Stumpe, M., Schneiter, R., and Mauch, F. (2017). The sterol-binding activity of Pathogenesis-related protein 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* *89*, 502–509.
- Gao, X., Cox Jr., K.L., and He, P. (2014). Functions of Calcium-Dependent Protein Kinases in Plant Innate Immunity. *Plants* *3*, 160–176.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 711–724.

- Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.-G., Toyota, M., Devireddy, A.R., and Mittler, R. (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* *19*, 623–630.
- Giraud-Guille, M.-M. (1984). Fine structure of the chitin-protein system in the crab cuticle. *Tissue Cell* *16*, 75–92.
- Giraud-Guille, M.-M. (1998). Plywood structures in nature. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* *3*, 221–227.
- Giraud-Guille, M.-M., Chanzy, H., and Vuong, R. (1990). Chitin crystals in arthropod cuticles revealed by diffraction contrast transmission electron microscopy. *J. Struct. Biol.* *103*, 232–240.
- Girousse, C., Moulia, B., Silk, W., and Bonnemain, J.-L. (2005). Aphid Infestation Causes Different Changes in Carbon and Nitrogen Allocation in Alfalfa Stems as Well as Different Inhibitions of Longitudinal and Radial Expansion. *Plant Physiol.* *137*, 1474–1484.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *43*, 205–227.
- Gnanamanickam, S.S., and Patil, S.S. (1977). Accumulation of antibacterial isoflavonoids in hypersensitively responding bean leaf tissues inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. *Physiol. Plant Pathol.* *10*, 159–168.
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. (2006). Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* *60*, 67–80.
- Govier, D.A., Kassanis, B., and Pirone, T.P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* *78*, 306–314.
- Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H., and Robaglia, C. (1993). Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* *74*, 2737–2742.
- Gray, S., and Gildow, F.E. (2003). Luteovirus-Aphid Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* *41*, 539–566.
- Guo, D., Merits, A., and Saarma, M. (1999). Self-association and mapping of interaction domains of helper component-proteinase of potato A potyvirus. *J. Gen. Virol.* *80*, 1127–1131.
- Guo, D., Rajamäki, M.-L., Saarma, M., and Valkonen, J.P.T. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* *82*, 935–939.
- Guo, D., Spetz, C., Saarma, M., and Valkonen, J.P.T. (2003). Two Potato Proteins, Including a Novel RING Finger Protein (HIP1), Interact with the Potyviral Multifunctional Protein HCpro. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *16*, 405–410.
- Guo, H., Song, X., Wang, G., Yang, K., Wang, Y., Niu, L., Chen, X., and Fang, R. (2014). Plant-Generated Artificial Small RNAs Mediated Aphid Resistance. *PLoS ONE* *9*, e97410.
- Guy, E., Boulain, H., Aigu, Y., Le Penneec, C., Chawki, K., Morlière, S., Schädel, K., Kunert, G., Simon, J.-C., and Sugio, A. (2016). Optimization of Agroinfiltration in *Pisum sativum* Provides a New Tool for Studying the Salivary Protein Functions in the Pea Aphid Complex. *Front. Plant Sci.* *7*.

- Hadley, N.F. (1986). The Arthropod Cuticle. *Sci. Am.* 255, 104–113.
- Haikonen, T., Rajamäki, M.-L., Tian, Y.-P., and Valkonen, J.P.T. (2013). Mutation of a Short Variable Region in HCpro Protein of Potato virus A Affects Interactions with a Microtubule-Associated Protein and Induces Necrotic Responses in Tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 721–733.
- Halkier, B.A., and Gershenzon, J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333.
- Hanley, M.E., Lamont, B.B., Fairbanks, M.M., and Rafferty, C.M. (2007). Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 8, 157–178.
- Hansen, A.K., and Moran, N.A. (2011). Aphid genome expression reveals host–symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2849–2854.
- Hardy, N.B., Peterson, D.A., and Dohlen, C.D. von (2015). The evolution of life cycle complexity in aphids: Ecological optimization or historical constraint? *Evolution* 69, 1423–1432.
- Harmel, N., Létocart, E., Cherqui, A., Giordanengo, P., Mazzucchelli, G., Guillonnet, F., De Pauw, E., Haubruge, E., and Francis, F. (2008). Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.* 17, 165–174.
- Harmon, J.P., Moran, N.A., and Ives, A.R. (2009). Species Response to Environmental Change: Impacts of Food Web Interactions and Evolution. *Science* 323, 1347–1350.
- Harris, K.F. (1977). An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission. In *Aphids as Virus Vectors*, (Elsevier), pp. 165–220.
- Harris, K.F., and Maramorosch, K. (1980). *Vectors of Plant Pathogens* (Harris and M. Maramorosch Editors, Academic Press, New York (USA)).
- Hasiów-Jaroszewska, B., Fares, M.A., and Elena, S.F. (2014). Molecular Evolution of Viral Multifunctional Proteins: The Case of Potyvirus HC-Pro. *J. Mol. Evol.* 78, 75–86.
- He, N., Botelho, J.M.C., McNall, R.J., Belozero, V., Augustine Dunn, W., Mize, T., Orlando, R., and Willis, J.H. (2007). Proteomic analysis of cast cuticles from *Anopheles gambiae* by tandem mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 135–146.
- Hebrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T., Uzest, M., Froissart, R., Strub, J.-M., Sanglier, S., Dorsselaer, A. van, Padilla, A., et al. (2001). Biochemical Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus. *J. Virol.* 75, 8538–8546.
- Hewer, A., Becker, A., and Bel, A.J.E. van (2011). An aphid's Odyssey – the cortical quest for the vascular bundle. *J. Exp. Biol.* 214, 3868–3879.
- Hewezi, T., and Baum, T.J. (2012). Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 9–16.
- Hogenhout, S.A., and Bos, J.I. (2011). Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 422–428.
- Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., and Redinbaugh, M.G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359.

- Hoh, F., Uzest, M., Drucker, M., Plisson-Chastang, C., Bron, P., Blanc, S., and Dumas, C. (2010). Structural Insights into the Molecular Mechanisms of Cauliflower Mosaic Virus Transmission by Its Insect Vector. *J. Virol.* *84*, 4706–4713.
- Hohn, T., Fütterer, J., and Hull, R. (1997). The proteins and functions of plant pararetroviruses: knowns and unknowns. *Crit. Rev. Plant Sci.* *16*, 133–161.
- Hooks, C.R.R., and Fereres, A. (2006). Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: A review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Res.* *120*, 1–16.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* *327*, 167–170.
- Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 41–66.
- Huang, J., Si, W., Deng, Q., Li, P., and Yang, S. (2014). Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genet.* *15*, 45.
- Huang, Y., Chen, Y., Zeng, B., Wang, Y., James, A.A., Gurr, G.M., Yang, G., Lin, X., Huang, Y., and You, M. (2016). CRISPR/Cas9 mediated knockout of the abdominal-A homeotic gene in the global pest, diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* *75*, 98–106.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H., and Raccah, B. (1994). Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* *75*, 1407–1414.
- Iconomidou, V.A., Willis, J.H., and Hamodrakas, S.J. (2005). Unique features of the structural model of ‘hard’ cuticle proteins: implications for chitin–protein interactions and cross-linking in cuticle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *35*, 553–560.
- Ioannidou, Z.S., Theodoropoulou, M.C., Papandreou, N.C., Willis, J.H., and Hamodrakas, S.J. (2014). CutProtFam-Pred: Detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile Hidden Markov Models. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *52*, 51–59.
- Ishida, Y., Chiang, V., and Leal, W.S. (2002). Protein that makes sense in the Argentine ant. *Naturwissenschaften* *89*, 505–507.
- Jacobs, S.P., Liggins, A.P., Zhou, J.-J., Pickett, J.A., Jin, X., and Field, L.M. (2005). OS-D-like genes and their expression in aphids (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol. Biol.* *14*, 423–432.
- Jacquín-Joly, E., Vogt, R.G., François, M.-C., and Nagnan-Le Meillour, P. (2001). Functional and Expression Pattern Analysis of Chemosensory Proteins Expressed in Antennae and Pheromonal Gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* *26*, 833–844.
- Jamison, B.V., Thairu, M.W., and Hansen, A.K. (2018). Efficacy of In Vivo Electroporation on the Delivery of Molecular Agents into Aphid (Hemiptera: Aphididae) Ovarioles. *J. Insect Sci.* *18*.
- Jaquiéry, J., Stoeckel, S., Larose, C., Nouhaud, P., Rispe, C., Mieuzet, L., Bonhomme, J., Mahéo, F., Legeai, F., Gauthier, J.-P., et al. (2014). Genetic Control of Contagious Asexuality in the Pea Aphid. *PLoS Genet.* *10*, e1004838.
- Jasrapuria, S., Specht, C.A., Kramer, K.J., Beeman, R.W., and Muthukrishnan, S. (2012). Gene Families of Cuticular Proteins Analogous to Peritrophins (CPAPs) in *Tribolium castaneum* Have Diverse Functions. *PLoS ONE* *7*, e49844.

- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323.
- Kaloshian, I., Kinsey, M.G., Ullman, D.E., and Williamson, V.M. (1997). The impact of Meu1-mediated resistance in tomato on longevity, fecundity and behavior of the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomol. Exp. Appl.* 83, 181–187.
- Kamangar, S.B., Christiaens, O., Taning, C.N.T., De Jonghe, K., and Smagghe, G. (2019). The cuticle protein MPCP2 is involved in Potato virus Y transmission in the green peach aphid *Myzus persicae*. *J. Plant Dis. Prot.* 126, 351–357.
- Kamoun, S. (2006). A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60.
- Kanakala, S., and Ghanim, M. (2016). RNA Interference in Insect Vectors for Plant Viruses. *Viruses* 8, 329.
- Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1995). Requirement for HC-Pro Processing during Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* 209, 268–273.
- Kasschau, K.D., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1997). Genome Amplification and Long-Distance Movement Functions Associated with the Central Domain of Tobacco Etch Potyvirus Helper Component–Proteinase. *Virology* 228, 251–262.
- Kehr, J. (2006). Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* 57, 767–774.
- Kennedy, J.S., Day, M.F., and Eastop, V.F. (1962). A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*.
- Kerchev, P.I., Karpińska, B., Morris, J.A., Hussain, A., Verrall, S.R., Hedley, P.E., Fenton, B., Foyer, C.H., and Hancock, R.D. (2013). Vitamin C and the Abscisic Acid-Insensitive 4 Transcription Factor Are Important Determinants of Aphid Resistance in Arabidopsis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2091–2105.
- Kettles, G.J., and Kaloshian, I. (2016). The Potato Aphid Salivary Effector Me47 Is a Glutathione-S-Transferase Involved in Modifying Plant Responses to Aphid Infestation. *Front. Plant Sci.* 7.
- Kettles, G.J., Drurey, C., Schoonbeek, H., Maule, A.J., and Hogenhout, S.A. (2013). Resistance of Arabidopsis thaliana to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *New Phytol.* 198, 1178–1190.
- Khan, S.A., Reichelt, M., and Heckel, D.G. (2017). Functional analysis of the ABCs of eye color in *Helicoverpa armigera* with CRISPR/Cas9-induced mutations. *Sci. Rep.* 7, 40025.
- Killiny, N., Harper, S.J., Alfaress, S., El Mohtar, C., and Dawson, W.O. (2016). Minor Coat and Heat Shock Proteins Are Involved in the Binding of Citrus Tristeza Virus to the Foregut of Its Aphid Vector, *Toxoptera citricida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6294–6302.
- Kim, J.H., and Jander, G. (2007). *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on Arabidopsis induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant J.* 49, 1008–1019.
- Kim, J.H., Lee, B.W., Schroeder, F.C., and Jander, G. (2008). Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J.* 54, 1015–1026.

- Kim, S.T., Yu, S., Kang, Y.H., Kim, S.G., Kim, J.-Y., Kim, S.-H., and Kang, K.Y. (2007). The rice pathogen-related protein 10 (JIOsPR10) is induced by abiotic and biotic stresses and exhibits ribonuclease activity. *Plant Cell Rep.* 27, 593.
- Klein, P.G., Klein, R.R., Rodriguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. (1994). Mutational Analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus Genome. *Virology* 204, 759–769.
- Knoblauch, M., Peters, W.S., Ehlers, K., and Bel, A.J.E. van (2001). Reversible Calcium-Regulated Stopcocks in Legume Sieve Tubes. *Plant Cell* 13, 1221–1230.
- Knoblauch, M., Noll, G.A., Müller, T., Prüfer, D., Schneider-Hüther, I., Scharner, D., Bel, A.J.E. van, and Peters, W.S. (2003). ATP-independent contractile proteins from plants. *Nat. Mater.* 2, 600–603.
- Kogan, M., and Ortman, E.F. (1978). Antixenosis—A New Term Proposed to Define Painter’s “Nonpreference” Modality of Resistance. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 24, 175–176.
- Koutroumpa, F.A., Monsempes, C., François, M.-C., de Cian, A., Royer, C., Concordet, J.-P., and Jacquin-Joly, E. (2016). Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Sci. Rep.* 6, 29620.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., and Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 2940–2945.
- Kruse, J., Timmins, P., and Witz, J. (1987). The spherically averaged structure of a DNA isometric plant virus: Cauliflower mosaic virus. *Virology* 159, 166–168.
- Kyndt, T., Goverse, A., Haegeman, A., Warmerdam, S., Wanjau, C., Jahani, M., Engler, G., de Almeida Engler, J., and Gheysen, G. (2016). Redirection of auxin flow in *Arabidopsis thaliana* roots after infection by root-knot nematodes. *J. Exp. Bot.* 67, 4559–4570.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251–275.
- Lander, E.S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell* 164, 18–28.
- Le Trionnaire, G.L., Hardie, J., Jaubert-Possamai, S., Simon, J.-C., and Tagu, D. (2008). Shifting from clonal to sexual reproduction in aphids: physiological and developmental aspects. *Biol. Cell* 100, 441–451.
- Leclerc, D., Burri, L., Kajava, A.V., Mougéot, J.-L., Hess, D., Lustig, A., Kleemann, G., and Hohn, T. (1998). The Open Reading Frame III Product of Cauliflower Mosaic Virus Forms a Tetramer through a N-terminal Coiled-coil. *J. Biol. Chem.* 273, 29015–29021.
- Lecourieux, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2006). Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171, 249–269.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M., and Blanc, S. (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO J.* 18, 7077–7085.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Haas, M., Blanc, S., Keller, M., and Yot, P. (2001). Interaction between the Open Reading Frame III Product and the Coat Protein Is Required for Transmission of Cauliflower Mosaic Virus by Aphids. *J. Virol.* 75, 100–106.

