

UNIVERSITE DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE

INRA Colmar – UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin

THÈSE

Présentée par **Michaël Mulot**

Le 30 janvier 2018 en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la virologie

Analyse fonctionnelle du récepteur de
l'éphrine de *Myzus persicae* et mise en
évidence de son rôle dans la transmission du
virus de la jaunisse du navet

THÈSE dirigée par :
Dr Véronique BRAULT

Directrice de Recherche, INRA Colmar

RAPPORTEURS :
Dr Michel PETERSCHMITT
Dr Xavier FOISSAC

Chargé de Recherche, CIRAD Montpellier
Directeur de Recherche, INRA Bordeaux

AUTRE MEMBRE DU JURY:
Dr Maria DIMITROVA

Maître de Conférences, IBMP Strasbourg

i. Résumé / summary

Les polérovirus appartiennent à la famille des *Luteoviridae*. Les virus de cette famille infectent une large gamme de plantes à forte importance économique. La dissémination de ces virus repose sur un insecte vecteur, le puceron, qui transmet ces virus selon le mode circulant et non-multipliant. Les virus sont acquis par le puceron lorsque celui-ci se nourrit de la sève d'une plante infectée. Les particules virales circulent dans le tube digestif et traversent l'épithélium de l'intestin moyen et/ou de l'intestin postérieur pour être libérées dans l'hémocoel de l'insecte. Les particules virales atteignent ensuite les cellules des glandes salivaires accessoires, qu'elles franchissent pour se retrouver dans la salive de l'insecte, à partir de laquelle elles sont inoculées à une nouvelle plante. Le franchissement des barrières épithéliales de l'insecte par les virions se fait par un mécanisme de transcytose qui nécessite une interaction entre les virions et des récepteurs spécifiques encore largement inconnus. Des travaux précédents ont permis d'identifier deux protéines de puceron, Eph et ALY, capables d'interagir avec les protéines structurales des polérovirus dans la levure. L'objectif de mes travaux de thèse a été de mettre au point des méthodes d'inhibition de l'expression des gènes de puceron par la technique d'ARN interférence afin de valider la fonction de ces protéines de puceron dans la transmission des polérovirus.

Les efficacités de plusieurs méthodes d'acquisition orale de dsRNA/siRNA ont été comparées afin d'inhiber l'expression des deux gènes candidats, mais seule l'inhibition de l'expression du gène *Eph* a pu être obtenue après acquisition des dsRNA à partir de plantes transgéniques ou de dsRNA synthétisés *in vitro* ciblant *Eph*. Notamment, l'acquisition orale pendant 5 jours de dsRNA synthétisés *in vitro* et ciblant le gène *Eph* a permis de réduire de manière reproductible la transmission du *Turnip yellows virus* (polérovirus modèle) par les pucerons ayant acquis le virus à partir de virus purifié ou de plantes infectées. Cette plus faible capacité à transmettre le virus est corrélée à une internalisation plus faible du virus dans le corps du puceron. L'ensemble des résultats obtenus suggère un rôle de Eph dans l'internalisation des polérovirus dans le corps du puceron.

Mots clés : polérovirus, puceron, transmission, récepteur, ARN interférence

Poleroviruses belong to the *Luteoviridae* family. These viruses infect a wide range of economically important plants and are transmitted by aphids in a circulative and non-propagative mode. Poleroviruses are acquired by aphids when ingesting the sap from an infected plant. The virus particles circulate in the digestive tract and cross the epithelium at the midgut and / or posterior midgut level before being released into the hemocoel of the insect. The viral particles are then transported through the accessory salivary gland cells and released with the insect saliva into a new plant. Virus transport through the two cellular barriers in the insect follows a transcytosis mechanism that relies on the interaction between the viral structural proteins and virus specific receptors largely unknown. A previous study in our laboratory identified two aphid proteins, Eph and ALY, interacting with the viral structural proteins of the poleroviruses and therefore potentially involved in the transmission process. The objective of my PhD was to develop different methods to inhibit expression of these two genes in aphids by the RNA interference mechanism in order to evaluate their function in polerovirus transmission.

The efficiencies of expression inhibition of several orally-delivered dsRNA/siRNA methods were compared, but only the inhibition of *Eph* expression could be obtained by feeding aphids on transgenic plants synthesizing dsRNA or on *in vitro*-synthesized dsRNA targeting *Eph*. The oral acquisition for 5 days of dsRNA synthesized *in vitro* and targeting *Eph* reproducibly reduces the transmission of *Turnip yellows virus* (polerovirus) by the aphids after virus acquisition from a purified virus suspension or from infected plants. This low ability to transmit the virus is correlated with a lower internalization of the virus in the aphid's body. These results suggest an important role of Eph in the internalization of poleroviruses in the aphid's body.

Keys words : polerovirus, aphid, transmission, receptor, RNA interference

« ...Do not go gentle into that good night.
Rage, rage against the dying of the light. »

Dylan Thomas, *Do not go gentle into that good night*, 1951

Remerciements

Je remercie tout d'abord l'ensemble des personnes qui travaillent au centre INRA de Colmar, avec qui j'ai eu la chance de passer trois années quelque peu laborieuses, mais avant tout merveilleuses. La recherche est un miracle humain qui ne peut émerger que par l'effort de tous, et aucun des acteurs, qu'il soit contribuable, standardiste ou chargé de recherche, n'est dispensable. Il sera donc impossible de nommer les nombreuses personnes que je dois remercier, mais je peux tout de même en nommer quelques-uns et quelques-unes: ma chère Sabine, qui m'a ouvert la porte environ dix mille fois en trois ans, mes camarades David, Cédric, Antoine, Florent, Gauthier et Jean-Michel, avec qui on aura quand même bien rigolé, surtout face à l'adversité! Je remercie mes voisins du « bureau des doctorants et post-doctorants » qui ont supporté (mais surtout apprécié, elles doivent bien l'avouer) ma joie de vivre et mon humour parfois débordant, j'ai nommé Isabelle, Thuy-thanh, Lise et Lorène.

J'adresse un grand merci à tout les membres permanents de l'équipe Virologie et Vecton : Olivier, Etienne, Cathy, Les Gérard, Aurélie, Manu, Samia, la grande Monique, la petite Monique, Sophie la brune, Sophie la blonde, Mireille, Carine et Claude. C'est en écrivant les noms de mes collègues que je me rends compte qu'ils sont tous associés à des souvenirs chaleureux. Je pense qu'il existe peu de lieux de travail proposant un climat si agréable, et c'est en partie à ces personnes que je dois d'avoir passé trois bonnes années.

J'aimerais remercier une personne que je n'ai pas revue depuis le début de mon doctorat mais que je n'oublie pas, mon ami et maître Nicolas Matt Palpatine, qui m'a tout simplement donné envie de continuer mes études en doctorat, et a été un enseignant exceptionnel.

Je remercie bien sûr ma famille, qui est peu nombreuse mais compte infiniment. Mes deux parents et mon frère : Je vous aime. Je remercie ma femme Chahinez, qui a eu le courage et la patience de vivre sa première année de mariage avec un doctorant, ce qui n'est évidemment pas chose facile. Merci pour votre soutien indéfectible, votre patience et votre confiance.

Je remercie particulièrement Sylvaine Boissinot qui n'a pas seulement été présente pour moi, mais a été un véritable pilier sur lequel je ne me suis que trop souvent appuyé. Tu es une super chercheuse Sylvaine. Merci pour tes conseils, et merci de m'avoir donné tant de ton temps, dans les bons et dans les mauvais moments.

Des mauvais moments, il y en a eu. Je pense à notre Nicole, qui a malheureusement dû nous quitter. Si tu lis ces mots, Nicole, sache qu'on pense tous à toi et que tu nous manques.

J'ai eu des moments de doute, qu'ils soient personnels ou scientifiques. J'ai fait des erreurs, et j'ai parfois pris de bonnes décisions. Cependant je sais que la meilleure décision de mon doctorat aura été la toute première, celle de choisir Véronique Brault comme directrice de thèse. La rigueur, l'organisation, la curiosité scientifique, l'enthousiasme, et, par dessus tout, l'humanité dont fait preuve Véronique m'ont poussé à lui vouer une admiration et un respect absolu. Merci Véronique, du fond du cœur. Sans toi je n'aurais rien pu faire.

Je remercie par avance les membres du Jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer ce travail, et je remercie Stéphane Blanc, Véronique Ziegler-Graff, Fabrice Legeais et Jérôme Mutterer pour le temps et les conseils dispensés durant les comités de suivi de thèse.

Enfin, je remercie Frédérique Pelsy, qui m'a accueilli dans l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin et a pris soin de prendre régulièrement des nouvelles du travail et du moral.

Il est temps de parler de pucerons et de virus,

Bonne lecture,

MM

ii. Table des matières

Introduction bibliographique.....	12
I. Introduction générale.....	13
1) Les arbovirus.....	16
2) Les arthropodes vecteurs d'arbovirus.....	16
3) Les modes de transmission des arbovirus.....	21
a. La transmission circulante non multipliante des virus de plante.....	21
b. La transmission circulante multipliante des virus de plante.....	22
c. La transmission non circulante des virus de plante.....	23
d. La transmission biologique des virus des vertébrés.....	23
e. La transmission mécanique des virus des vertébrés.....	24
II. Arbovirus de plantes transmis selon le mode circulant non multipliant : les vecteurs et les déterminants viraux.....	24
1) Généralités.....	24
2) La transmission des <i>Luteoviridae</i>	26
3) Les <i>Geminiviridae</i>	32
4) Les <i>Nanoviridae</i>	34
III. Existe-t-il des arbovirus circulants et non multipliants chez les vertébrés ?.....	36
IV. Les arbovirus de plantes circulants multipliants, les vecteurs et les déterminants de leur transmission.....	37
1) Généralités.....	37
2) La transmission des <i>Phytoreovirus</i>	37
3) La transmission des <i>Tospovirus</i>	39
4) La transmission des <i>Rhabdoviridae</i>	39
V. Analogies avec les arbovirus vertébrés transmis de manière biologique.....	41
VI. Les arbovirus de plantes non circulants, les vecteurs et déterminants de la transmission.....	47
1) Généralités.....	47
2) Illustration de la stratégie de transmission « capside » des virus non circulants : cas du <i>Cucumber mosaic virus</i>	49
3) Illustration de la transmission par la stratégie « facteur assistant » des virus non persistants : cas des <i>Potyvirus</i> et des <i>Caulimovirus</i>	51
4) L'activation de la transmission du CaMV.....	54
5) Identification et caractérisation des sites de rétention des virus non circulants au niveau des insectes vecteurs.....	55
VII. Analogie avec la transmission mécanique des arbovirus vertébrés.....	57
VIII. Notre modèle principal d'étude au laboratoire : le <i>Turnip yellows virus</i> et son vecteur <i>Myzus persicae</i>.....	58
1) Stratégies d'expression des protéines du TuYV et rôles des protéines dans le cycle viral.....	62
a. La protéine P0 (suppresseur de silencing).....	62
b. La protéine P1 (protéase et VPg).....	62
c. La protéine P1-P2 (ARN polymérase ARN dépendante).....	62

d. Les protéines P3 et P3-P5 (CP et RT)	62
e. P4 (protéine de mouvement)	64
f. P3a (protéine de mouvement à longue distance).....	65
g. P6 et P7 (protéines putatives)	65
h. Rap1 (Replication-associated protein 1)	65
IX. Les objectifs de la thèse	66
Chapitre 1 : Méthodes de validation fonctionnelle des gènes de puceron : état de l'art et étude comparative de plusieurs méthodes basées sur l'ARN interférence chez le puceron <i>Myzus persicae</i>	68
I. L'ARN interférence : une révolution dans le domaine de la biologie	69
II. Les voies de l'ARN interférence	70
III. RNAi chez les insectes.....	71
IV. Utilisation du RNAi pour la validation fonctionnelle chez le puceron	77
V. Inhibition de l'expression des gènes <i>Eph</i> et <i>ALY</i> chez <i>Myzus persicae</i> via le mécanisme d'ARN interférence : une étude comparative de différentes méthodes.....	82
VI. Publication n°1 : Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in <i>Myzus persicae</i>	84
VII. Conclusion sur l'étude comparative des méthodes de RNAi pour l'inhibition des gènes <i>Eph</i> et <i>ALY</i> chez <i>M. persicae</i>	85
VIII. Développements afin d'augmenter l'efficacité des technologies permettant d'inhiber l'expression d'un gène chez le puceron	86
IX. Développement de nouvelles techniques pour la validation fonctionnelle chez le puceron.....	88
Chapitre 2 : Analyse de l'implication des gènes <i>Eph</i> et <i>ALY</i> dans la transmission virale des polérovirus à l'aide de méthodes basées sur l'ARN interférence	91
I. La protéine ALY.....	92
II. Les récepteurs de l'éphrine.....	92
III. Activation non conventionnelle des récepteurs de l'éphrine	96
IV. Analyse par RNAi du rôle de la protéine Eph dans la transmission virale	97
1) Publication n°2 : Transmission of <i>Turnip yellows virus</i> by <i>Myzus persicae</i> is reduced by feeding aphids on double-stranded RNA targeting the ephrin receptor protein	97
2) Expériences complémentaires.....	98
V. Validation fonctionnelle de la protéine ALY.....	101
VI. Conclusion.....	102
VII. Discussion générale	102
1) Originalité du travail	102
2) Les récepteurs de l'éphrine, une nouvelle classe de récepteurs viraux.....	103
3) Les récepteurs de l'éphrine et l'endocytose médiée par les cavéolines	105
4) Eph : un co-récepteur du TuYV.....	106
5) Une nouvelle cible moléculaire pour la lutte antivirale.....	107
VIII. Matériel et méthodes :	109
1) Élevage des pucerons.....	109
2) Plantes utilisées pour les agroinfiltrations et les tests de transmission	109

3) Vérification de l'insertion des transgènes dans les plantes transgéniques de génération T3.....	109
4) Inoculation de plantes par les virus via les agrobactéries	109
5) Détection de siRNA par Northern Blot.....	110
6) Purification de petits ARN pour l'acquisition par les pucerons	110
7) ARN double brin synthétisé <i>in vitro</i>	111
8) Acquisition de dsRNA / siRNA par <i>M. persicae</i>	111
9) Extraction d'ARN à partir de pucerons entiers ou d'intestins disséqués.....	113
10) Analyses par qRT-PCR	113
11) Tests de transmission de virus par <i>M. persicae</i>	114
12) Tests de fécondité des pucerons et tests de comportement alimentaire.....	114
13) Synthèse de la sonde ribonucléique pour les expériences d'hybridation <i>in situ</i>	115
14) Préparation de bactéries thermo-compétentes et transformation des bactéries	115
15) Transformation de bactéries thermo-compétentes.....	116
16) Détection du virus par DAS-ELISA	116
17) Extraction de plasmides à partir de bactéries.....	116
18) Extraction d'ARN viraux à partir de virions purifiés	116
IX. Bibliographie	117

iii. Liste des abréviations

AGO : protéine argonaute	HG : <i>Hindgut</i> , intestin postérieur
ASG : <i>accessory salivary glands</i> , glandes salivaires accessoires	I : induit
APN : alanyl aminopeptidase N	IBMP : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
ATP : adénosine triphosphate	INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
ATP-D : ATP déshydrogénase	IRES : <i>internal ribosome entry site</i> , site d'entrée interne au ribosome
BSA : albumine de sérum bovin	ISV : <i>insect specific virus</i> , virus spécifiques des insectes
C-ter : extrémité C-terminale	L27 : <i>ribosomal protein L27</i>
Cav-1 : <i>caveolin 1</i>	LB : lamelle basale
Cb : cibarium	LC-MS-MS : Chromatographie liquide couplée à deux analyses par spectrométrie de masse
CC : <i>common canal</i> , canal commun	Ma : Mandibulaire
CCR5 : <i>C-C chemokine receptor type 5</i>	MAPK : MAP kinases
CD81 : <i>Cluster of differentiation 81</i>	MBP : <i>Maltose binding protein</i>
CLDN1 : <i>Claudin-1</i>	MBP : membrane plasmique basale
Co-A : coenzyme A	MET : Microscopie électronique à transmission
co-IP : co-immunoprécipitation	MG : <i>Midgut</i> , intestin moyen
Col-0 : <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0	MID : Middle
Complexe RNP : complexe ribonucléoprotéique	Milieu LB : Milieu Luria Bertani
C-ter : extrémité C terminale	Milieu MS : Milieu de Murashige et Skoog
CP : Protéine de Capside	miRNA : micro-RNA
CRISPR-Cas9 : <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9</i>	MP : Protéine de mouvement
CS : canal salivaire	MPA : membrane plasmique apicale
Cys : Cystéine	MPB2C : Movement protein binding 2C
DA : domaine d'activation	mRNA : ARN messager
DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	MT : <i>Malpighi tubules</i> , tubes de Malpighi
DCL : <i>dicer like</i>	MT : Microtubule
Dcr : Dicer	Mx : Maxillaire
DD : diverticules dorso-latéraux	N-ter : extrémité N-terminale
DE : dendrites	NGS : nouvelles techniques de séquençage
DF : domaine de fixation	NI : non induit
DMSO : diméthyl sulfoxyde	NSC : cellules souches neurales
DNA : acide désoxyribonucléique	ORF : <i>open reading frame</i> , cadre de lecture ouvert
DNAc : ADN complémentaire	PABP : <i>Poly A binding protein</i>
dNTP : désoxyribonucléotide	PAZ : PIWI/Argonaute/Zwille
DO : densité optique	Pb : Paires de bases
Domaine R : domaine riche en proline	PBS : Phosphate buffered saline
Domaine S : domaine Shell	PCR : <i>Polymerase chain reaction</i>
DRT : domaine de <i>readthrough</i>	PEG : Polyéthylène glycol
dsRBP : protéines de liaison aux ARN double brin	piRNA : ARN interagissant avec Piwi
dsRNA : <i>double stranded RNA</i> , ARN double brin	PM : Poids moléculaire
DTT : Dithiothréitol	Pns : protéines non structurales
EC : écart-type	Pr : proboscis
EDTA : acide éthylène-diamine-tétraacétique	Pre-miRNA : micro-ARN précurseur
EFNA1 : EPHRIN A1	preCb : précibarium
EGFR : epidermal growth factor receptor	Pri-miRNA : micro-ARN primaire
Eph : récepteur de l'éphrine	PSD95 : <i>post synaptic density protein</i>
Es : <i>esophagus</i> , oesophage	PSG : <i>principal salivary glands</i> , glandes salivaires principales
F.A. : fourreaux allaires	PTGS : <i>Post transcriptional gene silencing</i>
FC : <i>food canal</i> , canal alimentaire	qRT-PCR : <i>quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction</i>
FG : <i>foregut</i> , intestin moyen antérieur	RACK1 : <i>Receptor for activated Kinase C</i>
FISH : <i>fluorescence in situ hybridization</i>	Rap1 : <i>Replication-associated protein 1</i>
FN : fibronectine	RC : réceptosomes
FNIII : domaine fibronectine de type 3	RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
GAPDH3 : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 3	RE : Rectum
GFP : <i>green fluorescent protein</i>	RISC : <i>RNA induced silencing complex</i> , complexe de silencing induit par l'ARN
GPI : glycosylphosphatidylinositol	RNA : Acide ribonucléique
GST : glutathion sépharose transférase	RNAi : <i>RNA interference</i> , interférence par ARN
GTP : Guanosine triphosphate	RNaseA : Ribonucléase A
GW : Gawky	RNaseIII : RibonucléaseIII
HC : <i>helper component</i> , facteur assistant	