- Leonhardt, H. (1940). Beiträge zur Kenntnis der Lachniden, der wichtigsten Tannenhonigtauerzeuger. *Z. Für Angew. Entomol.* 27, 208–272.
- Li, M., Au, L.Y.C., Douglah, D., Chong, A., White, B.J., Ferree, P.M., and Akbari, O.S. (2017a). Generation of heritable germline mutations in the jewel wasp *Nasonia vitripennis* using CRISPR/Cas9. *Sci. Rep.* 7, 1–7.
- Li, X.-Y., Liu, G.-C., Sheng, W.-J., Dong, Z.-W., Chen, L., Zhao, R.-P., and Wang, W. (2017b). Genome editing in the butterfly type-species *Papilio machaon*. *Insect Sci.* 24, 708–711.
- Li, Y., Zhang, J., Chen, D., Yang, P., Jiang, F., Wang, X., and Kang, L. (2016). CRISPR/Cas9 in locusts: Successful establishment of an olfactory deficiency line by targeting the mutagenesis of an odorant receptor co-receptor (Orco). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 79, 27–35.
- Liang, Y., and Gao, X.-W. (2017). The Cuticle Protein Gene MPCP4 of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) Plays a Critical Role in Cucumber Mosaic Virus Acquisition. *J. Econ. Entomol.* 110, 848–853.
- Liang, J., Wang, T., Xiang, Z., and He, N. (2015). Tweedle cuticular protein BmCPT1 is involved in innate immunity by participating in recognition of *Escherichia coli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 58, 76–88.
- Linz, L.B., Liu, S., Chougule, N.P., and Bonning, B.C. (2015). In Vitro Evidence Supports Membrane Alanyl Aminopeptidase N as a Receptor for a Plant Virus in the Pea Aphid Vector. *J. Virol.* 89, 11203–11212.
- Liu, H., Liu, Q., Zhou, X., Huang, Y., and Zhang, Z. (2017). Genome Editing of Wnt-1, a Gene Associated with Segmentation, via CRISPR/Cas9 in the Pine Caterpillar Moth, *Dendrolimus punctatus*. *Front. Physiol.* 7.
- Liu, S., Sivakumar, S., Sparks, W.O., Miller, W.A., and Bonning, B.C. (2010). A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of Pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. *Virology* 401, 107–116.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Locke, M. (2001). The Wigglesworth Lecture: Insects for studying fundamental problems in biology. *J. Insect Physiol.* 4–5, 495–507.
- Louis, J., Basu, S., Varsani, S., Castano-Duque, L., Jiang, V., Williams, W.P., Felton, G.W., and Luthe, D.S. (2015). Ethylene Contributes to maize insect resistance1-Mediated Maize Defense against the Phloem Sap-Sucking Corn Leaf Aphid. *Plant Physiol.* 169, 313–324.
- Lozano-Durán, R., and Robatzek, S. (2015). 14-3-3 Proteins in Plant-Pathogen Interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 511–518.
- Lukasik, P., Asch, M. van, Guo, H., Ferrari, J., and Godfray, H.C.J. (2013). Unrelated facultative endosymbionts protect aphids against a fungal pathogen. *Ecol. Lett.* 16, 214–218.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2010). Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 183–193.
- Ma, W., and Berkowitz, G.A. (2007). The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell. Microbiol.* 9, 2571–2585.

- Ma, R., Reese, J.C., Black, W.C., and Bramel-Cox, P. (1990). Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *J. Insect Physiol.* *36*, 507–512.
- Ma, W., Qi, Z., Smigel, A., Walker, R.K., Verma, R., and Berkowitz, G.A. (2009). Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20995–21000.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L. (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* *112*, 379–389.
- Madhusudhan, V.V., and Miles, P.W. (1998). Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomol. Exp. Appl.* *86*, 25–39.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K., and Cary, J.W. (2017). RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Front. Plant Sci.* *8*.
- Maleszka, R., and Stange, G. (1997). Molecular cloning, by a novel approach, of a cDNA encoding a putative olfactory protein in the labial palps of the moth *Cactoblastis cactorum* GenBank accession No. U95046.1. *Gene* *202*, 39–43.
- Maleszka, J., Forêt, S., Saint, R., and Maleszka, R. (2007). RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for a chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Genes Evol.* *217*, 189–196.
- Markert, M.J., Zhang, Y., Enuameh, M.S., Reppert, S.M., Wolfe, S.A., and Merlin, C. (2016). Genomic Access to Monarch Migration Using TALEN and CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis. *G3 Genes Genomes Genet.* *6*, 905–915.
- Martin, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F., and Fereres, A. (1997). Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.* *78*, 2701–2705.
- Martinière, A., Bak, A., Macia, J.-L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E., Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., et al. (2013). A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *ELife* *2*, e00183.
- Masson, V., Arafah, K., Voisin, S., and Bulet, P. (2018). Comparative Proteomics Studies of Insect Cuticle by Tandem Mass Spectrometry: Application of a Novel Proteomics Approach to the Pea Aphid Cuticular Proteins. *PROTEOMICS* *18*, 1700368.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., and Michelmore, R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.* *7*, 212.
- McLean, A.H.C., and Godfray, H.C.J. (2015). Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *282*, 20150977.
- McLean, D.L., and Kinsey, M.G. (1964). A Technique for Electronically Recording Aphid Feeding and Salivation. *Nature* *202*, 1358–1359.
- McLean, D.L., and Kinsey, M.G. (1967). Probing Behavior of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. I. Definitive Correlation of Electronically Recorded Waveforms with Aphid Probing Activities. *Ann. Entomol. Soc. Am.* *60*, 400–405.

- Medina-Ortega, K.J., and Walker, G.P. (2015). Faba bean forisomes can function in defence against generalist aphids: Forisomes defend *V. faba* against generalist aphids. *Plant Cell Environ.* 38, 1167–1177.
- Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., and Saarma, M. (1999). Biochemical and Genetic Evidence for Interactions between Potato A Potyvirus-Encoded Proteins P1 and P3 and Proteins of the Putative Replication Complex. *Virology* 263, 15–22.
- Merits, A., Rajamäki, M.-L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J.P.T., and Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1211–1221.
- Mesnard, J.M., Mougeot, J.L., Geldreich, A., and Lebeurier, G. (1993). Characterization of different electrophoretic forms of cauliflower mosaic virus virions (strain Cabb-S). *Biochimie* 75, 645–649.
- Mewis, I., Tokuhisa, J.G., Schultz, J.C., Appel, H.M., Ulrichs, C., and Gershenzon, J. (2006). Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry* 67, 2450–2462.
- Micas, A.F.D., Ferreira, G.A., Laure, H.J., Rosa, J.C., and Bitondi, M.M.G. (2016). Proteins of the intergumentary system of the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 93, 3–24.
- Mikona, C., and Jelkmann, W. (2010). Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) by *Cuscuta* Species and Its Transmission to Herbaceous Plants. *Plant Dis.* 94, 471–476.
- Miles, P.W. (1999). Aphid saliva. *Biol. Rev.* 74, 41–85.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., and Mittler, R. (2009). The Plant NADPH Oxidase RBOHD Mediates Rapid Systemic Signaling in Response to Diverse Stimuli. *Sci. Signal.* 2, ra45–ra45.
- Mittler, T.E. (1957). Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmehn) (Homoptera, Aphididae). I. The uptake of phloem sap. *J Exp Biol.*
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., and Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16, 300–309.
- Miura, T., Braendle, C., Shingleton, A., Sisk, G., Kambhampati, S., and Stern, D.L. (2003). A comparison of parthenogenetic and sexual embryogenesis of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphidoidea). *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 295B, 59–81.
- Mizobuchi, N., Hoseki, J., Kubota, H., Toyokuni, S., Nozaki, J., Naitoh, M., Koizumi, A., and Nagata, K. (2007). ARMET is a Soluble ER Protein Induced by the Unfolded Protein Response *via* ERSE-II Element. *Cell Struct. Funct. adypub*, 0705110002–0705110002.
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., and Oost, J. van der (2016). Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 353, aad5147.
- Monaghan, J., and Zipfel, C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.
- Monsion, B. (2008). Thèse : Fluctuations démographiques au cours du cycle de vie du CaMV (Cauliflower mosaic virus).

- Monteforti, G., Angeli, S., Petacchi, R., and Minnocci, A. (2002). Ultrastructural characterization of antennal sensilla and immunocytochemical localization of a chemosensory protein in *Carausius morosus* Brünner (Phasmida: Phasmatidae). *Arthropod Struct. Dev.* 30, 195–205.
- Montesano, M., Brader, G., and Palva, E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* 4, 73–79.
- Montllor, C.B., Maxmen, A., and Purcell, A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* 27, 189–195.
- Moran, P.J., and Thompson, G.A. (2001). Molecular Responses to Aphid Feeding in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiol.* 125, 1074–1085.
- Moran, P.J., Cheng, Y., Cassell, J.L., and Thompson, G.A. (2002). Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51, 182–203.
- Moreno, A., Palacios, I., Blanc, S., and Fereres, A. (2005). Intracellular Salivation Is the Mechanism Involved in the Inoculation of Cauliflower Mosaic Virus by Its Major Vectors *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 763–769.
- Moreno, A., Tjallingii, W.F., Fernandez-Mata, G., and Fereres, A. (2012). Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *J. Gen. Virol.* 93, 662–667.
- Mougeot, J.L., Guidasci, T., Wurch, T., Lebourier, G., and Mesnard, J.M. (1993). Identification of C-terminal amino acid residues of cauliflower mosaic virus open reading frame III protein responsible for its DNA binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1470–1473.
- Mound, L.A. (2012). Thysanoptera (Thrips) of the World—a checklist. Database Access. [Httpanic Ento Csiro Authripschecklist Html](http://pan.ento.csiro.au/thripschecklist.html) Accessed On 6.
- Mugford, S.T., Barclay, E., Drurey, C., Findlay, K.C., and Hogenhout, S.A. (2016). An Immuno-Suppressive Aphid Saliva Protein Is Delivered into the Cytosol of Plant Mesophyll Cells During Feeding. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 29, 854–861.
- Mulot, M., Boissinot, S., Monsion, B., Rastegar, M., Clavijo, G., Halter, D., Bochet, N., Erdinger, M., and Brault, V. (2016). Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*. *Viruses* 8, 316.
- Mulot, M., Monsion, B., Boissinot, S., Rastegar, M., Meyer, S., Bochet, N., and Brault, V. (2018). Transmission of Turnip yellows virus by *Myzus persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein. *Front. Microbiol.* 9, 457.
- Mutti, N.S., Park, Y., Reese, J.C., and Reeck, G.R. (2006). RNAi Knockdown of a Salivary Transcript Leading to Lethality in the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* 6, 1–7.
- Mutti, N.S., Louis, J., Pappan, L.K., Pappan, K., Begum, K., Chen, M.-S., Park, Y., Dittmer, N., Marshall, J., Reese, J.C., et al. (2008). A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9965–9969.
- Naessens, E., Dubreuil, G., Giordanengo, P., Baron, O.L., Minet-Kebdani, N., Keller, H., and Coustau, C. (2015). A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune Responses. *Curr. Biol.* 25, 1898–1903.

- Nagnan-Le Meillour, P., Cain, A.H., Jacquin-Joly, E., François, M.C., Ramachandran, S., Maida, R., and Steinbrecht, R.A. (2000). Chemosensory Proteins from the Proboscis of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 25, 541–553.
- Nakahara, K.S., Masuta, C., Yamada, S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T.S., Meguro, A., Goto, K., Tadamura, K., Sueda, K., et al. (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10113–10118.
- Nakato, H., Toriyama, M., Izumi, S., and Tomino, S. (1990). Structure and expression of mRNA for a pupal cuticle protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 20, 667–678.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.-J., and Dixon, R.A. (2007). Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 17909–17915.
- Nault, L.R. (1997). Arthropod Transmission of Plant Viruses: a New Synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521–541.
- Nel, P., Bertrand, S., and Nel, A. (2018). Diversification of insects since the Devonian: a new approach based on morphological disparity of mouthparts. *Sci. Rep.* 8, 1–10.
- Neville, A.C. (1975). *Biology of the Arthropod Cuticle* (Springer Berlin Heidelberg).
- Ng, J.C., and Zhou, J.S. (2015). Insect vector–plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges. *Curr. Opin. Virol.* 15, 48–55.
- Ngai, M., McDowell, M.A., Ngai, M., and McDowell, M.A. (2017). The search for novel insecticide targets in the post-genomics era, with a specific focus on G-protein coupled receptors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 1–7.
- Nicholson, S.J., Hartson, S.D., and Puterka, G.J. (2012). Proteomic analysis of secreted saliva from Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia* Kurd.) biotypes that differ in virulence to wheat. *J. Proteomics* 75, 2252–2268.
- Nissan, G., Manulis-Sasson, S., Chalupowicz, L., Teper, D., Yeheskel, A., Pasmanik-Chor, M., Sessa, G., and Barash, I. (2012). The Type III Effector HsvG of the Gall-Forming *Pantoea agglomerans* Mediates Expression of the Host Gene HSVGT. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 231–240.
- Noh, M.Y., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., and Arakane, Y. (2015). *Tribolium castaneum* RR-1 Cuticular Protein TcCPR4 Is Required for Formation of Pore Canals in Rigid Cuticle. *PLOS Genet.* 11, e1004963.
- Nombela, G., Williamson, V.M., and Muñoz, M. (2003). The Root-Knot Nematode Resistance Gene Mi-1.2 of Tomato Is Responsible for Resistance Against the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 16, 645–649.
- Nomura, K., Mecey, C., Lee, Y.-N., Imboden, L.A., Chang, J.H., and He, S.Y. (2011). Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 10774–10779.
- Ogawa, K., and Miura, T. (2014). Aphid polyphenisms: trans-generational developmental regulation through viviparity. *Front. Physiol.* 5.
- Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1803–1807.