ROS : *Reactive oxygen species*
RPL7 : *ribosomal protein L7*
RT : protéine de *Readthrough*
RT-PCR : *reverse transcription – polymerase chain reaction*
RT* : forme clivée de la protéine de *Readthrough*
SAM : motif stérile α
SaM50 : *S. avenae* protein binding MAV
SC : *salivary canal*, canal salivaire
SD/-AHWL : Milieu Synthétique dextrose, dépourvu en adénine, histidine, tryptophane et leucine
SD/-HWL : Milieu Synthétique dextrose, dépourvu en histidine, tryptophane et leucine
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et en présence de SDS
sgRNA: ARN subgénomique
hpRNA: *hairpin RNA*, ARN en structure tige-boucle
SID-1 : *systemic RNA interference deficient-1*

siRNA : *short interfering RNA*, petit ARN interfèrent
SPE : santé des plantes et environnement
TALEN : *transcription activator-like effector nuclease*, nucléases effectrices de type activateur de la transcription
TBE : Tris Borate EDTA
TOR : *Target of rapamycin*
VC : vésicules à clathrine
vDNA : *virus-derived complementary DNA*, copies d'ADN complémentaires dérivées des dsRNA viraux
VIGS : *virus induced gene silencing*
VPg : *viral protein linked genome*
vRdRp : ARN polymérase virale ARN dépendante
VSR : *viral suppressor of RNA silencing*
vsRNA : siRNA viraux secondaires
VT : vésicules tubulaires
YDH : *yeast double hybrid*
ZFN : *zinc finger nuclease*, nucléases en doigt de zinc
zo-1 : *zonula occludens-1*

Liste des abréviations des virus

AbMV : *Abutilon mosaic virus*, Virus de la mosaïque de l'abutilon
ACMV : *African cassava mosaic virus*, Virus de la mosaïque africaine du manioc
BBTV : *Banana bunchy top virus*, Virus du sommet touffu du bananier
BCTV : *Beet curly top virus*, Virus de l'enroulement apical de la betterave
BWYV : *Beet western yellows virus*, Virus de la jaunisse modérée de la betterave
BYDV : *Barley yellow dwarf virus*, Virus de la jaunisse nanisante de l'orge
CABYV : *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, Virus de la jaunisse des cucurbitacées
CaMV : *Cauliflower mosaic virus*, Virus de la mosaïque du chou-fleur
CMV : *Cucumber mosaic virus*, Virus de la mosaïque du concombre
CYDV : *Cereal yellow dwarf virus*, Virus de la jaunisse nanisante des céréales
FBNYV : *Faba bean necrotic yellows virus*, Virus de la jaunisse nécrotique de la fève
HCV : *Hepatitis C virus*, Virus de l'hépatite C
HIV : *Human immunodeficiency virus*, Virus de l'immunodéficience humaine
HSV-1 : *Herpes simplex virus type 1*, Virus de l'herpès de type 1
JcDNV : *Junonia coenia densovirus*, densovirus du *Junonia coenia*
KSHV : *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*, Herpesvirus associé au sarcome de Kaposi
LIYV : *Lettuce infectious yellows virus*, Virus de la jaunisse infectieuse

de la laitue
LSDV : *Lumpy skin disease virus*, Virus de la dermatose nodulaire contagieuse
M-MLV : *Moloney murine leukemia virus*, Virus de la leucémie murine de Moloney
MpDNV : *Myzus persicae densovirus*, Densovirus de *Myzus persicae*
PEMV : *Pea enation mosaic virus*, Virus de la mosaïque énation du pois
PLRV : *Potato leafroll virus*, Virus de l'enroulement de la pomme de terre
PVY : *Potato virus Y*, Virus de la pomme de terre Y
RDV : *Rice dwarf virus*, Virus du nanisme du riz
RRV : *Rhesus monkey rhadinovirus*, Rhadinovirus du singe Rhésus
SiGMV : *Sida golden mosaic virus*
SRBSDV : *Southern rice black-streaked dwarf virus*
THOV : *Thogoto virus*, Virus de Thogoto
TRV : *Tobacco rattle virus*, Virus du bruissement du tabac
TSWV : *Tomato spotted wilt virus*, Virus de la maladie bronzée de la tomate
TuYV : *Turnip yellows virus*, Virus de la jaunisse du navet, anciennement BWYV
TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*, Virus des feuilles jaunes en cuillère de la tomate
WmCSV : *Watermelon chlorotic stunt virus*, Virus du rabougrissement chlorotique de la pastèque

Liste des abréviations des unités

g : Gramme
h : Heure
kb : kilo-bases
kDa : Kilo Dalton
L : Litre
M : Molaire
mg : Milligramme

min : Minute
mL : Millilitre
mM : Millimolaire
Rpm : Rotation par minute
s : Seconde
 μ L : Microlitre

iv. Liste des Tables

Table 1 : Les virus circulants et non multipliants : famille, genre, insectes vecteurs, site d'entrée dans les cellules du vecteur, protéines virales et protéines du vecteur impliquées ou suspectées être impliquées dans la transmission

Table 2 : Les virus circulants multipliants : famille, genre, insectes vecteurs, site d'entrée, protéines virales et protéines du vecteur impliquées dans la transmission

Table 3 : Récepteurs potentiels du DENV chez le moustique

Table 4 : Récepteurs potentiels du DENV chez l'homme

Table 5 : Voies d'entrée du DENV dans les cellules humaines ou de moustique

Table 6 : Paramètres de la transmission des virus dits non persistants et semi-persistants

Table 7 : Les virus non circulants: stratégie de transmission, famille, genre, insectes vecteurs, site d'accrochage, protéines virales impliquées dans la transmission

Table 8 : Liste rassemblant les expériences de RNAi chez le puceron

Table 9 : Effet de l'acquisition d'anticorps @Eph sur la transmission du TuYV

Table 10 : Tests de transmission du TuYV après traitement des pucerons par acquisition de dsRNA *ALY* ou de dsRNA *LacZ* pendant 3 ou 5 jours

v. Liste des figures

- Figure 1 :** Bas-relief datant de 2000 ans avant J-C représentant un prêtre égyptien atteint de poliomyélite et dont la jambe droite est atrophiée
- Figure 2 :** Représentation schématique des pièces buccales des hémiptères
- Figure 3 :** Comparaison schématique du tube digestif des pucerons et des cicadelles
- Figure 4 :** Représentation schématique du proboscis du moustique
- Figure 5 :** Représentation du tractus digestif des *Culicidae*
- Figure 6 :** Schéma de la transmission circulante
- Figure 7 :** Représentation schématique d'un virus non circulant fixé à l'extrémité des stylets d'un puceron
- Figure 8 :** Schéma du mécanisme de transcytose des *Luteoviridae*
- Figure 9 :** Fréquence relative des segments du génome du FBNSV dans des pucerons *A. pisum* virulifères et dans des plantes sources
- Figure 10 :** Modèle proposé pour le transport du RGDV au travers les cellules des glandes salivaires dans le vecteur *R. dorsalis*
- Figure 11 :** La structure du DENV et les récepteurs putatifs pour l'entrée du virus
- Figure 12 :** La stratégie capsidale et la stratégie facteur assistant des virus non circulants
- Figure 13 :** Structure du complexe transmissible du CaMV
- Figure 14 :** L'activation de la transmission du CaMV
- Figure 15 :** L'acrostyle, site de fixation du CaMV
- Figure 16 :** Exemples de symptômes liés à l'infection du TuYV
- Figure 17 :** Les différents stades larvaires du puceron *Myzus persicae*
- Figure 18 :** Observation au microscope électronique de particules virales purifiées du TuYV
- Figure 19 :** Organisation génomique des polérovirus et stratégies d'expression
- Figure 20 :** Représentation en 3D de la CP et des trimères de CP composant la capsidale du TuYV et représentation schématique des protéines CP, RT et RT*
- Figure 21 :** Représentation schématique de la capsidale des polérovirus
- Figure 22 :** Évolution du nombre d'articles scientifiques publiés annuellement entre 1998 et 2009 dans le Science Citation Index et dont le sujet principal est l'ARN interférence
- Figure 23 :** Schéma des voies des siRNA et des miRNA
- Figure 24 :** Rôle des RdRp et des protéines SID dans l'amplification et la diffusion du signal de RNAi
- Figure 25 :** Réponse antivirale adaptative systémique basée sur le RNAi chez *D. melanogaster*
- Figure 26 :** Représentation schématique des 5 méthodes utilisées pour inhiber l'expression des gènes *Eph* et *ALY*, toutes basées sur l'absorption orale de dsRNA et de siRNA par les insectes
- Figure 27 :** Expression des gènes *Eph* et *ALY* dans les différents stades de *M. persicae* (corps entier) élevés sur piment
- Figure 28 :** Représentation schématique des interactions électrostatiques liant les polymères de chitosane et l'ARN double brin
- Figure 29 :** Expression relative (qRT-PCR) du gène *Eph* dans des larves L1 produites après 1 jour par des adultes ayant acquis les dsRNA *Eph* ou les dsRNA contrôle LacZ durant 5 jours
- Figure 30 :** Représentation schématique des récepteurs de l'éphrine (*EphA* et *EphB*) et de leurs ligands (éphrine-A et éphrine-B)
- Figure 31 :** Régulation de la neurogenèse chez les humains adultes par les cellules endothéliales vasculaires dans la zone subventriculaire du cerveau
- Figure 32 :** Expression du Domaine Extracellulaire (ED) de la protéine *Eph* en bactérie par Western-Blot

Introduction bibliographique

I. Introduction générale

Tout comme il est délicat de décrire ce qu'est la vie, il est encore à l'heure actuelle difficile de donner une définition claire de ce que sont les virus. N'étant pas capables de se multiplier de façon autonome, mais étant tout de même composés des molécules fondamentales du monde vivant, les virus semblent, par leur nature, se situer quelque part entre les mondes du vivant et de l'inerte. Une définition simple et admise d'un virus est celle d'un parasite intracellulaire de petite taille ne pouvant pas se reproduire par lui-même. Sa présence dans une cellule hôte est donc obligatoire afin de détourner la machinerie cellulaire pour se multiplier. Cependant cette définition peut trouver des exceptions, en témoigne la découverte de virus de grande taille visibles au microscope optique, pouvant atteindre des tailles supérieures à celles des microbes (Claverie et al., 2006). L'existence des virus est de toute évidence ancienne, et les virus se sont adaptés au point d'avoir parasité tous les types cellulaires existants, devenant les agents pathogènes les plus abondants sur terre. En plus d'infecter les humains, les animaux, les plantes, les champignons et les bactéries, plusieurs virus ont été identifiés depuis 2008 comme capables d'infecter d'autres virus de grande taille (La Scola et al., 2008). Les virus et leurs hôtes ont ainsi co-évolué et tissé des liens biologiques complexes que la virologie, la science de l'étude des virus, s'efforce de comprendre. La virologie est une science jeune, née du besoin de l'homme de trouver des moyens de se protéger des maladies virales. En effet, l'homme est depuis toujours menacé par diverses maladies d'origine virale comme la variole, la rage, l'herpès, la poliomyélite ou encore le SIDA. En témoigne une stèle antique qui représente un prêtre atteint de poliomyélite et dont la jambe droite est atrophiée (**Fig. 1**).

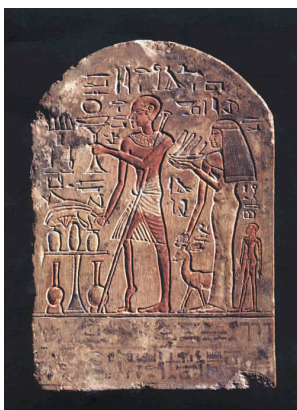


Figure 1 : Bas-relief datant de 2000 ans avant J-C représentant un prêtre égyptien atteint de poliomyélite et dont la jambe droite est atrophiée. Stèle retrouvée à Memphis en Égypte, auteur inconnu.

Les premières avancées dans la prévention des maladies virales n'ont eu lieu qu'au 18^{ème} siècle. La variole était alors la maladie la plus meurtrière de la planète, causant environ 400 000 morts par an en Europe. L'origine de ces épidémies était inconnue. En effet, la théorie microbienne n'avait pas encore été formulée, et la théorie épidémiologique la plus répandue à cette époque était celle des miasmes, un « mauvais air » capable, à son contact, de rendre les personnes malades. Suite à ces épidémies de variole, le médecin anglais Edward Jenner établit un lien inattendu entre la variole et une autre maladie bénigne touchant uniquement le bétail bovin, la vaccine. Il démontra en 1796 que l'inoculation de l'homme avec des lésions de vaccine permettait de prévenir l'apparition de la variole. Ce n'est qu'au 20^{ème} siècle que l'on comprit que cette protection était due au fait que le virus de la vaccine et celui de la variole sont des proches parents qui appartiennent à la famille des *Poxviridae*. Par cette première expérience d'immunisation, E. Jenner marquait les débuts de la virologie. Lorsque Louis Pasteur mit au point le premier médicament préventif contre la rage en 1885, il lui donna le nom de vaccin en l'honneur des travaux de E. Jenner. E. Jenner et L. Pasteur apportèrent ainsi les premiers éléments scientifiques qui aboutirent 100 ans plus tard à un effort de vaccination mondiale conduisant à l'éradication totale de la variole sur terre. Depuis les découvertes de E. Jenner, les progrès scientifiques n'ont cessé et la virologie a été au centre des sciences agricoles et médicales. En effet, les conséquences néfastes des virus ne se limitent pas à la santé humaine. Le secteur agricole est lui aussi victime de nombreuses épidémies touchant les élevages animaliers et les cultures végétales, plaçant ainsi les virus au centre des préoccupations économiques et de santé de notre société. Il existe plus de 2000 espèces de virus et celles affectant les plantes incluent des virus d'au moins 21 familles différentes et de 8 genres non assignés. Beaucoup de ces phytovirus provoquent d'importants dégâts sur des cultures d'intérêt agro-alimentaire, pharmaceutique ou encore cosmétique (Hull, 2013). En outre, de nombreux virus végétaux sont associés à des plantes non cultivées et nombre de ces virus végétaux sont découverts chaque jour, notamment grâce aux nouvelles techniques de séquençage (NGS). Les maladies virales représentent ainsi 47% des nouvelles maladies émergentes affectant les plantes (Anderson et al., 2004).

De nombreuses découvertes dans le domaine de la biologie sont inhérentes à l'étude des virus. On citera comme exemples (i) la compréhension des mécanismes d'épissage des ARN messagers (mRNA) à partir de l'étude des adénovirus par Richard John Roberts et Phillip A. Sharp (Berget et al., 1977; Gelinis and Roberts, 1977) ou encore (ii), la découverte des complexes d'histocompatibilité par Peter Doherty et Rolf Zinkernagel (Zinkernagel and Doherty, 1974). Les virus, et leurs constituants, sont devenus eux mêmes de fabuleux outils pour les études moléculaires. La transcriptase inverse des rétrovirus pour la synthèse d'ADN complémentaire (cDNA), ou les vecteurs viraux pour l'expression de gènes, en sont

quelques exemples (on notera la mise en abîme scientifique, qui est que les virologues utilisent ces outils dérivés de virus pour étudier la biologie des virus). Cependant, malgré tous les efforts portés sur l'étude des virus, les maladies déclenchées par ces pathogènes représentent toujours une menace pour notre société et la recherche en virologie n'a jamais été aussi active.

Un des objectifs majeurs dans le domaine de la virologie est la compréhension des mécanismes de transmission des virus, une étape clé dans la dissémination du virus dans une population. Plusieurs équipes de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) s'intéressent aux mécanismes de la transmission des virus de plantes par des vecteurs dont l'équipe de Stéphane Blanc (Interaction Virus Insecte Plante, INRA Montpellier) et l'équipe Virologie-Vection de l'INRA de Colmar, où j'ai effectué ma thèse. Cette équipe étudie, entre autre, la transmission des polérovirus par puceron. Les polérovirus sont des virus de plante appartenant à la famille des *Luteoviridae*. Ce sont des virus de symétrie icosédrique dont la particule renferme une molécule d'ARN simple brin de polarité positive. Les virus de cette famille infectent une large gamme de plantes de forte importance économique telles que les céréales, les pommes de terre, les betteraves à sucre, le colza et certaines plantes maraîchères. La particularité de ces virus réside, d'une part, dans leur localisation limitée dans la plante aux tissus du phloème et, d'autre part, dans leur mode de dissémination qui passe obligatoirement par un insecte, en l'occurrence le puceron. Les espèces de plantes présentant une bonne résistance à ces virus sont extrêmement rares et la lutte contre les polérovirus passe par l'emploi d'insecticides afin d'éliminer ou de réduire les populations de vecteurs. Ces insecticides sont généralement reconnus comme néfastes pour l'environnement et pour la santé humaine. Pour ces raisons, le Gouvernement français a décidé, suite au Grenelle de l'environnement de 2008, de réduire de 50% l'usage des pesticides à l'horizon 2025, diminuant encore ainsi le peu de moyens disponibles pour lutter contre les virus au champ. Le but des recherches développées dans l'équipe Virologie-Vection sur ce pathosystème modèle consiste à accroître nos connaissances scientifiques sur les interactions qui s'établissent entre les 3 partenaires participant à la transmission des polérovirus à savoir, le virus, le puceron et la plante. Les travaux visent à identifier de nouvelles cibles permettant de lutter contre ces virus par des approches plus respectueuses de l'environnement et de la santé humaine. Le but de ma thèse a été d'analyser le rôle des protéines de puceron potentiellement impliquées dans la transmission et pouvant assurer la fonction de récepteurs des polérovirus. Dans ce manuscrit, je décrirai en deux étapes les résultats de mon travail. La première partie concernera les travaux ayant permis de mettre au point les outils de validation fonctionnelle de gènes chez le puceron *Myzus persicae* en se basant sur le mécanisme d'ARN interférence (RNAi). La deuxième partie concernera la validation

fonctionnelle des gènes candidats identifiés préalablement à mon arrivée au laboratoire et plus particulièrement celle du candidat majeur sur lequel mon travail s'est focalisé qui est le récepteur de l'éphrine (*Eph*). Ces deux parties seront précédées par une introduction bibliographique traitant des mécanismes moléculaires de la transmission par insecte des virus de plantes et de vertébrés. Cette introduction se terminera par une description des objectifs de la thèse.

1) Les arbovirus

Les arthropodes sont infectés par de nombreux virus. Certains, spécifiques aux insectes, sont appelés *Insect Specific Virus* (ISV) et ne sont pas transmis à d'autres hôtes, tandis que d'autres sont transmis aux animaux et aux plantes et sont appelés arbovirus (Anderson et al., 2004). Le nom d'arbovirus provient de la contraction de l'expression anglaise *arthropod-borne viruses*. Il est dérivé du jargon de laboratoire utilisé au début des années 1940 parmi les chercheurs en Californie (Reeves, 2001) et définit un virus animal qui est transmis aux hôtes vertébrés par des vecteurs arthropodes hématophages, une définition qui a par la suite été officialisée par l'Organisation Mondiale pour la Santé (1985). Cette définition propre aux virus animaux transmis par insecte tend aujourd'hui à évoluer, car le terme arbovirus est de plus en plus utilisé pour les virus de plantes transmis par insectes vecteurs (Blanc and Gutierrez, 2015). On parle donc maintenant d'arbovirus de plantes et d'arbovirus de vertébrés. Le terme arbovirus ne rentre pas dans la classification taxinomique des virus, c'est-à-dire que des virus appartenant à différentes familles peuvent être des arbovirus.

2) Les arthropodes vecteurs d'arbovirus

Les arthropodes vecteurs de virus de plantes sont principalement des hémiptères et appartiennent à cinq grandes familles : *Aphidida* pour les pucerons, *Thysanoptera* pour les thrips, *Cicadellia* pour les cicadelles, *Fulgoradea* pour les fulgore et *Aleyrodia* pour les aleurodes. Tous ces insectes sont des insectes piqueurs suceurs et possèdent un appareil buccal particulier leur permettant de se nourrir de la sève des plantes. Cet appareil buccal se compose d'un rostre, ou labium, qui abrite une paire de stylets mandibulaires et une paire de stylets maxillaires. Ce sont ces stylets maxillaires qui ont pour rôle de percer les cellules afin d'accéder aux cellules du phloème et du xylème. Toute la longueur de la face intérieure des deux stylets maxillaires est sculptée par des crêtes et des rainures qui créent une structure complémentaire permettant aux stylets maxillaires de se verrouiller comme une fermeture éclair. Les stylets maxillaires abritent les canaux salivaire et alimentaire qui fusionnent à leur extrémité en un conduit commun (**Fig. 2**). Les stylets du puceron sont parfois comparés à de fines aiguilles, à la fois flexibles pour passer entre les cellules et accéder aux cellules du phloème, et solides pour percer les parois des cellules végétales.

Les insectes piqueurs suceurs secrètent lors du repas une salive dont les composants appelés effecteurs sont capables d'agir sur la plante pour diminuer les défenses immunitaires et conditionnent par conséquent la virulence des insectes (Cherqui and Tjallingii, 2000; Harmel et al., 2008; Hogenhout and Bos, 2011). Les insectes piqueurs suceurs qui transmettent le plus de virus de plante sont les pucerons (Hogenhout et al., 2008). Leur comportement alimentaire est très particulier. Ils sont d'abord attirés par les odeurs et des couleurs spécifiques des plantes, et notamment le jaunissement qui affecte souvent les plantes infectées par des virus tels que le virus de la jaunisse du navet (*Turnip yellows virus* ou TuYV) sur lequel a porté ce travail de thèse. Après avoir atterri sur une feuille, les pucerons, tout comme les aleurodes, effectuent de brèves piqûres superficielles dans le parenchyme appelées piqûres d'épreuve (Prado and Tjallingii, 1994; Tjallingii and Hogen Esch, 1993). Durant ces brèves piqûres, le puceron éjecte de la salive et aspire de faibles volumes du contenu cellulaire qui lui permettent de goûter la plante (Martin et al., 1997). Si le puceron estime que la plante est appétante, il enfonce plus profondément ses stylets pour atteindre le phloème et prélève de manière prolongée de la sève élaborée. Ce comportement alimentaire fait de ces insectes les vecteurs de virus les plus performants, transmettant près de 30 % des espèces de virus de plantes transmis par vecteurs (Hogenhout et al, 2008). Le tractus digestif des insectes vecteurs est constitué de 3 parties successives : l'œsophage (*foregut*), l'intestin moyen, qu'on subdivise en intestin moyen antérieur (*anterior midgut*, ou estomac) et intestin moyen postérieur (*posterior midgut*) et enfin l'intestin postérieur ou colon (*hindgut*) (**Fig. 3**).

Chez certains hémiptères, comme les cicadelles et les aleurodes, on distingue un organe supplémentaire se situant entre l'œsophage et l'intestin moyen antérieur qui est appelé la chambre filtrante (**Fig. 3**). Cet organe permet de réguler l'apport en eau de la sève ingérée pour en concentrer les éléments nutritifs. Ces différentes parties de l'appareil alimentaire des insectes sont autant de points d'accrochage ou d'entrée des virus dans les cellules du vecteur.

Les principaux vecteurs d'arbovirus de vertébrés appartiennent soit au genre *Acarina*, comme les tiques (*Ixodida*), soit au genre *Insecta*, comme les phlébotomes (*Phlebotominae*), les culicoïdes (*Ceratopogonidae*) et les moustiques (*Culicidae*). Ces derniers, et en particulier les moustiques du genre *Aedes*, sont responsables de la transmission de plusieurs arboviroses dont l'impact en santé humaine est très important (Blair et al., 2000). En dépit de leurs différences évolutives, tous ces arthropodes vecteurs ont en commun un proboscis. Le proboscis est une fine structure en forme de stylet qui permet, par des mouvements de va-et-vient ou des mouvements de coupes latérales, de percer la peau de l'hôte. La pointe du proboscis est parfois dentelée afin d'assurer l'ancrage de l'insecte, comme dans le cas des tiques. Le proboscis permet de faire pénétrer les canaux alimentaire et salivaire de

l'insecte à l'intérieur du corps de l'hôte. Les particularités structurales et fonctionnelles de cet organe chez les différents arthropodes hématophages sont décrites de manière précise dans un article de 2012 par Krenn et Aspöck (Krenn and Aspöck, 2012).

Le plus souvent, l'organe de perçage est enveloppé par une gaine molle qui n'est pas insérée, le labium. Chez le moustique, par exemple, le proboscis est formée de 6 stylets qui sont abrités dans le labium lorsque l'insecte ne se nourrit pas. Parmi ces stylets, on retrouve le labrum et l'hypopharynx qui constituent respectivement le canal alimentaire et le canal salivaire. On trouve aussi une paire de stylets maxillaires, qui sont rigides et permettent de guider l'hypopharynx et le labrum. Enfin, une paire de stylets *laciniae* rattachés à des muscles du proboscis servent, par des mouvements de glissement longitudinaux, à enfoncer profondément les stylets dans l'épiderme des hôtes (**Fig. 4**). Le canal alimentaire est relié à des muscles dans la tête de l'insecte qui jouent le rôle de pompe aspirante pour transporter le sang dans le tube digestif. On peut ainsi considérer que les parties buccales de perçage et d'aspiration des arbovirus de plantes et de vertébrés sont physiquement et fonctionnellement très similaires.

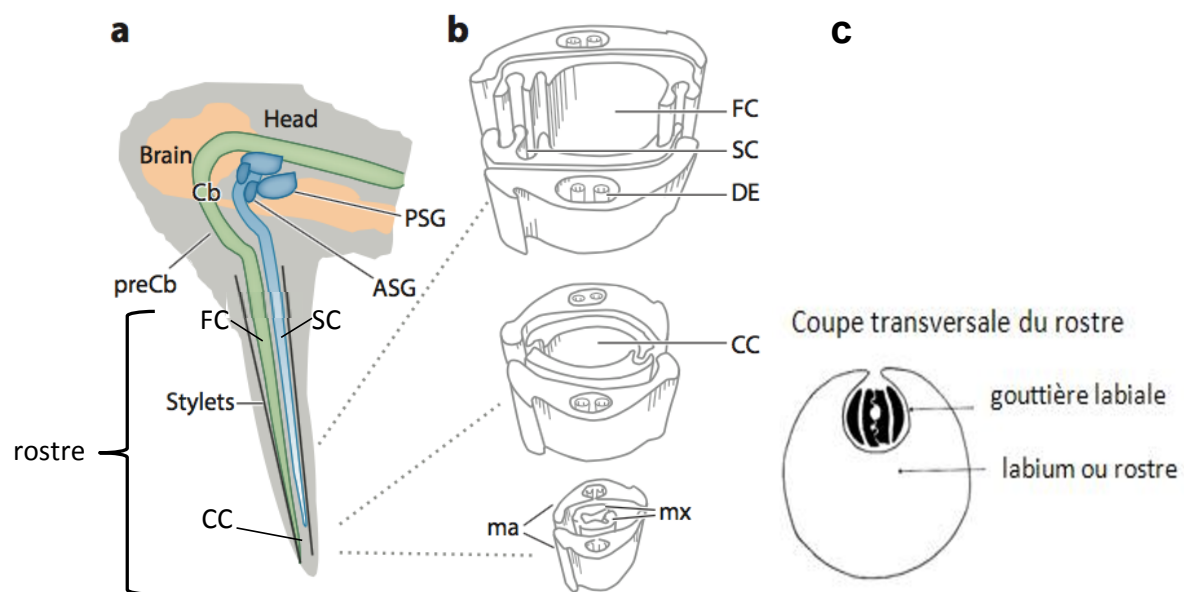


Figure 2 : Représentation schématique des pièces buccales des hémiptères: (a) coupe schématique longitudinale de la tête et du stylet des hémiptères. Le canal alimentaire (FC) est représenté en vert dans le stylet, ainsi que le précibarium (preCb) et le cibarium (Cb). Le canal salivaire (SC), les glandes salivaires principales (PSG) et accessoires (ASG) sont représentées en bleu. A l'extrémité des stylets, la fusion des canaux salivaire et alimentaire donne le canal commun (CC). (b) Les deux stylets mandibulaires (ma) abritent les deux stylets maxillaires (mx) imbriqués comme une fermeture éclair. Les stylets mandibulaires sont innervés par des dendrites (DE). Adapté de (Blanc et al., 2014). (c) coupe transversale du rostre. Les stylets sont situés à l'intérieur de la gouttière labiale

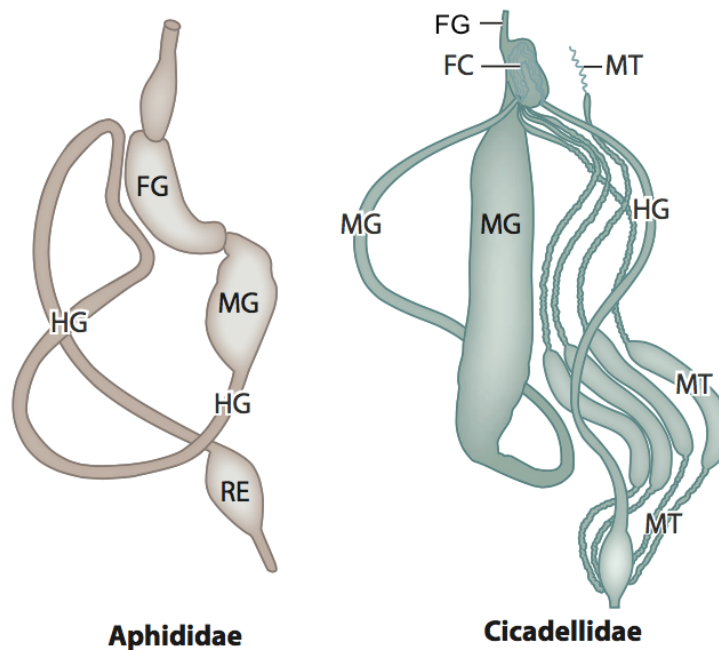


Figure 3 : Comparaison schématique du tube digestif des pucerons et des cicadelles. L'œsophage permet aux aliments d'être apportés dans l'intestin moyen (MG), dont la fonction est d'assurer la digestion et l'adsorption des nutriments. Il est suivi de l'intestin postérieur (HG) qui permet d'acheminer les déchets alimentaires au rectum (RE). Chez les cicadelles, on distingue un organe supplémentaire appelé la chambre filtrante (FC) qui se situe entre l'œsophage et l'intestin moyen. Chacun de ces organes sont autant de points d'accrochage ou d'entrée des virus dans les cellules du vecteur. Les tubes de Malpighi (MT) sont chez les insectes un équivalent des reins chez les mammifères. Ils servent essentiellement à absorber l'eau et à éliminer les déchets azotés, et n'ont pas de rôle connu dans la transmission virale (Blanc et al., 2014).

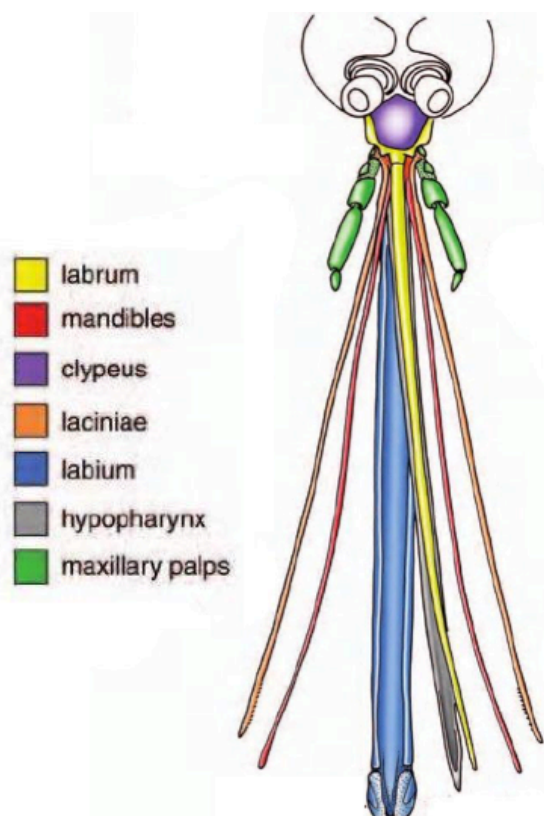


Figure 4 : Représentation schématique du proboscis du moustique. Le proboscis est formée de 6 stylets dont le labrum et l'hypopharynx qui constituent respectivement le canal alimentaire et le canal salivaire. On trouve aussi une paire de stylets maxillaires, et une paire de stylets *laciniae*. L'ensemble de ces stylets est emprisonné dans le labium lorsque l'insecte ne se nourrit pas. Le clypeus est un des sclérites qui composent la face avant de l'insecte et surmonte le proboscis. Image libre de droits.

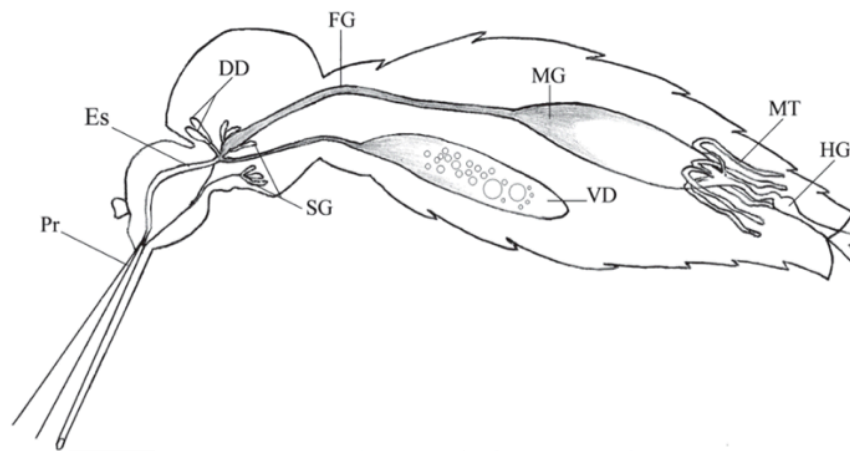


Figure 5 : Représentation du tractus digestif des *Culicidae*. Le proboscis (Pr) contient les pièces perforatrices permettant d'aspirer le sang et de l'amener dans l'œsophage (Es). Le sang circule ensuite dans l'intestin moyen antérieur (FG), l'intestin moyen (MG), et l'intestin postérieur (HG), et peut être stocké dans les diverticules dorso-latéraux (DD) ou dans le diverticule ventral (Gusmao et al., 2007) (MT : tubes de Malpighi, VD : diverticules ventraux, SG : glandes salivaires).

Chez les moustiques, le canal alimentaire peut être divisé en trois régions principales, l'œsophage, l'intestin moyen et de l'intestin postérieur. En plus de ces trois portions principales, des extensions de l'intestin appelées diverticules émergent de l'extrémité postérieure de l'œsophage. Ces diverticules servent essentiellement à stocker des réserves de nourriture. Le diverticule ventral émerge de la face ventrale de l'œsophage et deux diverticules dorso-latéraux émergent de la face dorsale (**Fig. 5**). De manière intéressante, l'acquisition de sang modifie drastiquement la structure de l'épithélium de l'intestin moyen : plusieurs organites changent de forme et des plaques opaques aux électrons apparaissent dans les cellules observées en microscopie électronique (Okuda et al., 2002). De plus, une structure chitineuse est sécrétée par l'épithélium. Il s'agit de la membrane péritrophique, visible au microscope 4 à 8 h après un repas de sang par *A. aegypti* (Kato et al., 2002). La matrice péritrophique est une structure extracellulaire semi-perméable contenant de la chitine et différentes protéines intégrées. Elle serait impliquée dans la protection immunitaire des tissus intestinaux. Cette structure a principalement été observée chez les insectes diptères mais peut aussi être retrouvée chez des hémiptères transmettant les arbovirus de plante telle que la cicadelle. Elle n'est cependant pas présente chez le puceron, et aucun lien entre cette structure et la transmission virale n'a pour le moment été démontrée (Chapman, 2003). L'intestin moyen étant le seul point d'entrée connu pour les arbovirus transmis par moustique, il est nécessaire, lors du repas sur un hôte infecté, que les virions pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen avant que la

membrane péritrophique ne se forme.