- Oliver, K.M., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 12795.
- Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R., and Moran, N.A. (2010). Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annu. Rev. Entomol.* *55*, 247–266.
- Painter, R.H. (1951). Insect Resistance in Crop Plants. *Soil Sci.* *72*, 481.
- Pan, P.-L., Ye, Y.-X., Lou, Y.-H., Lu, J.-B., Cheng, C., Shen, Y., Moussian, B., and Zhang, C.-X. (2018). A comprehensive omics analysis and functional survey of cuticular proteins in the brown planthopper. *6*.
- Park, K.C., and Hardie, J. (2003). Electroantennogram responses of aphid nymphs to plant volatiles. *Physiol. Entomol.* *28*, 215–220.
- Pegadaraju, V., Louis, J., Singh, V., Reese, J.C., Bautor, J., Feys, B.J., Cook, G., Parker, J.E., and Shah, J. (2007). Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by Arabidopsis PHYTOALEXIN DEFICIENT4 without its signaling partner enhanced disease susceptibility. *Plant J.* *52*, 332–341.
- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., and Raccach, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* *79*, 897–904.
- Perry, M., Kinoshita, M., Saldi, G., Huo, L., Arikawa, K., and Desplan, C. (2016). Molecular logic behind the three-way stochastic choices that expand butterfly colour vision. *Nature* *535*, 280–284.
- Pesson, P. (Paul) (1944). Contribution à l'étude morphologique et fonctionnelle de la tête, de l'appareil buccal et du tube digestif des femelles de coccides.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 489–521.
- Pirone, T.P., and Blanc, S. (1996). Helper-Dependent Vector Transmission of Plant Viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* *34*, 227–247.
- Pitino, M., and Hogenhout, S.A. (2013). Aphid Protein Effectors Promote Aphid Colonization in a Plant Species-Specific Manner. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *26*, 130–139.
- Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Gall, O.L., Thomas, D., and Bron, P. (2003). Structural Characterization of HC-Pro, a Plant Virus Multifunctional Protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 23753–23761.
- Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S., and Bron, P. (2005). Structure of the Mature P3-virus Particle Complex of Cauliflower Mosaic Virus Revealed by Cryo-electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* *346*, 267–277.
- Polin, S., Gallic, J.-F.L., Simon, J.-C., Tsuchida, T., and Outreman, Y. (2015). Conditional Reduction of Predation Risk Associated with a Facultative Symbiont in an Insect. *PLOS ONE* *10*, e0143728.
- Ponsen, M.B. (1972). The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, *Myzus persicae* : an anatomical study. Veenman.
- Powell, G., Tosh, C.R., and Hardie, J. (2006). Host plant selection by aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* *51*, 309–330.

- Raabe, D., Romano, P., Sachs, C., Al-Sawalmih, A., Brokmeier, H.-G., Yi, S.-B., Servos, G., and Hartwig, H.G. (2005). Discovery of a honeycomb structure in the twisted plywood patterns of fibrous biological nanocomposite tissue. *J. Cryst. Growth* 283, 1–7.
- Rao, S.A.K., Carolan, J.C., and Wilkinson, T.L. (2013). Proteomic Profiling of Cereal Aphid Saliva Reveals Both Ubiquitous and Adaptive Secreted Proteins. *PLoS ONE* 8, e57413.
- Read, S.M., and Northcote, D.H. (1983a). Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae. *Planta* 158, 119–127.
- Read, S.M., and Northcote, D.H. (1983b). Subunit Structure and Interactions of the Phloem Proteins of *Cucurbita maxima* (Pumpkin). *Eur. J. Biochem.* 134, 561–569.
- Rebers, J.E., and Riddiford, L.M. (1988). Structure and expression of a *Manduca sexta* larval cuticle gene homologous to *Drosophila* cuticle genes. *J. Mol. Biol.* 203, 411–423.
- Rebers, J.E., and Willis, J.H. (2001). A conserved domain in arthropod cuticular proteins binds chitin1We dedicate this paper to Svend O. Andersen in appreciation of the enormous impact his data, analyses, and insights have had on students of arthropod cuticular proteins. 1. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1083–1093.
- Ren, G., Wang, X., Chen, D., Wang, X., and Liu, X. (2014). Effects of aphids *Myzus persicae* on the changes of Ca²⁺ and H₂O₂ flux and enzyme activities in tobacco. *J. Plant Interact.* 9, 883–888.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manificier, S., and Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide Sequence of Potato Virus Y (N Strain) Genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70, 935–947.
- Rodriguez, P.A., Stam, R., Warbroek, T., and Bos, J.I.B. (2014). Mp10 and Mp42 from the Aphid Species *Myzus persicae* Trigger Plant Defenses in *Nicotiana benthamiana* Through Different Activities. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 30–39.
- Rodriguez, P.A., Escudero-Martinez, C., and Bos, J.I.B. (2017). An Aphid Effector Targets Trafficking Protein VPS52 in a Host-Specific Manner to Promote Virulence. *Plant Physiol.* 173, 1892–1903.
- Roelofs, D., Janssens, T.K.S., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., Mariën, J., Bochdanovits, Z., Ylstra, B., and Straalen, N.M.V. (2009). Adaptive differences in gene expression associated with heavy metal tolerance in the soil arthropod *Orchesella cincta*. *Mol. Ecol.* 18, 3227–3239.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., and Lucas, W.J. (1997). Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology* 237, 283–295.
- Rossi, M., Goggin, F.L., Milligan, S.B., Kaloshian, I., Ullman, D.E., and Williamson, V.M. (1998). The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9750.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., and López-Moya, J.J. (2005). Structural Analysis of Tobacco Etch Potyvirus HC-Pro Oligomers Involved in Aphid Transmission. *J. Virol.* 79, 3758–3765.
- Russell, A.R., Ashfield, T., and Innes, R.W. (2015). *Pseudomonas syringae* Effector AvrPphB Suppresses AvrB-Induced Activation of RPM1 but Not AvrRpm1-Induced Activation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 727–735.

- Sabri, A., Vandermoten, S., Leroy, P.D., Haubruge, E., Hance, T., Thonart, P., De Pauw, E., and Francis, F. (2013). Proteomic Investigation of Aphid Honeydew Reveals an Unexpected Diversity of Proteins. *PLoS ONE* 8, e74656.
- Sapountzis, P., Duport, G., Balmand, S., Gaget, K., Jaubert-Possamai, S., Febvay, G., Charles, H., Rahbé, Y., Colella, S., and Calevro, F. (2014). New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 20–32.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J., and Godfray, H.C.J. (2005). Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science* 310, 1781–1781.
- Schoelz, J., Shepherd, R.J., and Daubert, S. (1986). Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2632–2637.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.-M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M.H.V., and Pattus, F. (2004). Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* 325, 399–412.
- Seo, J.-K., Kang, S.-H., Seo, B.Y., Jung, J.K., and Kim, K.-H. (2010). Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol. Plant Pathol.* 11, 265–276.
- Shigenobu, S., and Wilson, A.C.C. (2011). Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1297–1309.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature* 407, 81–86.
- Shukla, D.D., Ward, C.W., and Brunt, A.A. (1994). The Potyviridae. *The Potyviridae*.
- Simon, J.-C., Stoeckel, S., and Tagu, D. (2010). Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *C. R. Biol.* 333, 488–496.
- Skipp, R.A., and Bailey, J.A. (1976). The effect of phaseollin on the growth of *Colletotrichum lindemuthianum* in bioassays designed to measure fungitoxicity. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 253–263.
- Slykhuis, J.T. (1965). Mite Transmission of Plant Viruses. In *Advances in Virus Research*, K.M. Smith, and M.A. Lauffer, eds. (Academic Press), pp. 97–137.
- Sorin, M. (1966). Physiological and morphological studies on the suction mechanism of plant juice by aphids. *Bull Univ Osaka Pref Ser B* 18, 95–135.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., and Hohn, T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 6219–6224.
- Stork, N.E. (2018). How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annu. Rev. Entomol.* 63, 31–45.
- Sugio, A., Dubreuil, G., Giron, D., and Simon, J.-C. (2015). Plant–insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *J. Exp. Bot.* 66, 467–478.
- Sun, D., Guo, Z., Liu, Y., and Zhang, Y. (2017). Progress and Prospects of CRISPR/Cas Systems in Insects and Other Arthropods. *Front. Physiol.* 8.

- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 691–699.
- Sylvester, E.S. (1954). Insectary Life History and Apterous Instar Morphology of *Myzus Persicae* (Sulzer) (Homoptera, Aphidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* *47*, 397–406.
- Symmes, E.J., and Perring, T.M. (2007). Intraspecific Variation in Zucchini Yellow Mosaic Virus Transmission by *Myzus persicae* and the Impact of Aphid Host Plant. *J. Econ. Entomol.* *100*, 1764–1772.
- Tang, L., Liang, J., Zhan, Z., Xiang, Z., and He, N. (2010). Identification of the chitin-binding proteins from the larval proteins of silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *40*, 228–234.
- Taning, C.N.T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., and Smagghe, G. (2017). CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *J. Insect Physiol.* *98*, 245–257.
- Taylor, C.E., and Brown, D.J.F. (1997). *Nematode vectors of plant viruses* (New York: CAB International).
- Taylor, C.E., and Robertson, W.M. (1974). Electron Microscopy Evidence for the Association of Tobacco Severe Etch Virus with the Maxillae in *Myzus persicae* (Sulz.). *J. Phytopathol.* *80*, 257–266.
- Thairu, M.W., Skidmore, I.H., Bansal, R., Nováková, E., Hansen, T.E., Li-Byarlay, H., Wickline, S.A., and Hansen, A.K. (2017). Efficacy of RNA interference knockdown using aerosolized short interfering RNAs bound to nanoparticles in three diverse aphid species. *Insect Mol. Biol.* *26*, 356–368.
- Thomas, S., Vanlerberghe-Masutti, F., Mistral, P., Loiseau, A., and Boissot, N. (2016). Insight into the durability of plant resistance to aphids from a demo-genetic study of *Aphis gossypii* in melon crops. *Evol. Appl.* *9*, 756–768.
- Thornbury, D.W., Hellmann, G.M., Rhoads, R.E., and Pirone, T.P. (1985). Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology* *144*, 260–267.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H.A. (2002). The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet.* *36*, 489–519.
- Tjallingii, W.F. (1978). Electronic Recording of Penetration Behaviour by Aphids. *Entomol. Exp. Appl.* *24*, 721–730.
- Tjallingii, W.F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*, (Amsterdam: Elsevier Science Publishers), pp. 95–108.
- Tjallingii, W.F. (2006). Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J. Exp. Bot.* *57*, 739–745.
- Togawa, T., Nakato, H., and Izumi, S. (2004). Analysis of the chitin recognition mechanism of cuticle proteins from the soft cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *34*, 1059–1067.
- Tomlinson, J.A. (1987). Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* *110*, 661–681.
- Tör, M., Lotze, M.T., and Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* *60*, 3645–3654.

- Torruella, M., Gordon, K., and Hohn, T. (1989). Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J.* *8*, 2819–2825.
- Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Hockenfull, R., Jackson, R.W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M.A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J.D., et al. (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* *19*, 3204–3214.
- Tsuchida, T., Koga, R., and Fukatsu, T. (2004). Host Plant Specialization Governed by Facultative Symbiont. *Science* *303*, 1989–1989.
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., Simon, J.-C., and Fukatsu, T. (2010). Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science* *330*, 1102–1104.
- Ullman, D.E., Cho, J.J., Mau, R.F.L., Hunter, W.B., Westcot, D.M., and Custer, D.M. (1992). Thrips-Tomato Spotted Wilt Virus Interactions: Morphological, Behavioral and Cellular Components Influencing Thrips Transmission. In *Advances in Disease Vector Research*, K.F. Harris, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 195–240.
- Urbanska, A., Tjallingii, W.F., Dixon, A.F.G., and Leszczynski, B. (1998). Phenol oxidising enzymes in the grain aphid's saliva. *Entomol. Exp. Appl.* *86*, 197–203.
- Urcuqui-Inchima, S., Maia, I.G., Drugeon, G., Haenni, A.-L., and Bernardi, F. (1999). Effect of mutations within the Cys-rich region of potyvirus helper component-proteinase on self-interaction. *J. Gen. Virol.* *80*, 2809–2812.
- Uzest, M., and Blanc, S. (2016). Molecular mechanisms involved in noncirculative virus–vector interactions. *Vector-Mediat. Transm. Plant Pathog.*
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hebrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., and Blanc, S. (2007). A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 17959–17964.
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazevieuille, C., Cot, D., and Blanc, S. (2010). The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct. Dev.* *39*, 221–229.
- Uzest, M., Drucker, M., and Blanc, S. (2011). La transmission d'un complexe : pas si simple. Cas du virus de la mosaïque du chou-fleur. *Virologie* *15*, 192–204.
- Van Kan, J.A., Van den Ackerveken, G., and De Wit, P. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol Plant-Microbe Interact* *4*, 52–59.
- Van Hoof, H.A. (1958). *Onderzoekingen over de biologische overdracht van een non-persistent virus.* Van Putten & Oortmeijer.
- Van Loon, L.C., and Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. ‘Samsun’ and ‘Samsun NN’: II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* *40*, 199–211.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135–162.
- Vandermoten, S., Harmel, N., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Haubruge, E., and Francis, F. (2014). Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species: Salivary proteomes from three aphid species. *Insect Mol. Biol.* *23*, 67–77.

- Vannini, L., Reed, T.W., and Willis, J.H. (2014). Temporal and spatial expression of cuticular proteins of *Anopheles gambiae* implicated in insecticide resistance or differentiation of M/S incipient species. *Parasit. Vectors* 7, 24.
- Verma, V., Ravindran, P., and Kumar, P.P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol.* 16, 86.
- Verret, F., Wheeler, G., Taylor, A.R., Farnham, G., and Brownlee, C. (2010). Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling. *New Phytol.* 187, 23–43.
- Villada, E.S., González, E.G., López-Sesé, A.I., Castiel, A.F., and Gómez-Guillamón, M.L. (2009). Hypersensitive response to *Aphis gossypii* Glover in melon genotypes carrying the Vat gene. *J. Exp. Bot.* 60, 3269–3277.
- Vincent, J.F.V. (2002). Arthropod cuticle: a natural composite shell system. *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.* 33, 1311–1315.
- Vincent, J.F.V., and Wegst, U.G.K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Struct. Dev.* 33, 187–199.
- Vincent, T.R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S.T., Pitino, M., Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A.J., et al. (2017). Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *Plant Cell* 29, 1460–1479.
- Vontas, J., David, J.-P., Nikou, D., Hemingway, J., Christophides, G.K., Louis, C., and Ranson, H. (2007). Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol. Biol.* 16, 315–324.
- Wang, R.Y., and Pirone, T.P. (1996). Potyvirus transmission is not increased by pre-acquisition fasting of aphids reared on artificial diet. *J. Gen. Virol.* 77, 3145–3148.
- Wang, D., Liu, Q., Li, X., Sun, Y., Wang, H., and Xia, L. (2015a). Double-stranded RNA in the biological control of grain aphid (*Sitobion avenae* F.). *Funct. Integr. Genomics* 15, 211–223.
- Wang, H., La Russa, M., and Qi, L.S. (2016a). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 227–264.
- Wang, J., Zhang, H., Wang, H., Zhao, S., Zuo, Y., Yang, Y., and Wu, Y. (2016b). Functional validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 76, 11–17.
- Wang, W., Dai, H., Zhang, Y., Chandrasekar, R., Luo, L., Hiromasa, Y., Sheng, C., Peng, G., Chen, S., Tomich, J.M., et al. (2015b). Armet is an effector protein mediating aphid–plant interactions. *FASEB J.* 29, 2032–2045.
- Wang, W., Luo, L., Lu, H., Chen, S., Kang, L., and Cui, F. (2015c). Angiotensin-converting enzymes modulate aphid–plant interactions. *Sci. Rep.* 5, 8885.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., and Sharma, H.C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal. Behav.* 7, 1306–1320.
- Watson, and Roberts (1939). A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B - Biol. Sci.* 127, 543–576.