3) Les modes de transmission des arbovirus

Plusieurs modes de transmission ont été définis chez les arbovirus de vertébrés et les arbovirus de plante selon le type d'interactions qui s'établit entre le vecteur et le virus. On distingue donc trois types de transmission chez les arbovirus des plantes : la transmission non circulante, la transmission circulante non multipliante, et la transmission circulante multipliante. Chez les arbovirus de vertébrés, deux modes ont été définis : la transmission biologique et la transmission mécanique.

a. La transmission circulante non multipliante des virus de plante

Les virus de plante transmis selon le mode circulant non multipliant sont tous localisés dans le phloème des plantes hôtes, à l'exception du Pea enation mosaic virus (PEMV-1, *Enamovirus*, *Luteoviridae* et PEMV-2, *Umbravirus*, *Tombusviridae*) qui est capable d'envahir les cellules non phloémiennes car assisté du PEMV-2. Le PEMV-2 confère au PEMV-1 des fonctions de mouvement en dehors des cellules phloémiennes alors que le PEMV-1 amène en trans une protéine de capsid permettant au PEMV-2 d'être encapsidé et transmis par puceron (de Zoeten and Skaf, 2001). La transmission des virus selon ce mode exige que la plante soit à la fois un hôte du virus mais aussi de l'insecte vecteur qui acquiert le virus en se nourrissant dans le phloème pendant plusieurs heures.

Le virus ingéré est transporté le long du tractus alimentaire de l'insecte ; il va ensuite traverser les cellules du tube digestif au niveau de points d'entrée qui varient en fonction du virus (chambre filtrante, intestin moyen, intestin postérieur) par des mécanismes qui restent encore pour certains inconnus. Le virus est ensuite libéré dans l'hémocèle, la cavité qui contient l'hémolymphe (liquide dans lequel baignent les organes des insectes). Dans l'hémolymphe, le virus migre jusqu'aux glandes salivaires où il est internalisé au niveau des cellules des glandes salivaires principales (GSP) ou accessoires (GSA). Le virus est finalement transmis, via la salive, à une nouvelle plante hôte (**Fig. 6**). Une fois le virus acquis, les insectes vecteurs restent virulifères même après les mues et peuvent transmettre le virus pendant toute leur vie (Brault et al., 2007; Gildow, 1999). Les insectes ne sont cependant pas des hôtes du virus, car celui-ci ne s'y multiplie pas.

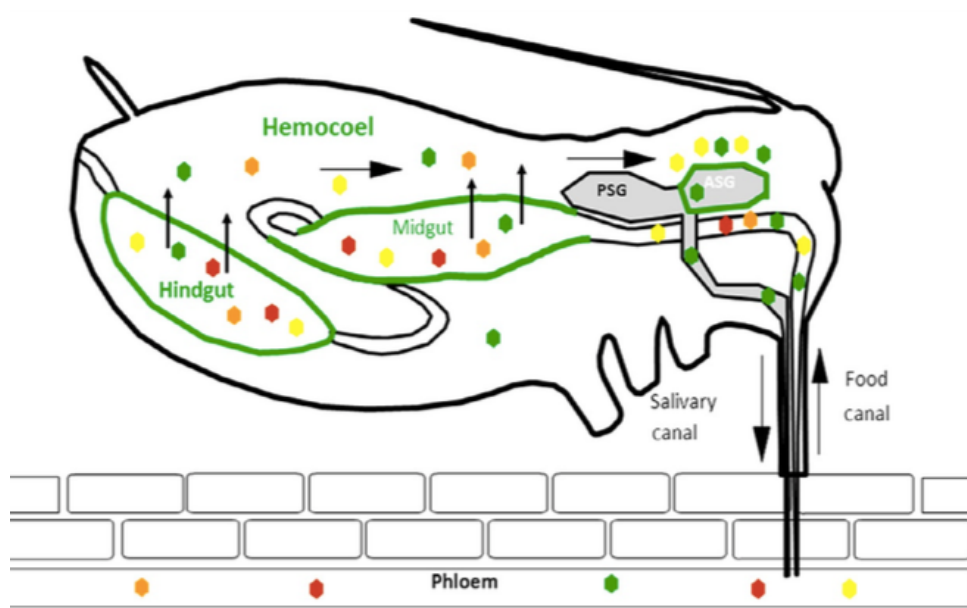


Figure 6 : Schéma de la transmission circulante : les virus ingérés sont transportés le long du tractus alimentaire de l'insecte ; Les virus transmissibles (particules vertes) traversent ensuite les cellules du tube digestif au niveau de points d'entrée qui varient en fonction du virus. Les virions sont ensuite libérés dans l'hémocoel et migrent jusqu'aux glandes salivaires. Les virus sont finalement internalisés dans les cellules des glandes salivaires principales (PSG) ou accessoires (ASG) et transmis, via la salive, à une nouvelle plante hôte. Les virus non transmissibles ne peuvent pas traverser soit la barrière de l'intestin (particules rouges) soit la barrière des glandes salivaires (particules jaunes et orange). Contrairement aux virus circulants non multipliants, les virus circulants multipliants se répliquent dans les tissus de l'insecte, notamment les cellules de l'intestin, les ovaires et des glandes salivaires. Adapté de (Gray et al., 2014).

b. La transmission circulante multipliante des virus de plante

Les virus transmis selon le mode circulant multipliant sont des virus de plantes qui possèdent la capacité de se multiplier dans l'organisme vecteur. Le trajet suivi par ces virus commence, comme pour les virus circulants non multipliants, par l'entrée des virus dans le canal alimentaire et l'internalisation dans les cellules épithéliales de la chambre filtrante et de l'oesophage. Le virus traverse ensuite la lamelle basale des cellules intestinales pour infecter les cellules musculaires entourant le tube digestif. Le virus se déplace ensuite dans l'hémolymph de l'insecte, atteint les glandes salivaires de l'hôte, traverse les cellules pour être enfin rejeté dans la salive. Sur le trajet de l'intestin aux glandes salivaires, ces virus se multiplient dans divers tissus dont les cellules épithéliales et musculaires de l'intestin, les ovaires et les glandes salivaires. Ainsi, tout comme les virus circulants non multipliants, ces virus doivent passer les barrières cellulaires de l'intestin et des glandes salivaires, et sont, une fois acquis, transmissibles à vie par l'insecte vecteur (Ammar el et al., 2009; Chen et al., 2011b).

c. La transmission non circulante des virus de plante

Les virus de plantes non circulants sont par définition des virus qui ne circulent pas dans le corps de l'insecte vecteur. Plus précisément, ces virus ne pénètrent pas dans les cellules du vecteur et ne s'y répliquent donc pas. Ils ne sont transportés de plante à plante par le vecteur qu'en étant retenus sur des sites à l'extérieur des cellules au niveau de la cuticule tapissant l'intérieur des stylets (**Fig. 7**), ou au niveau de l'oesophage, selon les virus. Cette rétention cuticulaire explique la perte d'infectivité d'un vecteur après une mue.

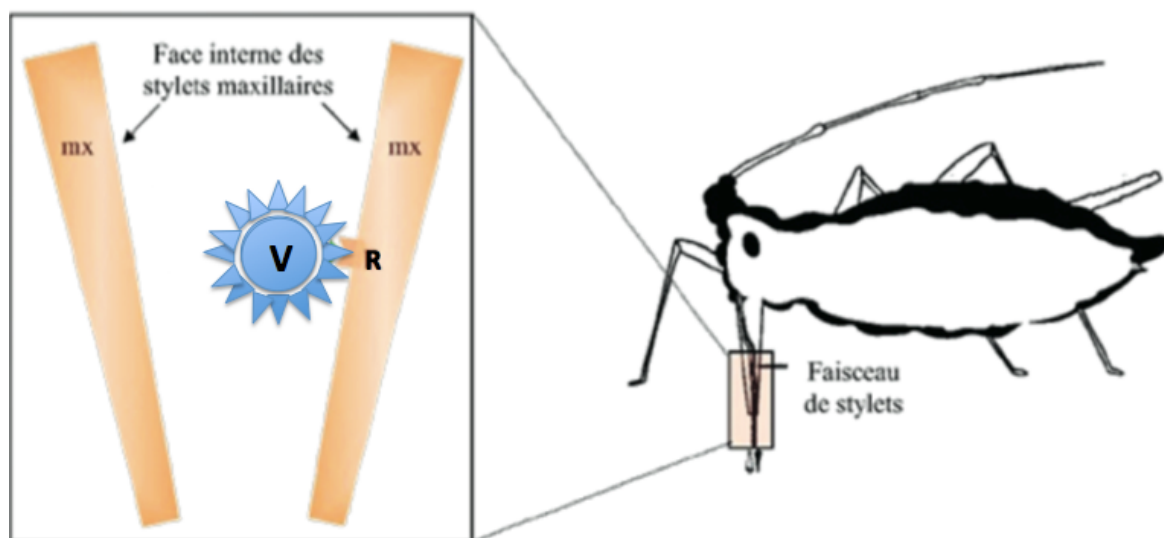


Figure 7 : Représentation schématique d'un virus non circulant fixé à l'extrémité des stylets d'un puceron. Lorsque le puceron se nourrit sur une plante infectée par un virus non circulant, le virus (V) se fixe à un récepteur (R) soit au niveau de la cuticule tapissant l'intérieur des stylets, soit au niveau de la cuticule tapissant l'oesophage, selon les virus. Lors d'un repas ultérieur, il se détache pour infecter une nouvelle plante hôte. Adapté d'un poster de Lecorre et Kim Lee Hai, 2010.

d. La transmission biologique des virus des vertébrés

Comme cela a été proposé en 1983 (Hardy et al., 1983), les étapes clés d'une infection efficace d'arbovirus transmis par moustique de manière biologique comprennent (1) l'initiation de l'infection dans l'intestin moyen ; (2) la propagation de l'infection dans l'épithélium de l'intestin moyen ; (3) la diffusion de l'infection de l'intestin moyen aux tissus secondaires ; (4) l'amplification secondaire du virus dans ces tissus ; (5) l'infection des cellules des glandes salivaires (et parfois des tissus reproductifs pour la transmission verticale à la progéniture) ; et (6) la libération du virus dans les conduits salivaires pour la transmission horizontale à un hôte vertébré non infecté. Ce processus rappelle fortement les étapes suivies par les arbovirus de plantes transmis selon le mode circulant et multipliant

et suggère l'existence de mécanismes similaires pour le franchissement des épithéliums intestinaux et salivaires.

Les arbovirus de vertébrés comprennent une grande variété de virus à ARN, tous transmis de manière biologique. Le seul arbovirus à ADN transmis de manière biologique chez les vertébrés est l'*African swine fever virus* de la famille des *Asfarviridae* (Calisher and Karabatsos, 1988; Karabatsos, 1985; Viruses. et al., 2000).

e. La transmission mécanique des virus des vertébrés

Chez les vertébrés, il est admis que la transmission virale d'arbovirus, lorsqu'elle n'est pas biologique, ne peut être que mécanique. On appelle transmission mécanique la contamination non spécifique des animaux par des insectes suceurs-piqueurs. Ces insectes inoculent le virus au niveau du site d'alimentation, de trois manières différentes : par contact avec le sang qui réside sur les pièces buccales, par régurgitation du sang contaminé, ou par l'intermédiaire d'excréments contaminés qui souillent les plaies de l'animal hôte. Les arbovirus à ADN sont tous transmis de manière mécanique à l'exception de l'*African swine fever virus* (Weaver and Reisen, 2010).

II. Arbovirus de plantes transmis selon le mode circulant non multipliant : les vecteurs et les déterminants viraux

1) Généralités

Les familles *Luteoviridae*, *Geminiviridae* et *Nanoviridae* comprennent des virus de plantes transmis de manière circulante et non multipliante par insectes (**Table 1**). Les *Luteoviridae* et *Nanoviridae* sont transmis exclusivement par les pucerons, tandis que les *Geminiviridae* sont transmis par les pucerons, les aleurodes, les cicadelles et les membracides. Ces virus sont donc uniquement transmis par des insectes appartenant à l'ordre des hémiptères. Au sein de ces trois familles de virus, les études approfondies sur la biologie des vecteurs et les mécanismes de transmission sont limitées à une, ou à quelques espèces virales, et le degré d'extrapolation entre les espèces au sein d'une famille est incertain.

Table 1 (page suivante) : Les virus circulants et non multipliants: famille, genre, insectes vecteurs, site d'entrée dans les cellules du vecteur, protéines virales et protéines du vecteur impliquées ou suspectées d'être impliquées dans la transmission. Les protéines de l'hôte et les protéines virales pour lesquelles il manque encore des éléments de preuves formelles quant à leur implication dans la transmission sont signalées en bleu. CP : protéine de capsid ; RT : protéine de *readthrough*. Liste non exhaustive ne comprenant que les virus cités dans ce manuscrit.

Famille	Genre	Virus cités dans la thèse	Insectes vecteurs	Protéines virales impliquées dans la transmission	Sites d'entrée du virus	Protéines de l'hôte impliquées ou potentiellement impliquées dans la transmission
Luteoviridae	<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus (BYDV)</i>	puceron	CP + RT	intestin moyen et/ou intestin postérieur	Symbionine (GroEL) SaM50 Cyclophiline Luciférase
	<i>Polerovirus</i>	<i>Turnip yellows virus (TuYV)</i> <i>Potato leafroll virus (PLRV)</i> <i>Cereal yellow dwarf virus (CYDV)</i> <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)</i>				Symbionine (GroEL) Rack1 GAPDH3 Actine Co-A ligase Protéine cuticulaire RepA Troponine T
	<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus-1 (PEMV-1)</i> (obligatoirement associé au PEMV2, Umbravirus, Tombusviridae)				Symbionine (GroEL) APN
Geminiviridae	<i>Begomovirus</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i> <i>African cassava mosaic virus (ACMV)</i> <i>Abutilon mosaic virus (AbMV)</i> <i>Sida golden mosaic virus (SiGMV)</i> <i>Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)</i>	cicadelle membracide puceron aleurode	CP	intestin moyen	Symbionine
	<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus (BCTV)</i>				Symbionine
Nanoviridae	<i>Nanovirus</i>	<i>Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV)</i>	puceron	CP	intestin moyen	
	<i>Babuvirus</i>	<i>Banana bunchy top virus (BBTV)</i>		Facteur assistant	chambre filtrante	

2) La transmission des *Luteoviridae*

Les *Luteoviridae* forment une famille de virus regroupant les virus de 3 genres distincts, *Polerovirus*, *Luteovirus* et *Enamovirus*. Ces virus forment des capsides icosaédriques de symétrie $T = 3$ avec un diamètre de 25 à 30 nm qui renferment un génome d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 6 kb. Les particules virales sont composées de 180 sous-unités de Protéine de Capside (CP) et de quelques copies d'une protéine appelée Protéine de Readthrough* (RT*). Le symbole « * » signifie que cette protéine est la forme clivée de la Protéine de Readthrough (RT) qui a perdu sa partie C-terminale. La RT est générée après la translecture traductionnelle du codon stop du cadre de lecture ouvert (ORF) de la CP. C'est donc une protéine de fusion qui contient la CP dans sa partie N-terminale et le domaine de RT (DRT) dans sa partie C-terminale. Le mécanisme de translecture du codon stop de la CP permet de fournir un nombre restreint de monomères de CP intégrés dans le virion possédant une extension C-terminale (Mayo and Miller, 1999; Miller et al., 1995). La CP et la RT* régulent toutes deux les interactions puceron/virus. Ces deux protéines, ainsi que la forme complète de la RT, interviennent dans le mouvement des virus et le tropisme tissulaire au sein de la plante et dans le puceron (Brault et al., 2003; Brault et al., 2005; Brault et al., 1995; Chay et al., 1996; Kaplan et al., 2007; Lee et al., 2005; Peter et al., 2009). L'acquisition et la transmission des *Luteoviridae* sont très spécifiques et chaque *Luteoviridae* n'est transmis efficacement que par une ou plusieurs espèces de pucerons (Gildow, 1999).

La CP est suffisante pour le passage des virions au travers des cellules de l'intestin mais la RT* intervient dans l'efficacité du processus. Cette protéine RT* est cependant requise pour le passage des virions dans les cellules des glandes salivaires accessoires (Brault et al., 2000; Bruyère et al., 1997; Peter et al., 2008; Reinbold et al., 2001). L'implication de protéines végétales dans la transmission des polérovirus a également été suggérée. En effet, l'association des particules virales du *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) avec certaines protéines végétales induites dans le phloème des plantes suite à une infection par le CYDV semble être nécessaire pour la transmission du virus par les pucerons (Cilia et al., 2012). Il a également été montré que des protéines présentes dans la sève des cucurbitacées ont un rôle stimulateur dans la transmission du *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) par puceron (Bencharki et al., 2010).

Le mécanisme de transmission et la spécificité vectorielle ont été intensément étudiés au niveau ultrastructural pour plusieurs espèces de *Luteoviridae* (Brault et al., 2007; Gray and Gildow, 2003). Après l'acquisition des virions par ingestion de la sève, ces derniers migrent à travers le tube digestif du puceron et sont internalisés par un mécanisme d'endocytose-exocytose appelé transcytose soit au niveau de l'intestin moyen postérieur (cas du TuYV, CYDV) soit de l'intestin postérieur (cas du *Barley yellow dwarf virus*, (BYDV)), soit des deux

(cas du CABYV) (Gildow, 1991, 1993; Gildow and Gray, 1993; Reinbold et al., 2001; Reinbold et al., 2003). Ce mécanisme de transcytose est supposé reposer sur des interactions directes entre les protéines de structure et des récepteurs spécifiques du virus à la surface des cellules de l'intestin, étant donné la nature non enveloppée et non glycosylée des particules virales des *Luteoviridae* (Revollon et al., 2010). Ces récepteurs restent largement inconnus aujourd'hui. À noter que la plupart des *Luteoviridae* peuvent être internalisés (c'est-à-dire entrer dans les cellules de l'intestin) dans des pucerons vecteurs et non vecteurs, indiquant que l'épithélium digestif est peu spécifique pour l'endocytose des particules virales. L'absorption intestinale se produit par un mécanisme d'endocytose qui serait médié par des vésicules recouvertes de clathrine. Les études d'immunolocalisation *in situ* ont révélé que les particules des *Luteoviridae* ne sont jamais libres dans le cytoplasme (Garret et al., 1993; Gildow, 1999). Le processus d'internalisation des particules commence au niveau de la membrane plasmique apicale avec la formation de puits à clathrine qui initient la formation des vésicules. Les vésicules à clathrine fusionnent ensuite avec des structures plus grandes appelées endosomes. Des vésicules tubulaires émergent des endosomes et se déplacent vers la membrane plasmique basale de la cellule. La fusion avec cette membrane permet de relâcher les virions dans l'espace extracellulaire. Les particules virales franchissent ensuite la lamelle basale, réseau de laminine, de collagène et de glucosaminoglycanes, puis se retrouvent libres dans l'hémolymphe (**Fig. 8**). Le même mécanisme de transcytose est utilisé par le virus pour traverser les cellules des glandes salivaires accessoires (ASG). Au niveau de ces cellules, les virions doivent d'abord traverser la lamelle basale entourant les cellules et la membrane plasmique basale, avant de franchir la membrane plasmique apicale pour se retrouver dans la lumière de la glande salivaire puis dans le canal salivaire. Seuls les virus capables de franchir ces barrières sont efficacement transmis par le vecteur (Gildow, 1999) (**Fig. 8**).

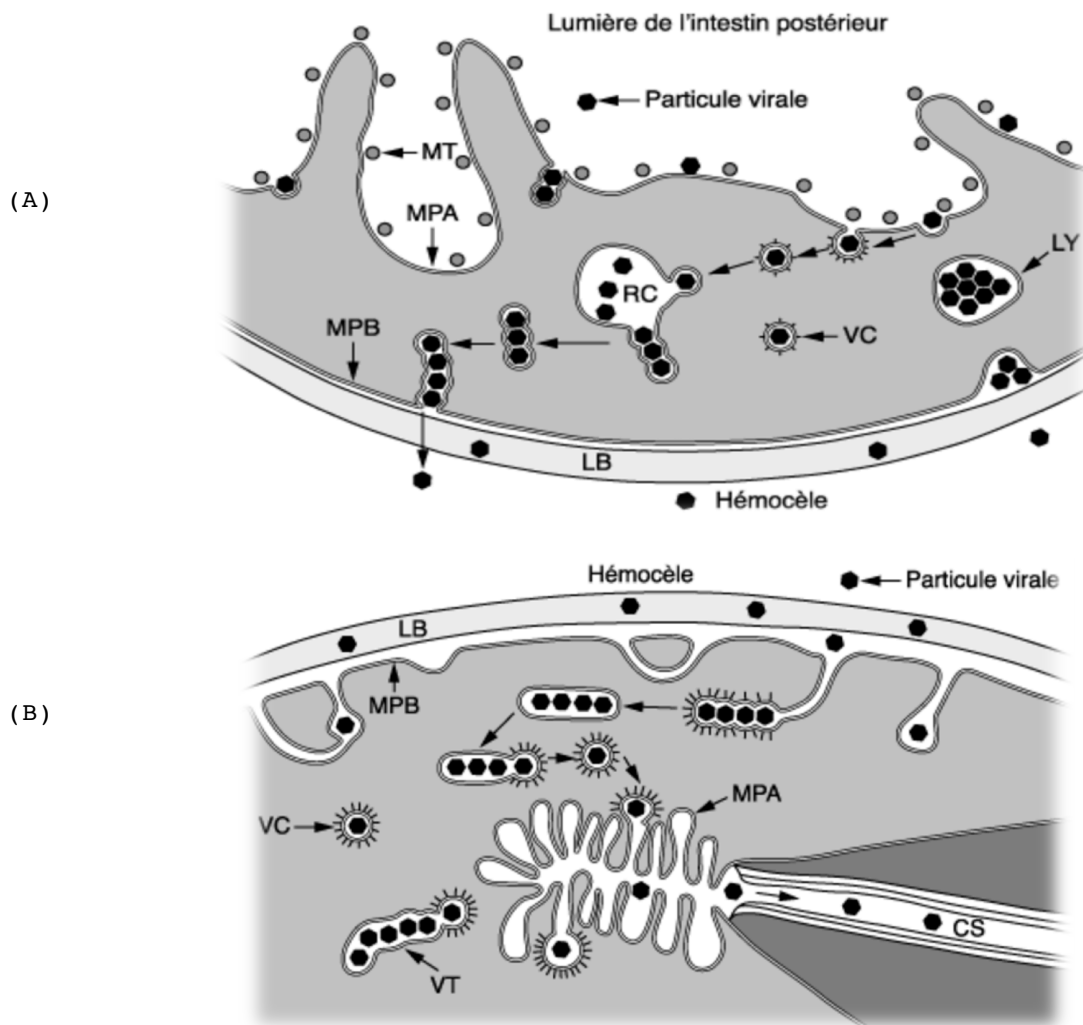


Figure 8: Schéma du mécanisme de transcytose des *Luteoviridae* à travers (A) l'épithélium intestinal et (B) les glandes salivaires accessoires des pucerons. (A) Les *Luteoviridae* sont reconnus et se fixent à la membrane plasmique apicale (MPA) des cellules du tube digestif grâce à l'interaction avec un ou plusieurs récepteurs viraux. Cette interaction permet d'initier l'invagination de la membrane et l'endocytose des virions dans des vésicules à clathrine (VC). Les VC fusionnent ensuite avec des endosomes aussi appelés réceptosomes (RC). Des structures tubulaires contenant plusieurs virions bourgeonnent des réceptosomes et vont fusionner avec la membrane plasmique basale (MPB). Les virions libérés par exocytose diffusent au travers la lamelle basale (LB) et sont libérés dans l'hémocèle. (B) Après avoir migré dans l'hémocèle des pucerons, les virions atteignent les glandes salivaires accessoires, diffusent à travers la lamelle basale (LB) et entrent en contact avec la membrane plasmique basale (MPB). Par invagination de la membrane plasmique, ils se retrouvent dans des vésicules tubulaires (VT) qui bourgeonnent pour donner des VC. Les VC migrent vers la MPA, fusionnent avec elle, ce qui libère les particules virales dans la lumière du canal salivaire (CS). Les virions sont entraînés avec les sécrétions salivaires et sont inoculés à une plante lors d'une prise alimentaire (d'après Gray and Gildow, 2003).

Une analyse transcriptomique réalisée sur les gènes intestinaux de pucerons virulifères (porteurs du Pea enation mosaic virus, PEMV) a révélé que les modifications de l'expression des gènes étaient faibles et limitées à quelques gènes (Brault et al., 2010a). Bien que cette étude ne portait que sur un nombre limité de transcrits ne représentant qu'une partie de l'expression du génome, les résultats laissent suggérer que le virus détourne un mécanisme de transcytose constitutif. L'hypothèse la plus communément admise est donc que la présence du virus n'induit que peu de dérégulations dans les cellules du puceron. Cette hypothèse est néanmoins remise en question par des études récentes qui montrent que le comportement des pucerons est modifié après acquisition de virus de la famille des *Luteoviridae* à partir de plantes infectées, mais aussi à partir de virus purifié (Bosque-Perez and Eigenbrode, 2011; Ingwell et al., 2012; Medina-Ortega et al., 2009; Rajabaskar and Bosque-Pérez, 2015). Il est cependant admis qu'il n'existe que très peu de contacts entre les particules virales et les protéines du puceron, puisque les particules virales ont toujours été observées dans des vésicules. La seule exception serait donc les composants de la membrane apicale des cellules du tube digestif ainsi que ceux de la lamelle basale et de la membrane plasmique basale des cellules des GSA qui interagissent directement avec les particules virales pour leur internalisation. Plusieurs protéines de puceron présentant la capacité d'interagir avec des virions purifiés ont déjà été observées (Li et al., 2001; Seddas et al., 2004; Van den Heuvel et al., 1994). Toutes ces protéines n'ont pas été identifiées par spectrométrie de masse et leur participation au processus de transmission du puceron n'a été signalée que pour trois d'entre elles. La première est la symbionine, un homologue de la protéine chaperone GroEL d'*Escherichia coli* qui est produit par l'endosymbionte primaire *Buchnera spp aphidicola* et qui a montré des capacités d'interaction *in vitro* avec les particules de plusieurs *Luteoviridae*, et plus particulièrement avec la protéine mineure de la capsid (Filichkin et al., 1997; van den Heuvel et al., 1997). Les endosymbiontes bactériens résident dans des cellules spécialisées présentes dans l'hémocèle et appelées bactériocytes. Un traitement antibiotique des pucerons éliminant les endosymbiontes inhibe la capacité des pucerons traités à transmettre le *Potato leafroll virus* (PLRV) (Van den Heuvel et al., 1994). Ce résultat suggère que la symbionine pourrait protéger les virions de la dégradation par le système immunitaire des insectes en interagissant avec la particule virale. Cependant, même si la symbionine est nécessaire pour une transmission efficace des pucerons des *Luteoviridae*, elle n'est pas un facteur déterminant la spécificité, car sa présence dans les pucerons n'est pas corrélée à la capacité de transmission des *Luteoviridae* (van den Heuvel et al., 1997; van den Heuvel et al., 1999). De plus, des études plus récentes, basées sur l'immunolocalisation de la protéine dans le corps du puceron, remettent en question l'implication de la symbionine dans la transmission du BYDV (Bouvaine et al., 2011). Une revue récente détaille l'avancement des connaissances sur le rôle de la protéine GroEL dans la transmission des virus de plantes par insectes (Pinheiro et al., 2015). La spécificité de la

transmission des pucerons serait plus probablement attribuée aux récepteurs présents sur les cellules de l'intestin et sur celles des GSA. La deuxième protéine de puceron soupçonnée d'être impliquée dans le processus de transmission est SaM50 (*S. avenae* protein binding MAV) qui est localisée au niveau des cellules des GSA (Li et al., 2001). L'acquisition simultanée par le puceron des virions du BYDV et d'anticorps dirigés contre SaM50 diminue considérablement la transmissibilité du virus (Wang and Zhou, 2003). Enfin, la troisième protéine capable de se lier à des virions et impliquée dans la transmission est la protéine membranaire alanyl aminopeptidase N (APN). Cette dernière a récemment été identifiée comme le premier récepteur viral localisé dans un vecteur de virus de plante par les équipes de recherche de Bryony C. Bonning (Linz et al., 2015). Des expériences de phage display avaient permis initialement d'identifier un peptide appelé GBP.1 capable de se lier *in vivo* à l'intestin du puceron et de bloquer l'entrée du PEMV (Liu et al., 2010). Une seconde étude a ensuite permis de montrer que ce peptide se lie plus précisément à la protéine APN (Chougule et al., 2013). Enfin, en 2015, les auteurs ont montré (1) que le PEMV se lie *in vitro* à APN, (2) que l'expression d'APN dans des cellules Sf9 de lépidoptère permet l'internalisation du PEMV dans ces cellules, et (3) que le peptide GBP.1 entre en compétition avec une protéine de fusion constituée de la CP/GFP pour la fixation au récepteur APN du puceron *Acyrtosiphon pisum* (Linz et al., 2015). Cette dernière expérience a été menée en utilisant un système de vésicules membranaires issues de microvillosités intestinales qui simule des interactions *in vivo*. Ces travaux soutiennent fortement que APN est un récepteur du PEMV dans le puceron *A. pisum*. Cette importante avancée dans la compréhension de l'interaction *Luteoviridae*-puceron ouvre la voie à de nouveaux moyens de phytoprotection basés sur le blocage de cette interaction.

Les autres protéines de pucerons présentant une capacité de liaison aux *Luteoviridae* sont (1) l'actine, qui pourrait agir dans l'internalisation des vésicules à clathrine ou le transport intracellulaire des vésicules, (2) le récepteur de la kinase C activée (Rack1), (3) la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase 3 (GAPDH3) (Seddas et al., 2004). Ces trois protéines ont été identifiées initialement chez *M. persicae*, mais une analyse génomique des gènes potentiellement impliqués dans la transcytose a aussi permis de les identifier dans *A. pisum* et elles pourraient donc intervenir dans la transmission des virus par cette espèce de puceron (Tamborindeguy et al., 2010). Ces protéines ne sont probablement pas les véritables récepteurs du virus, mais pourraient fonctionner comme des signaux de transduction dans la voie de l'endocytose (Brault et al., 2007).

Après avoir croisé 2 génotypes de *Schizaphis graminum*, l'un vecteur du CYDV et du BYDV et l'autre non, un groupe de recherche a démontré que la transmission des *Luteoviridae* est régulée en grande partie par un gène majeur ou un ensemble de gènes étroitement liés, tandis que pour chacun de ces virus un ensemble unique de gènes mineurs est capable

d'influencer l'efficacité de la transmission. Des expériences d'acquisition et d'injection du CYDV dans les descendants des croisements ont montré que des barrières de transmission existaient soit au niveau de l'intestin, soit au niveau des glandes salivaires, ou encore simultanément au niveau des deux barrières, comme chez le parent non vecteur. À l'inverse, aucun facteur de l'hémolymphe ne semblait influencer le déterminisme du phénotype de transmission. Ces données indiquent donc que les gènes impliqués dans la transmission sont soit spécifiques des cellules intestinales, soit spécifiques des cellules des glandes salivaires (Burrows et al., 2006; Burrows et al., 2007). Les résultats de croisement entre génotypes transmetteurs et non transmetteurs du CYDV ont particulièrement été étudiés à l'aide de l'électrophorèse sur gel à deux dimensions (DIGE) couplée à la spectrométrie de masse. Cette méthode permet de caractériser les protéomes de chaque génotype. La DIGE permet notamment de différencier plusieurs isoformes pour une même protéine, car ceux-ci sont séparés en fonction de leurs points isoélectriques (pI). Dans une première étude utilisant cette technique, quatre protéines ont été associées à la capacité du puceron à transmettre le CYDV (Yang et al., 2008). Les auteurs ont montré que ces 4 protéines sont spécifiquement exprimées ou surexprimées dans les génotypes vecteurs, et sont capables d'interagir *in vitro* avec le virus purifié. Deux d'entre elles ont été identifiées comme des protéines de type luciférase et cyclophiline, dont la fonction pourrait être liée au transport macromoléculaire et donc potentiellement à la transcytose. Une seconde étude utilisant également des croisements entre génotypes vecteurs et non vecteurs du CYDV couplée à la protéomique a pu mettre en évidence 9 protéines dont les isoformes sont liés à la transmission virale (Cilia et al., 2011). Ces protéines identifiées chez les génotypes transmetteurs, et potentiellement impliquées dans la transmission, sont principalement impliquées dans le métabolisme énergétique, le cycle cellulaire et le trafic membranaire. Certains génotypes non transmetteurs possédaient des barrières intestinales tandis que d'autres possédaient des barrières au niveau des glandes salivaires ce qui permet de prédire dans quelle étape de la transmission sont impliquées les protéines identifiées. Ainsi, 4 protéines ont été identifiées comme agissant au niveau de la barrière intestinale : la Co-enzyme A ligase, la Protéine de Cuticule, la réplicase RepA, et la Troponine T. La protéine dihydropteridine réductase (DHR) a elle été identifiée comme agissant au niveau des GSA lors de la transmission virale. Enfin 3 protéines, la GAPDH, l'*electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase* (ETF-DH) et l'ATP-déshydrogénase (ATP-D) ont été identifiées comme impliquées dans la transmission virale, mais ne semblent pas intervenir au niveau d'une barrière spécifique. Les auteurs ont de plus mis en évidence un lien évident entre la population de *Buchnera aphidicola* (le symbionte primaire du puceron *Schizaphis graminum*) présente dans le puceron et la compétence vectorielle. En effet, certaines isoformes des protéines de *B. aphidicola* étaient systématiquement retrouvées dans les génotypes transmetteurs, mais pas dans les génotypes non transmetteurs.

3) Les *Geminiviridae*

Les *Geminiviridae* sont, comme les *Nanoviridae*, lointainement liés aux *Circoviridae* qui infectent les mammifères, les oiseaux et les insectes. La famille des *Geminiviridae* comprend les genres suivants : *Begomovirus*, *Egumovirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, *Mastrevirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, et *Eragrovirus*. Globalement, on peut estimer que chacun de ces genres de virus est transmis spécifiquement par un ensemble de vecteurs. Les virus du genre *Begomovirus* sont transmis par des aleurodes ; les virus des genres *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, et probablement ceux du genre *Eragrovirus* sont transmis par des cicadelles ; les virus du genre *Topocuvirus* sont quant à eux transmis par des membracides. Deux nouveaux genres, *Capulavirus* et *Grablovirus*, ont été proposés pour décrire 5 géminivirus découverts récemment et fortement divergents des autres virus appartenant à cette famille. Ces virus n'ont pas de vecteur connu, excepté le *Capulavirus Alfalfa leaf curl virus*, transmis par le puceron *Aphis craccivora* (Roumagnac et al., 2015; Varsani et al., 2017). À noter également qu'un cas de transmission via les graines de tomates infectées a été signalé pour un des *Begomovirus*, le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Kil et al., 2016).

Concernant les interactions avec les insectes vecteurs, les virus les plus étudiés parmi les *Geminiviridae* sont ceux du genre *Begomovirus*, dont le virus type est le TYLCV qui est transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci* (Brown, 2010; Frohlich et al., 1999). Le TYLCV est aussi le virus qui, au sein de cette famille, pose le plus de problèmes au niveau économique, menaçant la production des tomates mais aussi d'autres cultures et plantes ornementales dans le monde entier (Brown et al., 2015; Czosnek, 2007; Navas-Castillo et al., 2011); <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Les mécanismes moléculaires gouvernant la transmission des *Geminiviridae* seront donc illustrés dans ce paragraphe avec le cas des *Begomovirus*.

Après une prise de nourriture des insectes sur une plante infectée, les virions traversent les cellules au niveau de l'intestin moyen et de la chambre filtrante. De manière générale, il est admis que les *Geminiviridae* ne se répliquent pas dans leurs vecteurs, et que les virions sont transportés dans l'intestin par transcytose, tout comme les *Luteoviridae*. Cependant, plusieurs rapports suggèrent que le TYLCV pourrait se multiplier dans les aleurodes, et ce sujet reste caution à débat, même si la publication la plus récente réfute cette possibilité (Czosnek et al., 2001; Diaz-Pendon et al., 2010; Mehta et al., 1994; Pakkianathan et al., 2015; Sanchez-Campos et al., 2016; Sinisterra et al., 2005).