- Wawra, S., Belmonte, R., Löbach, L., Saraiva, M., Willems, A., and van West, P. (2012). Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 685–691.
- Webster, C.G., Thillier, M., Pirolles, E., Cayrol, B., Blanc, S., and Uzest, M. (2017). Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions: Composition of proteins in the acrostyle. *Insect Sci.* *24*, 990–1002.
- Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., Deshoux, M., Gargani, D., Calevro, F., Jimenez, J., Moreno, A., Krenz, B., et al. (2018). Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *J. Virol.* *92*, 15.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., and Wang, A. (2010). Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLOS Pathog.* *6*, e1000962.
- Wernegreen, J.J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 850–861.
- Westra, E.R., Dowling, A.J., Broniewski, J.M., and van Houte, S. (2016). Evolution and Ecology of CRISPR. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *47*, 307–331.
- Whitehead, L.F., and Douglas, A.E. (1993). A metabolic study of *Buchnera*, the intracellular bacterial symbionts of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Microbiology*, *139*, 821–826.
- Whitfield, A.E., Falk, B.W., and Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* *479–480*, 278–289.
- Will, T., and van Bel, A.J.E. (2006). Physical and chemical interactions between aphids and plants. *J. Exp. Bot.* *57*, 729–737.
- Will, T., and Vilcinskas, A. (2015). The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *57*, 34–40.
- Will, T., Kornemann, S.R., Furch, A.C.U., Tjallingii, W.F., and Bel, A.J.E. van (2009). Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *J. Exp. Biol.* *212*, 3305–3312.
- Will, T., Steckbauer, K., Hardt, M., and van Bel, A.J.E. (2012). Aphid Gel Saliva: Sheath Structure, Protein Composition and Secretory Dependence on Stylet-Tip Milieu. *PLOS ONE* *7*, e46903.
- Will, T., Schmidtberg, H., Skaljic, M., and Vilcinskas, A. (2017). Heat shock protein 83 plays pleiotropic roles in embryogenesis, longevity, and fecundity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Dev. Genes Evol.* *227*, 1–9.
- Willis, J.H. (2010). Structural cuticular proteins from arthropods: Annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *16*.
- Wilson, A.C.C., and Duncan, R.P. (2015). Signatures of host/symbiont genome coevolution in insect nutritional endosymbioses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 10255–10261.
- Wilson, A.C.C., Ashton, P.D., Calevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., Jander, G., Kushlan, P.F., Macdonald, S.J., Schwartz, J.F., et al. (2010). Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect Mol. Biol.* *19*, 249–258.

- Xiao, D., Lu, Y.-H., Shang, Q.-L., Song, D.-L., and Gao, X.-W. (2015). Gene silencing of two acetylcholinesterases reveals their cholinergic and non-cholinergic functions in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Pest Manag. Sci.* *71*, 523–530.
- Xu, J., Chen, S., Zeng, B., James, A.A., Tan, A., and Huang, Y. (2017). *Bombyx mori* P-element Somatic Inhibitor (BmPSI) Is a Key Auxiliary Factor for Silkworm Male Sex Determination. *PLOS Genet.* *13*, e1006576.
- Yang, X., Thannhauser, T.W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E., and Gray, S.M. (2008). Coupling Genetics and Proteomics To Identify Aphid Proteins Associated with Vector-Specific Transmission of Polerovirus (Luteoviridae). *J. Virol.* *82*, 291–299.
- Zhang, L., and Reed, R.D. (2016). Genome editing in butterflies reveals that *spalt* promotes and *Distal-less* represses eyespot colour patterns. *Nat. Commun.* *7*, 11769.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* *6*, 520–527.
- Zhang, S., and Xu, J.-R. (2014). Effectors and Effector Delivery in *Magnaporthe oryzae*. *PLOS Pathog.* *10*, e1003826.
- Zhang, J., Goyer, C., and Pelletier, Y. (2008). Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol. Biol.* *17*, 209–216.
- Zhang, Z., Liu, X., Shiotsuki, T., Wang, Z., Xu, X., Huang, Y., Li, M., Li, K., and Tan, A. (2017). Depletion of juvenile hormone esterase extends larval growth in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *81*, 72–79.
- Zheng, H., Yan, F., Lu, Y., Sun, L., Lin, L., Cai, L., Hou, M., and Chen, J. (2011). Mapping the self-interacting domains of TuMV HC-Pro and the subcellular localization of the protein. *Virus Genes* *42*, 110–116.
- Zhou, Y., Badgett, M.J., Bowen, J.H., Vannini, L., Orlando, R., and Willis, J.H. (2016). Distribution of cuticular proteins in different structures of adult *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *75*, 45–57.
- Zhou, Y., Badgett, M.J., Billard, L., Bowen, J.H., Orlando, R., and Willis, J.H. (2017). Properties of the cuticular proteins of *Anopheles gambiae* as revealed by serial extraction of adults. *PLOS ONE* *12*, e0175423.
- Zhu, G.-H., Xu, J., Cui, Z., Dong, X.-T., Ye, Z.-F., Niu, D.-J., Huang, Y.-P., and Dong, S.-L. (2016). Functional characterization of SlitPBP3 in *Spodoptera litura* by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *75*, 1–9.
- Zhu-Salzman, K., Salzman, R.A., Ahn, J.-E., and Koiwa, H. (2004). Transcriptional Regulation of Sorghum Defense Determinants against a Phloem-Feeding Aphid. *Plant Physiol.* *134*, 420–431.
- Zimmer, C.T., Garrood, W.T., Puinean, A.M., Eckel-Zimmer, M., Williamson, M.S., Davies, T.G.E., and Bass, C. (2016). A CRISPR/Cas9 mediated point mutation in the alpha 6 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor confers resistance to spinosad in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *73*, 62–69.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., and Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene* *447*, 29–39.

Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P., and Baraldi, E. (2009). The RNA Hydrolysis and the Cytokinin Binding Activities of PR-10 Proteins Are Differently Performed by Two Isoforms of the Pru p 1 Peach Major Allergen and Are Possibly Functionally Related. *Plant Physiol.* *150*, 1235–1247.

Sites internet

<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons>

<https://www.dkfz.de/signaling/e-rnai3>

Liste des présentations orales, posters et publications

Communication orales

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Caractérisation du rôle de l'acrostyle - organe des stylets de puceron qui porte les récepteurs de virus de plante - dans les interactions plante/insecte, *Printemps de Baillarguet, Montpellier, Mai 2017*

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Caractérisation du rôle de l'acrostyle - organe des stylets de puceron qui porte les récepteurs de virus de plante - dans les interactions plante/insecte, *Journées des doctorants du département SPE, Montpellier, Juin 2017*

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Characterization of the role of the acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets, in plant aphid interactions, *European PhD Network in Insect Sciences, Naples (Italie), Novembre 2017*

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Characterization of the role of the acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets, in plant aphid interactions, *Journées du réseau BAPOA, Colmar, Novembre 2017*

M. Deshoux, Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions, *Séminaire à l'unité BGPI, Montpellier, Décembre 2017*

M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C. Webster, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, J. Jimenez, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc & M. Uzest, An effector from aphid saliva interacts with the acrostyle, an organ at the tip of insect stylets, *Effectomes meeting, Lauret, Novembre 2018*

M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C. Webster, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, J. Jimenez, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc, M. Uzest, An effector from aphid saliva interacts with the acrostyle, an organ at the tip of insect stylets, *Journées du réseau BAPOA, Rennes, Novembre 2018*