Lorsque les virions des *Begomovirus* sont libérés hors des cellules intestinales, ils traversent l'hémocoel des aleurodes et atteignent les glandes salivaires principales (GSP), dont ils

traversent les différentes barrières pour être libérés dans le canal salivaire. Comme les cellules des glandes salivaires principales ont été observées en contact direct avec l'intestin moyen antérieur, il est possible que la translocation du virus puisse aussi se produire par transfert direct entre les cellules de l'intestin moyen et celles des glandes salivaires (Cicero and Brown, 2011a, b). Une étude récente a permis de montrer l'importance de l'endocytose dans des vésicules à clathrine pour le transport des particules du TYLCV à travers les cellules de l'intestin moyen antérieur des aleurodes (Pan et al., 2017a), confirmant les observations faites en microscopie électronique (Uchibori et al., 2013). Comme pour les *Luteoviridae*, il semblerait que la protéine GroEL soit également impliquée dans la transmission du virus. L'acquisition d'anticorps dirigés contre GroEL avant l'acquisition du TYLCV réduit la transmission du virus de 80% à des plants de tomates. Dans l'hémolymphe des aleurodes ainsi traités, le génome du TYLCV est indétectable, suggérant une dégradation en absence de GroEL. Celle-ci aurait donc un rôle de protection des virions du TYLCV (Morin et al., 1999). Des études approfondies ont montré que la protéine GroEL impliquée dans la transmission est celle produite par le symbionte secondaire, *Hamiltonella defens*. Les homologues de GroEL produits par les autres bactéries endosymbiotiques hébergées dans *B. tabaci* (endosymbiontes primaire et secondaires) n'interagissent pas avec la CP du TYLCV tandis que la protéine GroEL de *H. defens* se lie spécifiquement au TYLCV dans l'hémolymphe, mais pas dans l'intestin moyen ou les glandes salivaires (Gottlieb et al., 2010).

Les *Begomovirus* peuvent avoir soit un génome monopartite soit un génome bipartite constitué d'un ADN-A et un ADN-B. Le TYLCV, et les espèces apparentées, ont un seul composant génomique du type ADN-A d'environ 2,8 kb qui comprend six ORF partiellement chevauchants et en orientation bidirectionnelle (Lazarowitz and Shepherd, 1992). Il existe deux ORF sur le brin sens: l'ORF V1 code pour la CP (protéine de capsid) et l'ORF V2 code pour un suppresseur du silencing (Zrachya et al., 2007). À noter que la CP permet de constituer les particules icosaédriques jumelées caractéristiques des *Geminiviridae*. Quatre ORF sont localisés sur le brin complémentaire: l'ORF C1 code pour une ADN polymérase (Rep), C2 est un activateur de transcription (TrAP), C3 est une protéine favorisant la réplication du génome viral (REn) et C4 est de fonction inconnue. Bien qu'aucune des protéines non structurales n'ait été impliquée dans la transmission, les protéines codées par les ORF V2 et C4, impliquées dans l'expression des symptômes et le mouvement du virus dans la plante, sont susceptibles d'influencer indirectement l'efficacité de la transmission (Jupin et al., 1994; Noris et al., 1998; Wartig et al., 1997). La CP est impliquée à la fois dans le mouvement du virus et dans la transmission par son vecteur. La capsid des *Begomovirus* étant uniquement constituée de CP, cette dernière est la seule protéine virale susceptible d'interagir avec les récepteurs d'insectes ou avec d'autres protéines qui faciliteraient le

passage du virus à travers les tissus de l'insecte. Plusieurs éléments indiquent que la CP serait le seul déterminant de la transmissibilité des *Geminiviridae* par les insectes. En effet, l'échange du gène codant pour la CP de l'*African cassava mosaic virus* (ACMV) transmis par aleurodes avec celui de la CP du *Beet curly top virus* (BCTV) transmis par cicadelles modifie la spécificité de vection du virus recombinant qui devient transmissible par cicadelles (Briddon et al., 1990). De même, le remplacement du gène de la CP du *Abutilon mosaic virus* (AbMV) non transmis par aleurodes par celui du virus du *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), transmis par aleurodes, a généré un virus chimère de AbMV transmis par ce vecteur (Hofer et al., 1997). Les régions des gènes de CP des *Geminiviridae* nécessaires à la transmission du virus par aleurodes et par cicadelles ont de plus été identifiées par une analyse mutationnelle de la séquence de la CP (Azzam et al., 1994; Hohnle et al., 2001; Liu et al., 1997; Liu et al., 1999; Noris et al., 1998; Soto et al., 2005). Ainsi, la région de la CP comprise entre les acides aminés 129 et 152 est essentielle pour l'assemblage des virions, la systémie de l'infection, et la transmission par vecteurs (Noris et al., 1998). Cette même région serait également impliquée dans la transmission d'un virus bipartite, le *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) (Kheyr-Pour et al., 2000) et celle de l'AbMV (Hohnle et al., 2001). De manière intéressante, les mutants de la CP du TYLCV sont acquis par *B. tabaci* et se maintiennent dans le corps de l'insecte pendant 10 jours au même titre que le virus sauvage. Ces virus mutants sont également détectés par immunomarquage de la CP dans les glandes salivaires, mais ne sont pas transmis (Caciagli et al., 2009). Ainsi, dans le cas du TYLCV, la présence des virions dans les cellules des glandes salivaires ne garantirait pas la transmission du virus. Une hypothèse avancée par les auteurs est qu'il existe peut-être des facteurs moléculaires dans les cellules des GSP permettant de maintenir l'ineffectivité des virions. On peut aussi imaginer que le passage des virions au travers de la membrane plasmique apicale se fait pas un mécanisme d'exocytose impliquant la reconnaissance de sites spécifiques de la capsid.

Deux revues récentes documentent la transmission des *Geminiviridae* par insectes (Ghanim, 2014; Rosen et al., 2015).

4) Les *Nanoviridae*

Les *Nanoviridae* se divisent en deux genres, les *Nanovirus* et les *Babuvirus*, dont les virus modèles sont respectivement : le *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV) et le *Banana bunchy top virus* (BBTV). Ce sont des virus à ADN simple brin (ssDNA) circulaire qui répliquent leur génome par un mécanisme de cercle roulant (*rolling circle*). Le génome des *Nanoviridae* est divisé en six ou huit segments. Ces segments de 1 kb sont encapsidés séparément dans une particule virale icosaédrique d'environ 19 nm. Ces segments génomiques codent chacun pour une, voire deux protéines (Gronenborn, 2004). Tous les

membres de cette famille sont transmis par pucerons et la CP est probablement la seule responsable des interactions virus-puceron. Il existe cependant des travaux qui suggèrent qu'une protéine auxiliaire agirait comme un facteur assistant de la transmission pour le passage du FBNYV dans les cellules des glandes salivaires principales (PSG) (Franz et al., 1999). La nature de ce facteur n'a pas encore été élucidée mais ces travaux indiquent que la relation virus-puceron, dans le cas des *Nanovirus*, pourrait être différente, voire plus complexe, qu'on ne le pense.

Les connaissances sur la voie de transport des *Nanoviridae* dans le puceron sont limitées aux études sur le BBTV transmis par le puceron de la banane *Pentalonia nigronervosa*. Bien que ces particules n'aient jamais été directement visualisées par microscopie électronique dans l'insecte, des études utilisant l'immunodétection par fluorescence de la CP du BBTV ont démontré que le virus s'accumule dans l'intestin moyen antérieur avant d'être libéré dans l'hémolymphe d'où il migre jusqu'au GSP (Bressan and Watanabe, 2011; Watanabe and Bressan, 2013). Il n'y a aucune preuve de réplication du virus dans le vecteur (Watanabe and Bressan, 2013; Watanabe et al., 2013). Les cellules principales des glandes salivaires ayant été observées en contact direct avec l'intestin moyen antérieur, les auteurs émettent l'hypothèse que la translocation du virus pourrait aussi se produire par le transfert direct entre les cellules de l'intestin moyen et celles des glandes salivaires (Watanabe and Bressan, 2013).

On pense que les *Nanoviridae* traversent les barrières intestinales et salivaires sous forme de particules virales (Chu and Helms, 1988; Harding et al., 1991; Katul et al., 1993). De manière intéressante, chacun des huit segments composant le génome du virus du FBNSV s'accumule de manière reproductible à une fréquence relative spécifique dans les plantes hôtes infectées ; la fréquence des segments retrouvés définissant ainsi la « formule génomique dans la plante hôte ». Cette formule génomique est totalement différente dans le corps des insectes vecteurs, définissant ainsi la « formule génomique dans l'insecte vecteur ». Sur les segments génomiques des 8 protéines exprimées par le virus, trois ont des proportions relatives très différentes dans les plantes et les vecteurs : deux segments codent pour des protéines de fonction inconnue nommées U1 et U2 et le troisième code pour la protéine N, une protéine navette de transport nucléaire (**Fig. 9**). Cette modification de la formule est retrouvée dans trois espèces de puceron, *A. pisum*, *A. craccivora* et *M. persicae*, et se produit très tôt lors de l'internalisation du virus dans les cellules de l'intestin moyen. Aucune autre modification ne survient ensuite lors du transport des particules virales à travers le corps du puceron. Ces changements de formule génomique suggèrent l'existence de mécanismes d'interactions complexes entre le FBNSV et ses vecteurs.

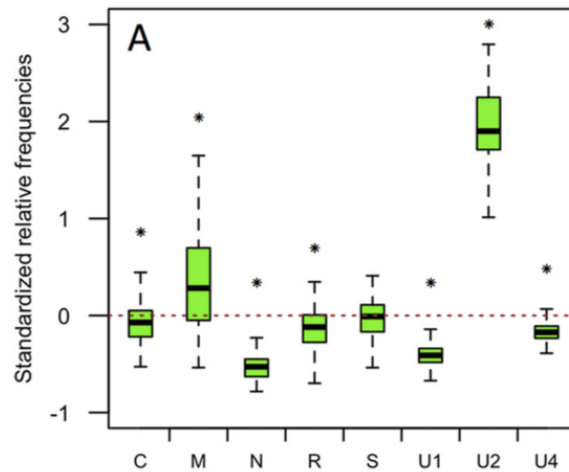


Figure 9 : Fréquence relative des segments du génome du FBNSV dans des pucerons *A. pisum* virulifères et dans des plantes sources. La fréquence relative de chaque segment représentée ici correspond à la fréquence des segments dans l'insecte par rapport à la fréquence retrouvée dans la plante, la ligne rouge représente la « ligne zéro » où la fréquence des segments est égale chez le puceron et dans la plante source. Adapté de (Sicard et al., 2015).

III. Existe-t-il des arbovirus circulants et non multipliants chez les vertébrés ?

La transmission circulante et non multipliante est censée être spécifique des arbovirus des plantes, car elle n'a jamais été formellement identifiée pour aucun arbovirus de vertébré. On peut cependant imaginer que la réplication virale clairement démontrée chez les arbovirus transmis par voie biologique n'empêche pas le passage de certaines particules virales au travers des cellules de l'insecte sans qu'il y ait réplication. De cette manière, un cycle circulant non multipliant pourrait parfois exister pour une fraction de la population de virus ingérés par le vecteur mais ce phénomène pourrait être masqué par la réplication d'une autre fraction de la population. Une illustration intéressante confortant cette hypothèse est l'exemple du *Thogoto virus* (THOV) de la famille des *Orthomyxoviridae* transmis aux ruminants par la tique *Amblyomma variegatum* (Kaufman and Nuttall, 1996). En injectant le THOV directement dans l'hémocoel avec un composé stimulant la salivation, les auteurs ont montré que ce virus peut passer de l'hémolymph aux glandes salivaires et être sécrété dans la salive de la tique par un mécanisme qui est indépendant de la réplication virale. Encore plus surprenant, plusieurs études récentes indiquent que le *Lumpy skin disease virus* (LSDV, *Capripoxvirus*) transmis par la tique *Rhipicephalus spp.* envahit plusieurs organes et persiste au cours du cycle de vie sans qu'aucune réplication ne soit détectée (Lubinga et al., 2014; Lubinga et al., 2015; Tuppurainen et al., 2013; Tuppurainen et al., 2015).

Bien que de telles observations rappellent la transmission circulante non multipliante des

virus végétaux, les auteurs de ces études n'ont pas émis l'hypothèse d'un tel mécanisme. Au contraire, leur discussion s'est axée sur la probabilité d'une réplication virale qui pourrait se dérouler en-dessous du seuil de détection des méthodes utilisées, ce qui n'est pas, non plus, à exclure.

IV. Les arbovirus de plantes circulants multipliants, les vecteurs et les déterminants de leur transmission

1) Généralités

Les insectes vecteurs de ces virus sont les cicadelles, les fulgore, les pucerons et les thrips. Les virus utilisant ce mode de transmission incluent les virus des genres *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, et *Oryzavirus* (*Reoviridae*), *Rhabdovirus* (*Rhabdoviridae*), *Tospovirus* (*Bunyaviridae*), *Tenuivirus* (*Phenuiviridae*) et *Marafivirus* (*Tymoviridae*) (Ammar et al., 2009; Blanc et al., 2014; Hogenhout et al., 2008). Parmi les virus circulants multipliants, les *Phytoreovirus* sont ceux dont la transmission est la mieux caractérisée, et notamment la transmission du *Rice dwarf virus* (RDV).

2) La transmission des *Phytoreovirus*

Comme tous les virus de la famille des *Reoviridae*, le génome du RDV est segmenté. Il est composé de 12 segments d'ARN double brin (dsRNA) codant pour 7 protéines structurales P1, P2, P3, P5, P7, P8 et P9 et 5 protéines non structurales Pns4, Pns6, Pns10, Pns11, et Pns12. Les virions sont des particules à double capsid non enveloppées de 70 nm de diamètre (Boccardo and Milne, 1984; Llida et al., 1972). Le feuillet extérieur de la capsid est composé des protéines P8 et P2. Des études sur des cellules insectes formant des monocouches ont montré que la protéine P2 est responsable de l'attachement des virions à la surface des cellules des vecteurs et que le mécanisme d'entrée des virions dans les cellules est l'endocytose à clathrine (Omura et al., 1998; Wei et al., 2007). De plus, la protéine P2 est impliquée dans la libération du génome viral dans la cellule (Zhou et al., 2007). Les sites d'entrée de ce virus dans la cicadelle sont la chambre filtrante et l'oesophage (Chen et al., 2011b).

Un des phénomènes le plus intéressant concernant les *Phytoreoviridae* est le fait que les virions nouvellement assemblés peuvent s'associer avec des structures tubulaires formées par le biais de protéines non structurales. La protéine Pns10 du RDV, par exemple, permet de rassembler des virions autour d'une structure tubulaire. Ces tubules sont associés à des réseaux d'actine qui leur permettent activement, par l'intermédiaire de protéines motrices (myosine), de pénétrer dans les cellules voisines (Wei et al., 2006; Wei et al., 2008). La

nature protéique de l'actine est de plus un facteur de spécificité de la transmission, puisque ces tubules ne sont pas capables d'interagir avec des protéines d'actine provenant d'insectes non vecteurs (Chen et al., 2015).

Le *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV), un *Reoviridae* du genre *Fijivirus*, forme aussi des structures tubulaires, mais de nature différente puisqu'elles sont constituées de protéines virales P7. De plus, ces tubules ne sont pas impliqués dans le transport des virus des cellules à cellules, mais dans leur passage à travers la membrane basale de l'épithélium intestinal, permettant ainsi de rejoindre l'hémocoel (Liu et al., 2011; Mao et al., 2017).

Enfin, la découverte la plus importante concerne peut-être la protéine Pns11 du *Rice gall dwarf virus* (RGDV, *Phytoreovirus*). Pns11 est l'orthologue de la protéine Pns10 du RDV. Cette protéine induit la formation de structures tubulaires (ou « filamenteuses » pour les auteurs de cette étude) associées au virus. Il a été observé dernièrement que Pns11 est impliquée dans le passage des virus à travers la membrane plasmique des cellules des glandes salivaires de l'insecte vecteur (Mao et al., 2017). En effet, les auteurs ont démontré que les filaments s'attachaient à la membrane plasmique apicale recouverte d'actine et induisaient le mécanisme d'endocytose dans ces cellules, et ce, par une interaction directe entre l'actine et Pns11 (**Fig. 10**). Les auteurs ont de plus observé qu'une inhibition de l'expression de Pns11 par RNAi entraînait une disparition de ces structures filamenteuses, et une inhibition de la transmission du virus. Ils ont ainsi prouvé que les structures filamenteuses induites par les *Phytoreoviridae* permettent à ces virus de traverser la dernière barrière membranaire des glandes salivaires. Ceci représente une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de transmission des arbovirus de plantes.

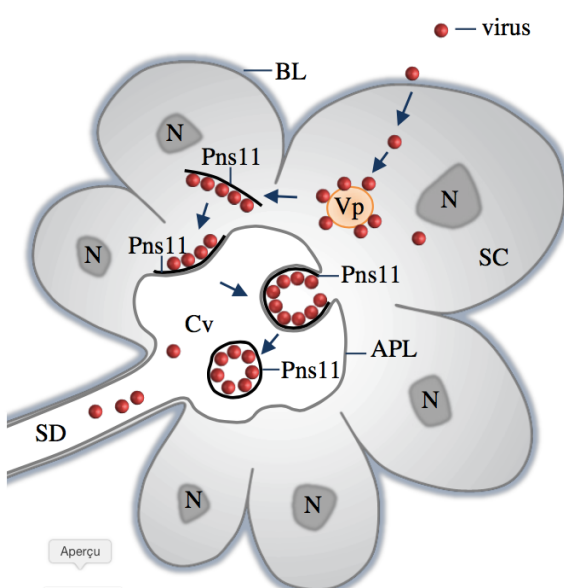


Figure 10 : Modèle proposé pour le transport du RGDV au travers les cellules des glandes salivaires dans le vecteur *R. dorsalis*. Après avoir traversé la lame basale (BL), le virus forme des viroplastes (Vp) à l'intérieur desquels les virions se répliquent et s'assemblent. Les virions sont ensuite libérés dans le cytoplasme des cellules salivaires (SC) et se rassemblent avec l'aide de la protéine Pns11 pour former des structures filamenteuses. Ces structures filamenteuses s'associent avec les protéines d'actine présentes à la surface de la membrane plasmique apicale (APL), ce qui déclenche l'endocytose. Les virions sont alors libérés dans la cavité de la glande salivaire (Cv) et entrent dans les conduits salivaires (SD). N : noyaux. D'après (Mao et al., 2017).

3) La transmission des *Tospovirus*

Les *Tospovirus* sont des membres de la famille *Bunyaviridae*. Le genre *Tospovirus* est le seul genre parmi les *Bunyaviridae* capable d'infecter des plantes (Plyusnin et al., 2012). Les autres genres infectent principalement les mammifères et les insectes, et certains d'entre eux sont des arbovirus infectant les humains (voir le paragraphe sur les arbovirus infectant les vertébrés). Le virus type du genre *Tospovirus* est le *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) transmis par le thrips *Frankliniella occidentalis* (Whitfield et al., 2005). Seuls les insectes ayant acquis le TSWV durant le second stade larvaire sont capables de transmettre le virus, qui n'est d'ailleurs jamais détecté dans l'hémocoel de l'insecte. On suppose ainsi que le virus passe directement du tube digestif dans les cellules des glandes salivaires, qui se retrouvent en contact avec les cellules du tube digestif dans le premier stade larvaire de l'insecte (Astúa, 2012; Kritzman et al., 2002; Moritz et al., 2004). Les particules virales formées par ces virus sont enveloppées et contiennent un génome segmenté en 3 ARN simple brin de polarité négative associés à plusieurs protéines de nucléocapside N (Whitfield et al., 2005). À noter qu'ils ne forment pas de structures tubulaires comme les *Reoviridae* dans les cellules des thrips. L'enveloppe de ces virus contient deux glycoprotéines codées par le virus, nommées Gn et Gc (n et c se rapportent à la position des protéines dans la protéine précurseur). Plusieurs études ont démontré l'importance de ces glycoprotéines de surface pour l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules intestinales des thrips (Nagata et al., 2000; Sin et al., 2005; Whitfield et al., 2015; Whitfield et al., 2008; Whitfield et al., 2004). Deux études de séquençage des mRNA ont montré qu'il existe des réponses transcriptionnelles spécifiques lors de l'infection des vecteurs *F. occidentalis* et *F. fusca* par le TSWV (Schneweis et al., 2017; Shrestha et al., 2017). Ces réponses transcriptionnelles varient selon le stade de développement des insectes, et les gènes identifiés comme surexprimés sont notamment associés au transport intracellulaire, à la réplication virale, et à la réponse immunitaire. Ces données apporteront peut-être des pistes pour comprendre les mécanismes permettant aux *Tospovirus* de persister et de se répandre dans leurs hôtes.

4) La transmission des *Rhabdoviridae*

Les *Rhabdoviridae* sont des virus enveloppés à ARN de polarité négative qui infectent des hôtes très divers. Plus de 160 espèces de *Rhabdovirus* ont été décrites, dont beaucoup représentent une menace pour la santé animale, humaine et végétale (Fu, 2005; Jackson et al., 2008). La famille des *Rhabdoviridae* comprend six genres, dont les genres *Nucleorhabdovirus* et *Cytorhabdovirus*, qui infectent les plantes et sont transmis par pucerons, cicadelles et fulgures. Le génome monocistronique de ces virus code pour 5 protéines appelées N, P, M, G et L. La protéine N code pour la protéine de nucléocapside ; la protéine P code pour une phosphoprotéine ; la protéine M code pour une protéine de

matrice impliquée dans le bourgeonnement du virus ; la protéine G code pour une glycoprotéine et la protéine L code pour l'ARN polymérase ARN-dépendante (Luo et al., 2007). L'enveloppe lipidique des *Rhabdoviridae* provient de la membrane cytoplasmique. Sur la base d'études d'infectivité de monocouches de cellules d'insectes, les rhabdovirus animaux et végétaux sont supposés entrer dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen par endocytose médiée par récepteurs (Jackson et al., 2005). Cependant, aucune démonstration *in vivo* n'a pour l'instant été apportée. On sait cependant que la fusion membranaire des *Rhabdoviridae* requiert la présence d'une protéine de fusion à la surface des virions, la protéine G qui appartient à une nouvelle classe de protéine de fusion, la classe 3. Cette protéine est indispensable à l'accrochage du virus aux récepteurs de l'intestin et de la chambre filtrante ainsi que pour l'initiation de la fusion des membranes (Da Poian et al., 2005). Cette glycoprotéine possède des régions hydrophobes, appelées domaines de fusion, qui s'insèrent dans la membrane plasmique de la cellule hôte et initient la fusion des bicouches lipidiques du virus et de la cellule. Le domaine de fusion de la protéine G se compose de deux coudes séparés spatialement (Roche et al., 2006). L'importance fonctionnelle de ces coudes dans la fusion membranaire a été confirmée par une analyse mutationnelle, et ce motif structural est conservé chez les membres de la famille des *Rhabdoviridae* infectant les plantes ou les animaux (Sun et al., 2008). La protéine G peut prendre trois états différents : l'état natif à pH neutre, l'état hydrophobe activé qui se produit lors de l'interaction avec les membranes cellulaires ou en condition de faible pH, et la conformation inactivée suite à la fusion membranaire. Ces changements de conformation sont réversibles même après l'interaction avec la membrane, ce qui est une spécificité de ces protéines (Gaudin et al., 1993; Gaudin et al., 1999). Les études sur l'entrée des *Rhabdoviridae* non transmis par insectes et infectant les vertébrés ont permis d'identifier plusieurs récepteurs au niveau des cellules animales, notamment des glycolipides tels que les gangliosides ou les molécules de phosphatidyl inositol (Gaudin et al., 1999; Superti et al., 1986). A l'inverse, les données concernant les *Rhabdoviridae* infectant les plantes sont plus rares. Ces derniers infectent un vaste panel de tissus chez les insectes, et il est possible qu'une ou plusieurs molécules ubiquitaires fonctionnent comme récepteur viral. Le *Vesicular stomatis virus* (VSV, *Rhabdoviridae*) est un arbovirus de vertébrés capable d'infecter et de se répliquer dans le fulgore *P. maidis*, ce qui montre bien qu'un ou plusieurs récepteurs viraux sont communs entre ces différents hôtes (Lastra and Esparza, 1976).

Si plusieurs déterminants viraux de la transmission des virus circulants multipliants ont donc été identifiés, aucune protéine issue des insectes vecteurs n'a pu être reliée de façon certaine à la transmission de ces virus (**Table 2**).

Famille	Genre	Virus cités	Insectes vecteurs	Protéines virales impliquées dans la transmission	Sites d'entrée du virus	Protéines du vecteur impliquées dans la transmission
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>	thrips	G _n	intestin moyen	
<i>Reoviridae</i>	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Rice dwarf virus (RDV)</i>	cicadelle	P2	intestin moyen chambre filtrante	actine
		<i>Rice gall dwarf virus (RGDV)</i>		Pns10 (mouvement cellules à cellules) Pns11		
	<i>Fijivirus</i>	<i>Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV)</i>	fulgore	P2 P7	intestin moyen	
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Maize mosaic virus (MMV)</i>	puceron cicadelle fulgore	G	intestin moyen	

Table 2 : Les virus circulants multipliants : famille, genre, insectes vecteurs, site d'entrée, protéines virales et protéines du vecteur impliquées dans la transmission. Liste non exhaustive ne comprenant que les virus cités dans ce manuscrit.

V. Analogies avec les arbovirus vertébrés transmis de manière biologique

Presque tous les arbovirus animaux transmis de manière biologique sont des virus à ARN. On retrouve parmi ces virus les genres *Alphavirus* (famille *Togaviridae*), *Flavivirus* (famille *Flaviviridae*), *Bunyavirus* (famille *Bunyaviridae*), *Nairovirus* (famille *Bunyaviridae*), *Phlebovirus* (famille *Bunyaviridae*), les *Orbivirus* (famille des *Reoviridae*), *Vesiculovirus* (famille des *Rhabdoviridae*) et *Thogotovirus* (famille *Orthomyxoviridae*) (Weaver and Reisen, 2010). L'organisation des génomes et les stratégies de réplication de ces virus sont très diverses, ce qui suggère que la stratégie de transmission des virus par arthropodes hématophages a émergé plusieurs fois au cours de l'évolution des virus à ARN.

Parmi les virus dont les dégâts sur la population humaine sont les plus importants, on retrouve le virus de la dengue (*Dengue virus*, DENV, *Flavivirus*). On estime qu'il existe entre 100 et 390 millions d'individus infectés chaque année par ce virus à travers le monde, provoquant jusqu'à 96 millions d'infections symptomatiques et environ 21000 décès par an,

principalement chez les enfants (Bhatt et al., 2013; Guzman et al., 2010). Le virus de la dengue est transmis par les moustiques des espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Ces espèces de moustiques se répandent dans le monde entier en raison de divers facteurs dont les principaux sont la mondialisation et le réchauffement climatique (Kilpatrick and Randolph, 2012). Les épidémies de DENV sont fréquentes dans les zones en voies de développement, des régions qui incluent 2,5 milliards d'individus (environ 35% de la population mondiale), un fléau qui s'ajoute à la détresse économique de ces populations (Guzman et al., 2010). Il existe quatre sérotypes de DENV, nommés DENV-1 à DENV-4, ce qui complexifie les recherches sur les interactions entre le virus et les cellules hôtes. Le cycle infectieux du DENV débute avec l'interaction entre des protéines structurales et des molécules présentes à la surface de la cellule, qui sont potentiellement des molécules d'attachement ou des récepteurs d'endocytose. Après l'internalisation du virus, la libération du génome viral dans le cytoplasme est médiée par la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale. Le génome viral est un ARN simple brin de polarité positive. La particule virale du DENV mesure 50 nm de diamètre et est entourée d'une enveloppe lipidique à laquelle sont associées deux protéines structurales, la protéine de membrane (M) et la protéine d'enveloppe E (Mukhopadhyay et al., 2005; Perera and Kuhn, 2008). L'enveloppe abrite le génome qui forme des complexes ribonucléoprotéiques avec la troisième protéine structurale du DENV, la protéine de capsid (C) (Freire et al., 2013; Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2003a). La protéine E du DENV est une protéine de 53 kDa ancrée dans l'enveloppe virale grâce à deux hélices transmembranaires antiparallèles situées à l'extrémité C-terminale de la protéine (Zhang et al., 2013b; Zhang et al., 2003b). La structure cristallographique de l'ectodomaine de la protéine E a révélé trois domaines : DI, DII et DIII (Modis et al., 2005; Modis et al., 2003, 2004) (**Fig. 11**).

Plusieurs éléments suggèrent que le, ou les sites de liaison au récepteur se trouvent au niveau du domaine DIII de la protéine E. Les anticorps ciblant le domaine DIII bloquent efficacement l'attachement aux cellules Vero (lignée humaine) (Crill and Roehrig, 2001). De plus, des protéines recombinantes portant le domaine DIII sont capables de s'attacher aux cellules BHK-21, HepG2, C6 et C36 d'*A. albopictus* (Chin et al., 2007; Hung et al., 2004), bloquant ainsi l'attachement du virus à ces cellules. Aucun récepteur du DENV n'a pour le moment été définitivement identifié (Hidari and Suzuki, 2011). Cependant, un certain nombre de candidats de nature distincte chez les mammifères et les moustiques ont émergé. Le candidat le plus étudié, en tant que récepteur potentiel du DENV chez le moustique est la prohibitine, une protéine de 35 kDa. Des expériences de Far-western blot ont montré que cette protéine interagit *in vitro* avec le DENV-2. Le traitement des cellules d'insectes avec des anticorps anti-prohibitine, ainsi que l'inhibition de l'expression du gène par ARN interférence, entraînent une diminution de la réplication du DENV. De plus,

l'interaction spécifique de la prohibitine avec la protéine E a été démontrée par des expériences d'immunoprécipitation et de colocalisation en microscopie (Kuadkitkan et al., 2010). Mis à part la prohibitine, plusieurs protéines candidates ont été identifiées chez le moustique, mais elles ne sont que très peu caractérisées pour le moment (**Table 3**).

Diverses protéines ont été identifiées comme récepteurs potentiels du DENV chez l'humain parmi lesquelles des glycosaminoglycanes, comme l'héparane sulfate, la molécule d'adhésion des cellules dendritiques (DC-SIGN), le récepteur du mannose (MR) des macrophages, le récepteur du lipopolysaccharide (LPS), CD14 et des protéines induites par le stress (**Table 4**). Des sites de fixation à certains récepteurs ont pu être identifiés par mutagénèse sur la protéine E du DENV (Johnson et al., 1994; Pokidysheva et al., 2006; Watterson et al., 2012) (**Fig. 11**).

Ces données suggèrent que le DENV n'utilise pas un récepteur unique et spécifique pour son entrée dans la cellule, mais reconnaît, et se lie, à diverses molécules, qui dépendent possiblement du sérotype. Cela peut s'expliquer par le fait qu'une fois à l'intérieur des organismes hôtes, le virus est capable d'infecter une grande variété de types cellulaires. Ainsi, il n'est pas surprenant que le DENV puisse se lier à un vaste panel de molécules. La quête du récepteur du DENV suggère que le virus aurait pu évoluer et ne serait pas « cellule » ou un « organe » spécifique. Cette large diffusion non spécifique du virus dans l'organisme hôte, serait responsable de la gamme très vaste de manifestations de la maladie chez les patients atteints par le DENV (Rico-Hesse, 2010).

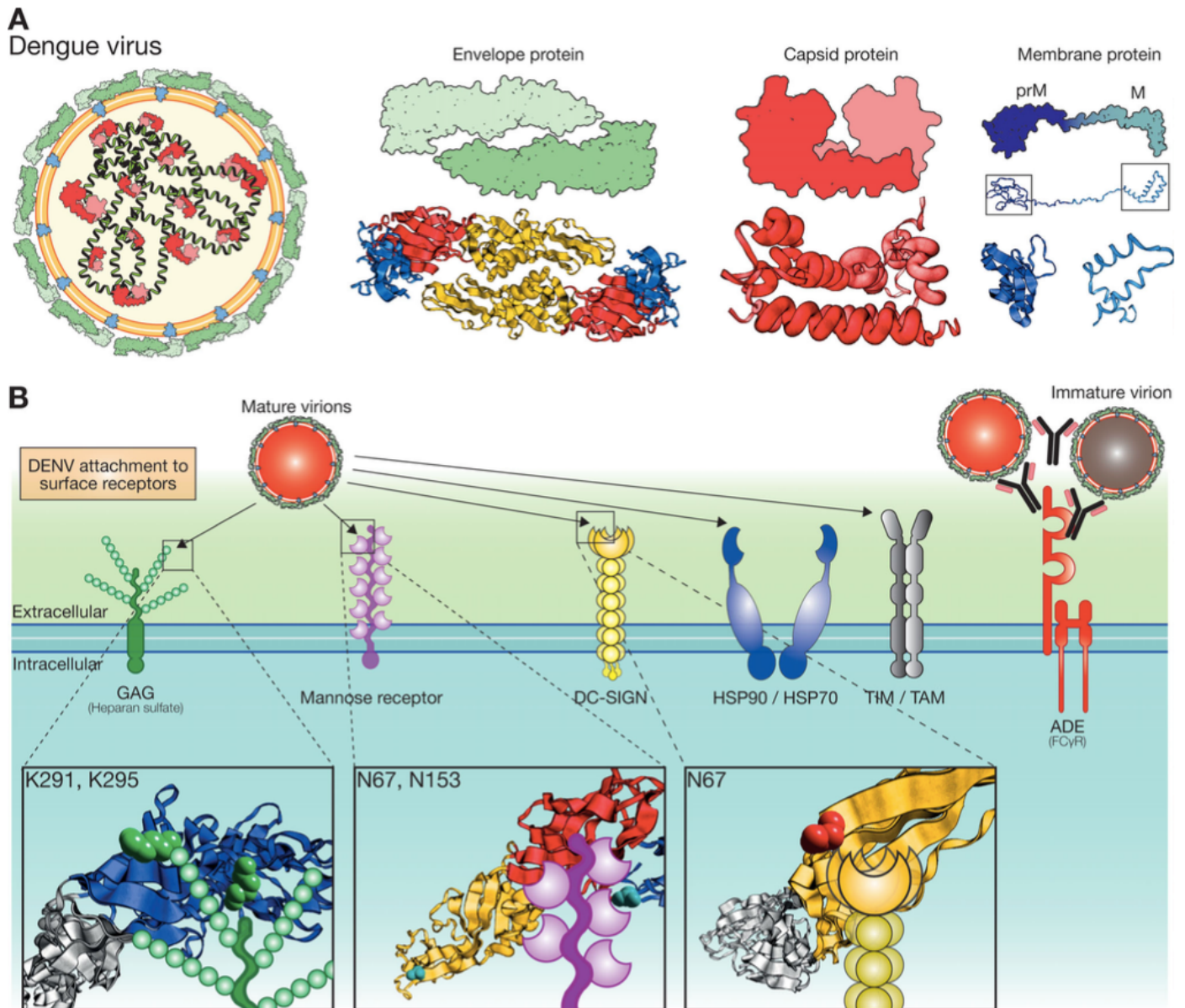


Figure 11 : Organisation de la particule du DENV et les récepteurs putatifs pour l'entrée du virus. (A) Représentation schématique de la particule virale du DENV composée d'une enveloppe lipidique (en orange) associée à des homodimères de protéines d'enveloppe (E) (en vert) et à la protéine membranaire (M) (en bleu). Ces composants entourent la nucléocapside formée de l'ARN génomique associé aux protéines de capsid (C) (en rouge). (B) Représentation de quelques molécules d'attachement potentiellement impliquées dans la reconnaissance/fixation du DENV à la surface des cellules humaines. Certains acides aminés de la protéine E impliqués dans l'interaction avec les récepteurs d'attachement ont été identifiés et sont représentés dans les encarts du bas. D'après (Cruz-Oliveira et al., 2015)

Concernant la voie d'entrée du virus, les études montrent que l'internalisation de DENV-2 se produit par endocytose dépendante de la clathrine dans les cellules de mammifères ou d'insectes. Cependant, selon l'hôte et le sérotype, d'autres voies d'entrées peuvent être employées (**Table 5**). Par exemple, lors de l'infection *in vitro* des cellules Vero (humaines) par le DENV2, le virus pénètre dans les cellules en empruntant une voie d'endocytose non classique dépendante de la dynamine, et n'impliquant ni la clathrine, ni les cavéoles, ni les radeaux lipidiques (Acosta et al., 2009). Lors de l'infection de ces mêmes cellules par le DENV1, la voie classique de l'endocytose à clathrine est empruntée par le virus.

Faute d'avoir pu identifier les récepteurs de ces virus, et de développer des méthodes de lutte permettant de les bloquer, d'autres alternatives sont actuellement à l'étude. Par exemple, des laboratoires recherchent les facteurs qui permettent à certaines espèces de moustiques non vectrices de résister à l'infection par le DENV, afin de pouvoir effectuer du remplacement de population à l'aide de ces moustiques résistants.