M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C. Webster, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, S. Blanc & M. Uzest, Role of Stylins, cuticular proteins of the acrostyle, in noncirculative virus transmission and plant-aphid interactions, *Rencontres de virologie végétale (RVV), Aussois, Janvier 2019*

M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C. Webster, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, J. Jimenez, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc, M. Uzest, The acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets, interacts with an effector from aphid saliva, *UK-France Joint Meeting on aphids, Rothamsted (Angleterre), Mai 2019*

M. Deshoux, The acrostyle, a multi-faceted organ at the tip of aphid stylets, *Séminaire à l'unité BGPI, Montpellier, Juin 2019*

Posters

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions, *European PhD Network in Insect Sciences, Nice, Octobre 2016*

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions, *Rencontres de virologie végétale (RVV)*, Aussois, Janvier 2017

M. Deshoux, S. Blanc & M. Uzest, Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions, *3rd Hemipteran-Plant Interactions Symposium*, Madrid (Espagne), Juin 2017

G. Le Trionnaire, B. Cayrol, M. Deshoux, F. Gleonnec, A. Herpin, S. Hudaverdian, T. Kosuth, B. Monsion, E. Pichon, D. Tagu, S. Tanguy, G. Richard, C. G. Webster & M. Uzest, CRISPR-Cas9 in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* to generate Stylin-01 knockout mutants and study the role of Stylin-01 in *Cauliflower mosaic virus* transmission, *Rencontres de virologie végétale (RVV)*, Aussois, Janvier 2019

Publications

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

Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., **Deshoux, M.**, Gargani, D., Calevro, F., Jimenez, J., Moreno, A., Krenz, B., et al. (2018). Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *J Virol* 92, e00432-18, /jvi/92/14/e00432-18.atom.

Le Trionnaire, G., Tanguy, S., Hudaverdian, S., Gleonnec, F., Richard, G., Cayrol, B., Monsion, B., Pichon, E., **Deshoux, M.**, Webster, C., et al. (2019). An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 110, 34–44.

Deshoux, M., Masson, V., Voisin, S.N., Arafah, K., Guschinskya, N., van Munster, M., Cayrol, B., Webster, C.G., Rahbé, Y., Blanc, S., Bulet, P., Uzest, M. Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the tip of maxillary stylets, **En préparation**

Deshoux M., Monsion B., Pichon E., Jimenez J., Moreno A., Cayrol B., Thébaud G., Mugford S.T., Hogenhout S.A., Blanc S., Fereres A., Uzest M. Cuticular proteins of aphid stylets take part in effector-plant defense dialogue. **En préparation**

Hors thèse

Bernardo, P., Muhire, B., François, S., **Deshoux, M.**, Hartnady, P., Farkas, K., Kraberger, S., Filloux, D., Fernandez, E., Galzi, S., et al. (2016). Molecular characterization and prevalence of two capulaviruses: Alfalfa leaf curl virus from France and Euphorbia caput-medusae latent virus from South Africa. *Virology* 493, 142–153.

Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., **Deshoux, M.**, Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., et al. (2015). Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. *J. Virol.* 89, 9683–9688.

Characterization of the role of the acrostyle, an organ located at the tip of aphid stylets, in virus transmission and plant-insect interactions

Abstract

In temperate countries, aphids colonize at least 25% of plant species, including almost all important crops. Aphids are major agricultural pests due to their high phenotypic and development plasticity, and their formidable ability to transmit countless plant viruses. The acrostyle is an organ at the tip of maxillary stylets known to harbor the receptors of *Cauliflower mosaic virus* (*Caulimovirus*), and likely those of other non-circulative viruses. It is located at the confluence of the salivary and food canals and is therefore in contact with cell content, plant sap, and aphid saliva. The acrostyle seems to be conserved in aphid species and could play a key role in plant-aphid interactions through specific plant or aphid saliva based protein interactions.

To characterize the functions of the acrostyle, we first defined its proteomic composition. We identified five proteins named Stylins - among the repertoire of cuticular proteins of the acrostyle - with peptides exposed at the surface of the organ. Several approaches were then developed to find stylins' partners and set up functional validation through RNAi and CRISPR-Cas9 technologies. We found that Stylin-01 was involved in *Cauliflower mosaic virus* transmission, and could be the first receptor of plant viruses to be identified in aphid stylets. Preliminary results indicate that another stylin would rather be involved in the transmission of the *Turnip mosaic virus* (*Potyvirus*). In addition, we showed that Stylin-03 interacts with Mp10, an effector of aphid saliva, which modulates plant defenses. We further showed that this effector was able to bind the acrostyle of dissected stylets. Moreover, the aphid feeding behavior was impacted when *stylin-01* or *stylin-03* were silenced.

Taken together, these results demonstrate that the acrostyle is a multifaceted organ with various binding properties.

Key words: aphid, stylets, acrostyle, cuticular proteins, effector, virus

Caractérisation du rôle de l'acrostyle, un organe localisé à la pointe des stylets de puceron, dans la transmission des virus et dans les interactions plante-insecte

Résumé

Dans les régions tempérées, on estime qu'une espèce végétale sur quatre, dont la quasi-totalité des plantes d'intérêt agronomique, est attaquée par les pucerons. Ces insectes sont des ravageurs redoutables, notamment à cause de leur développement rapide, de leur grande plasticité phénotypique et de leur capacité à transmettre un nombre impressionnant de phytovirus. L'acrostyle est connu pour porter les récepteurs du *Cauliflower mosaic virus (Caulimovirus)*, et probablement ceux d'autres virus qui sont spécifiquement retenus sur la cuticule des pièces buccales des pucerons. Il s'agit d'un organe localisé à la pointe des stylets maxillaires, à la confluence des canaux alimentaire et salivaire qui est donc au contact direct du contenu des cellules végétales, de la sève phloémienne, et de la salive de l'insecte. Il semble conservé parmi les espèces de puceron, et pourrait, via des interactions avec des composés de la plante ou des composés salivaires, jouer un rôle clé dans les interactions plante-puceron.

Afin de caractériser les fonctions de cet organe, nous avons tout d'abord établi le répertoire des protéines cuticulaires de l'acrostyle grâce à une approche protéomique. Nous avons pu identifier cinq protéines, renommées Stylines, qui possèdent des peptides accessibles en surface de l'organe. Nous avons alors recherché les partenaires des stylines *in vitro* ou en système hétérologue, et mis en place deux approches de validation fonctionnelle : la diminution transitoire de l'expression des gènes par l'ARN interférence, et l'obtention de lignées mutantes via la technologie CRISPR-Cas9. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que Stylin-01 était impliquée dans la transmission du *Cauliflower mosaic virus*. Elle serait donc le premier récepteur de virus à avoir été identifié dans les stylets de pucerons. Des résultats préliminaires indiquent qu'une autre styline serait, quant à elle, impliquée dans la transmission du *Turnip mosaic virus (Potyvirus)*. De plus, nous avons montré que Stylin-03 interagissait avec un effecteur salivaire, Mp10, impliqué dans le contournement des défenses de la plante, et que Mp10 s'accrochait directement sur l'acrostyle *in vitro*. Enfin, nous avons démontré que diminuer l'expression des gènes *stylin-01* et *stylin-03* perturbait le comportement alimentaire des pucerons.

Mes travaux de thèse démontrent que l'acrostyle est un organe multifacette capable d'interagir avec des molécules variées telles que des protéines virales ou des effecteurs salivaires.

Mots clefs : puceron, stylets, acrostyle, protéines cuticulaires, effecteur, virus