Molecule	Type	Cells and tissues	Serotype	Reference(s)
Prohibitin	Protein	C6/36 CCL-125	DENV 2	Kuadkitkan et al. (2010)
40 and 45 kDa	Glycoprotein	C6/36 cells Diverse mosquito tissues	DENV 4	Salas-Benito and del Angel (1997) Yazi Mendoza et al. (2002) Reyes-del Valle and del Angel (2004)
50 kDa	Protein		DENV 2, 3 and 4	Sakoonwatanyoo et al. (2006)
67 (enolase) and 80 kDa	Protein	C6/36 <i>A. aegypti</i> midguts	DENV 1, 2, 3 and 4	Munoz et al. (1998) Mercado-Curiel et al. (2006) Mercado-Curiel et al. (2008) Munoz Mde et al. (2013)
77, 58, 54 and 37 kDa	Unknown	<i>A. aegypti</i> salivary glands	DENV 1, 2, 3 and 4	Cao-Lormeau (2009)
67, 56, 54, 50 and 48 kDa	Unknown	<i>A. polynesiensis</i> salivary glands	DENV 1 and 4	Cao-Lormeau (2009)

Table 3 : Récepteurs potentiels du DENV chez le moustique (Cruz-Oliveira et al., 2015)

Molecule	Type	Cells	Serotype	Reference(s)
Heparan sulfate	GAG	Vero CHO K1	DENV 2	Chen et al. (1997)
nLc4Cer (Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer)	Glyco-sphingolipid	K562 BHK-21	DENV 2	Aoki et al. (2006) Wichit et al. (2011)
DC-SIGN	C-type lectin	THP-1 Monocyte-derived dendritic cells	DENV 1, 2, 3 and 4	Navarro-Sanchez et al. (2003) Tassaneetrithep et al. (2003)
CD14	Protein	Monocytes/macrophages	DENV 2	Chen et al. (1999)
HSP90 HSP70	Protein	U937 SK-SY-5Y Monocyte-derived macrophages	DENV 2	Chen et al. (1999) Reyes-Del Valle et al. (2005)
Mannose receptor	Protein	NIH3T3 Monocytes Macrophages	DENV 1, 2, 3 and 4	Miller et al. (2008)
GRP78	Protein	HepG2	DENV 2	Jindadamrongwech et al. (2004) Upanan et al. (2008)
High-affinity laminin receptor	Protein	HepG2 PS Clone D	DENV 1, 2 and 3	Thepparit and Smith (2004) Tio et al. (2005)
TIM-1	Protein	A549 Huh7 5.1 Vero	DENV2 and 3	Meertens et al. (2012)
AXL	Protein	A549 Vero Human primary kidney epithelial cells Human primary astrocytes	DENV2 and/or DENV3	Meertens et al. (2012)
Claudin-1	Protein	Huh-7 Huh 7.5	DENV 2	Gao et al. (2010) Che et al. (2013)
65 kDa	Protein	N1E-115 SK-NSH	DENV-2	Ramos-Castaneda et al. (1997)
44 and 74 kDa	Protein	Vero	DENV-4	Martinez-Barragan and del Angel (2001)
29, 34 and 43 kDa	Unknown	ECV304	DENV-2	Wei et al. (2003)
Diverse	Protein	HepG2	DENV 2, 3 and 4	Jindadamrongwech and Smith (2004)

Table 4 : Récepteurs potentiels du DENV chez l'homme (Cruz-Oliveira et al., 2015)

Target cell	Serotype	Cell used for virus propagation	Endocytic pathway	Endocytic trafficking	Reference(s)
C6/36	DENV2	C6/36	Clathrin-dependent	Early endosomes	Acosta et al. (2008)
Vero	DENV2	C6/36	Non-classical dynamin-dependent (clathrin, caveolae and lipid raft-independent)	Early to acid lysosomes Early to late endosomes (DENV 2 strain 16681)	Mosso et al. (2008) Acosta et al. (2009, 2012, 2014)
	DENV 1	Vero C6/36	Clathrin-dependent	Early endosomes to recycling endosomes (DENV 2 strain NGC) N.D. Early endosomes to recycling endosomes (DENV 1 strain HW)	
A549	DENV2	C6/36	Clathrin-dependent	N.D.	Acosta et al. (2009)
HeLa	DENV2	C6/36	Clathrin- dependent	Early endosomes (strain NGC) Early to late endosomes (strain PR159 S1)	Krishnan et al. (2007) and Van der Schaar et al. (2008)
Huh 7	DENV2 DENV1, 3 and 4	C6/36	Clathrin-dependent	Early to late endosomes N.D.	Ang et al. (2010)
HepG2	DENV2	C6/36 or Vero	Clathrin-dependent	N.D.	Alhoot et al. (2012) and Suksanpaisan et al. (2009)
	DENV1, 3 and 4 DENV1, 2, 3 and 4	Vero	Macropinocytosis	N.D.	Suksanpaisan et al. (2009)
BS-C-1	DENV2	C6/36	Clathrin-dependent	Early to late endosomes	Van der Schaar et al. (2008)

Table 5 : Voies d'entrée du DENV dans les cellules humaines ou de moustique (Cruz-Oliveira et al., 2015)

VI. Les arbovirus de plantes non circulants, les vecteurs et déterminants de la transmission

1) Généralités

Les premières études sur la transmission de virus végétaux ont identifié, il y a 53 ans, la pointe du stylet des insectes vecteurs comme site d'attachement et de rétention des virus (Bradley, 1964). Ces premiers virus observés étaient des virus non circulants, qui sont localisés soit au niveau du stylet, soit au niveau de l'œsophage (Blanc et al., 2014). Contrairement aux virus des vertébrés, les virus de plantes sont majoritairement transmis de manière non circulante, et une littérature abondante est disponible sur ce sujet. Après avoir mesuré l'efficacité de transmission de différentes combinaisons de couples virus/vecteurs, l'hypothèse de l'existence d'interactions spécifiques entre ces virus et des récepteurs potentiels au niveau des pièces buccales des insectes vecteurs a été émise (Gardner et al., 1981; Sako et al., 1984). Depuis, toutes les études de transmission des virus de plantes (que ce soit de manière circulante ou non circulante) ont confirmé le degré relatif de spécificité entre les virus et les vecteurs, ce qui démarque les arbovirus de plantes des

arbovirus d'animaux. Ces derniers peuvent, en effet, être transmis de façon complètement aspécifique selon le mode de la transmission mécanique (voir paragraphe suivant, « analogie avec la transmission mécanique des arbovirus de vertébrés »).

Il est à noter que les virus non-circulants sont notamment transmis lors des piqûres d'épreuve et sont classés en deux catégories, les non persistants et les semi-persistants. Ces deux catégories diffèrent d'une part par le site de rétention du virus dans l'insecte et d'autre part par leurs temps d'acquisition et de rétention (période pendant laquelle le vecteur reste virulifère) (**Table 6**).

Ainsi, lors de la transmission des virus non circulants non persistants, le virus est acquis sur une plante infectée en quelques secondes et doit être très rapidement inoculé à un nouvel hôte, car sa période de rétention dans le vecteur est très courte. Le site de rétention de ces virus est localisé au niveau du stylet. Les virus décrits comme semi-persistants ont eus des périodes d'acquisition et d'inoculation de plusieurs minutes à plusieurs heures. Le site de rétention de ces virus est suspecté être localisé au niveau de l'oesophage (Herrbach et al., 2013). Cependant, l'identification récente du site de rétention du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, virus semi-persistant) à l'extrémité des stylets, ainsi que l'identification récente du site de rétention du *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV, *Closteroviridae*, virus non-persistant) au niveau de l'oesophage (Chen et al., 2011a) pourrait faire évoluer la nomenclature en faveur des termes « virus du stylet » (stylet-borne) et « virus de l'oesophage » (foregut-borne).

Pathogènes	Non circulants	
	Non persistant	Semi-persistant
Mode		
Durées d'acquisition et d'inoculation	Secondes à minutes	Minutes à heures
Lieu d'acquisition	Épiderme	Phloème
Durée de latence	Aucune	Aucune
Durée de rétention	Minutes à heures	Heures à jours
Passage transstadial	Non	Non
Multiplication	Non	Non
Passage transovarier et/ou vénérien	Non	Non
Spécificité vectrice	Large	Étroite

Table 6 : Paramètres de la transmission des virus dits non persistants et semi-persistants (Herrbach et al., 2013).

Il existe une autre façon de classer les virus non-circulants qui est basée sur le mécanisme qui permet la rétention des particules virales dans l'insecte (**Table 7**). Deux « stratégies » ont été identifiées pour la transmission non circulante : la stratégie « capsid » et la stratégie « facteur assistant » (Blanc et al., 2014; Bragard et al., 2013; Ng and Falk, 2006; Whitfield et al., 2015). Ces stratégies sont particulièrement bien décrites dans la littérature par l'étude des interactions *Cucumovirus*/puceron pour la stratégie capsid, et les interactions *Potyvirus*/puceron et *Caulimovirus*/puceron pour la stratégie facteur assistant (Blanc et al., 2014; Ng and Falk, 2006). Le prochain paragraphe illustrera en détail ces différentes stratégies de la transmission.

Stratégie de transmission	Famille	Genre	Virus cités	Insectes vecteurs	Protéines virales impliquées dans la transmission	Site d'accrochage du virus
Stratégie "capsid"	<i>Closteroviridae</i>	<i>Crinivirus</i>	<i>Lettuce infectious yellows virus (LIYV)</i>	aleurode	Minor CP	oesophage
	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>	puceron	CP	stylet
Stratégie "facteur assistant"	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus (CaMV)</i>	puceron	CP P3 HC	stylet
	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y (PVY)</i>	puceron	HC-pro	stylet

Table 7 : Les virus non circulants: stratégie de transmission, famille, genre, insectes vecteurs, site d'accrochage et protéines virales impliquées dans la transmission. Liste non exhaustive ne comprenant que les virus cités dans ce manuscrit.

2) Illustration de la stratégie de transmission « capsid » des virus non circulants : cas du *Cucumber mosaic virus*

Le virus du *Cucumber mosaic virus* (CMV), virus type du genre *Cucumovirus*, fait partie des virus utilisant la stratégie de la capsid pour sa transmission par puceron. Le CMV est un virus à ARN simple brin de polarité positive dont le génome est fragmenté en 3 segments (Palukaitis et al., 1992). Les ARN 1 et 2 codent chacun pour une protéine liée à la réplication (Hayes and Buck, 1990). L'ARN 2 code également pour la protéine appelée 2b qui influence

la virulence et fonctionne comme un suppresseur de silencing (Gonzalez et al., 2010). Cette protéine 2b, en plus d'agir comme un suppresseur des défenses antivirales de l'ARN interférence, inhibe la réponse de la plante à l'acide jasmonique, une molécule de signalisation intervenant dans la défense des plantes contre les insectes. La survie et le temps d'alimentation des pucerons sur les tabacs infectés par le CMV sont ainsi améliorés, ce qui permettrait indirectement de favoriser la transmission virale (Ziebell et al., 2011). Les modifications de la réponse à l'acide jasmonique par la protéine 2b permettent aussi de rendre la plante plus attractive pour les insectes vecteurs, favorisant ainsi la dispersion du virus (Wu et al., 2017). L'ARN 3 code pour deux protéines, la protéine 3a impliquée dans le mouvement de cellule à cellule du virus, et la protéine de capsid CP qui est multifonctionnelle. En plus d'avoir un rôle dans l'encapsidation, la CP affecte le mouvement du virus dans les plantes (Kaplan et al., 1998; Suzuki et al., 1991), la transmission, l'expression des symptômes et la spécificité d'hôte (Shintaku and Palukaitis, 1990). Les virions du CMV possèdent une symétrie icosaédrique et se composent de 180 exemplaires de CP. Cette protéine contient des domaines en feuillets β chargés négativement dont l'exposition à la surface de la capsid est nécessaire et suffisante pour obtenir une transmission efficace du virus par pucerons (Liu et al., 2002). C'est cette qualité intrinsèque de la protéine de capsid qui est responsable de la transmission, ce qui a défini le terme de la « stratégie capsid » (**Fig. 12**). Aucune molécule d'attachement du virion au niveau de la cuticule du puceron n'a été identifiée pour le moment.

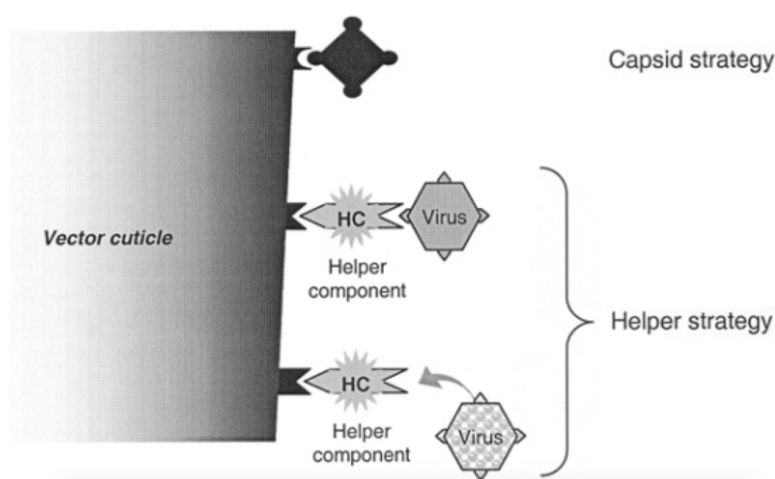


Figure 12 : La stratégie capsid et la stratégie facteur assistant des virus non circulants. Les deux stratégies permettent la rétention des particules virales au niveau de récepteurs localisés à la surface cuticulaire du tractus alimentaire de l'insecte. Dans la stratégie capsid, la particule virale est capable de se lier directement aux récepteurs dans le vecteur, tandis que dans la stratégie facteur assistant, la liaison virus-vecteur est médiée par une protéine non structurale codée par le virus, le facteur assistant (HC), qui crée un « pont moléculaire » entre le virus et le récepteur (Froissart et al., 2002).

3) Illustration de la transmission par la stratégie « facteur assistant » des virus non persistants : cas des *Potyvirus* et des *Caulimovirus*

Dans la stratégie facteur assistant, la liaison virus-récepteur est médiée par des protéines virales supplémentaires appelées «facteurs assistants» (*helper components*, HC) (**Fig. 12**). Ces facteurs assistants ont été suspectés après avoir observé que des particules virales perdaient leur capacité à être transmises lorsqu'elles étaient purifiées (Pirone and Megahed, 1966). Ceci sous-tendait qu'un facteur présent dans les plantes infectées, et non associé aux virions de manière permanente, était perdu lors des étapes de la purification. Les cas les plus représentatifs des virus adoptant cette stratégie sont ceux du genre *Potyvirus*, tel le *Potato virus Y* (PVY) où la protéine HC est la protéine HC-Pro (pour Helper component-proteinase) et ceux du genre *Caulimovirus* où la protéine assistante est la protéine P2. HC-Pro est une protéine multifonctionnelle qui assure un rôle dans le mouvement des virus mais aussi la fonction de supprimeur de silencing (Anandalakshmi et al., 1998; Brigneti et al., 1998; Kasschau and Carrington, 1998). Elle est une des 3 protéases codées par le génome du PVY (Carrington et al., 1989a; Carrington et al., 1989b). Le génome du PVY, constitué d'une molécule d'ARN simple brin de 9,7 kb et de polarité positive, ne contient qu'une seule ORF qui produit une polyprotéine. Les 3 protéases virales, P1-Pro, HC-Pro et Nia-Pro permettent la libération de 9 protéines. La protéine HC-pro joue un rôle primordial dans la transmission des *Potyvirus* par puceron, car elle possède d'une part un motif KITC (Lysine-Isoleucine-Thréonine-Cystéine) en N-terminal (Granier et al., 1993; Thornbury et al., 1990) capable de se fixer sur un site cuticulaire dans le stylet du puceron, et d'autre part un site PTK (proline-thréonine-lysine) situé au milieu de la protéine (Huet et al., 1994) capable de se lier au domaine DAG (DTV DAGK) localisé en N-terminal de la CP des *Potyvirus* (Allison et al., 1985; Dougherty et al., 1985). Ces données montrent bien que la protéine HC-Pro agit comme un pont moléculaire entre la capsid du virus et le stylet de l'insecte.

Chez les *Caulimoviridae*, le model est assez similaire, tout en étant plus complexe. Le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), le membre type de la famille des *Caulimoviridae*, est un des virus non circulants dont la transmission est la plus documentée. Il possède un génome composé d'une molécule d'ADN double brin circulaire de 8 kb comprenant sept ORF. Seules les fonctions biologiques des produits de 6 de ces ORF ont clairement été identifiées. La protéine P1, la protéine P5 et la protéine P6 n'ont pas de rôles connus dans la transmission et sont respectivement une protéine de mouvement, la transcriptase inverse indispensable à la réplication du virus, un supprimeur de silencing impliqué dans la régulation du cycle infectieux. Les protéines P2, P3 et P4 sont, quant à elles, impliquées dans la transmission. La protéine P4 est la protéine de capsid, et l'assemblage de 420 sous-unités de cette protéine permet de composer la capsid icosaédrique du CaMV. La protéine P2 a été identifiée

comme étant la protéine HC du CaMV (Blanc et al., 1993; Woolston et al., 1987), et est indispensable pour la transmission virale. La région N-terminal de HC est probablement le site de liaison du complexe viral au site cuticulaire du puceron, étant donné que des substitutions d'un seul acide aminé dans cette région sont capables de modifier la spécificité de vection (Moreno et al., 2005). Cependant, contrairement au genre *Potyvirus*, les interactions entre la protéine de capsid et la protéine HC ne sont pas suffisantes pour permettre une transmission du virus. En effet, l'acquisition par puceron de la protéine HC purifiée ne permet pas de compléter la transmission de virions purifiés (Blanc et al., 1993). L'interaction avec une autre protéine codée par le virus, la P3, est nécessaire. La transmission du CaMV purifié est rendue possible lorsque les pucerons sont préalablement alimentés avec une solution contenant les protéines P2 et P3 purifiées. Il a ainsi été conclu que ces trois partenaires sont nécessaires et suffisants pour former le complexe transmissible du CaMV (Leh et al., 1999). Des études de cryo-microscopie combinées à des reconstitutions tridimensionnelles *in silico* ont permis de montrer que les protéines P3 sont ancrées dans la capsid sous forme de trimères via leurs extrémités C-terminales, permettant aux extrémités N-terminales qui émergent de la capsid d'interagir avec les protéines P2 (Plisson et al., 2005) (**Fig. 13**). L'extrémité C-terminale de P2 est formée de deux hélices α . Ces deux hélices sont séparées par une tige-boucle et permettent l'association avec le domaine N-terminal de la P3 (Leh et al., 1999) par des interactions de type super-hélice (Leclerc et al., 1998).

Cependant, avant que le complexe P4-P3-P2 ne soit formé et retenu au niveau de la cuticule du puceron, une étape primordiale et complexe a lieu lors de l'acquisition du CaMV par le puceron. Cette étape s'appelle l'« activation de la transmission ».

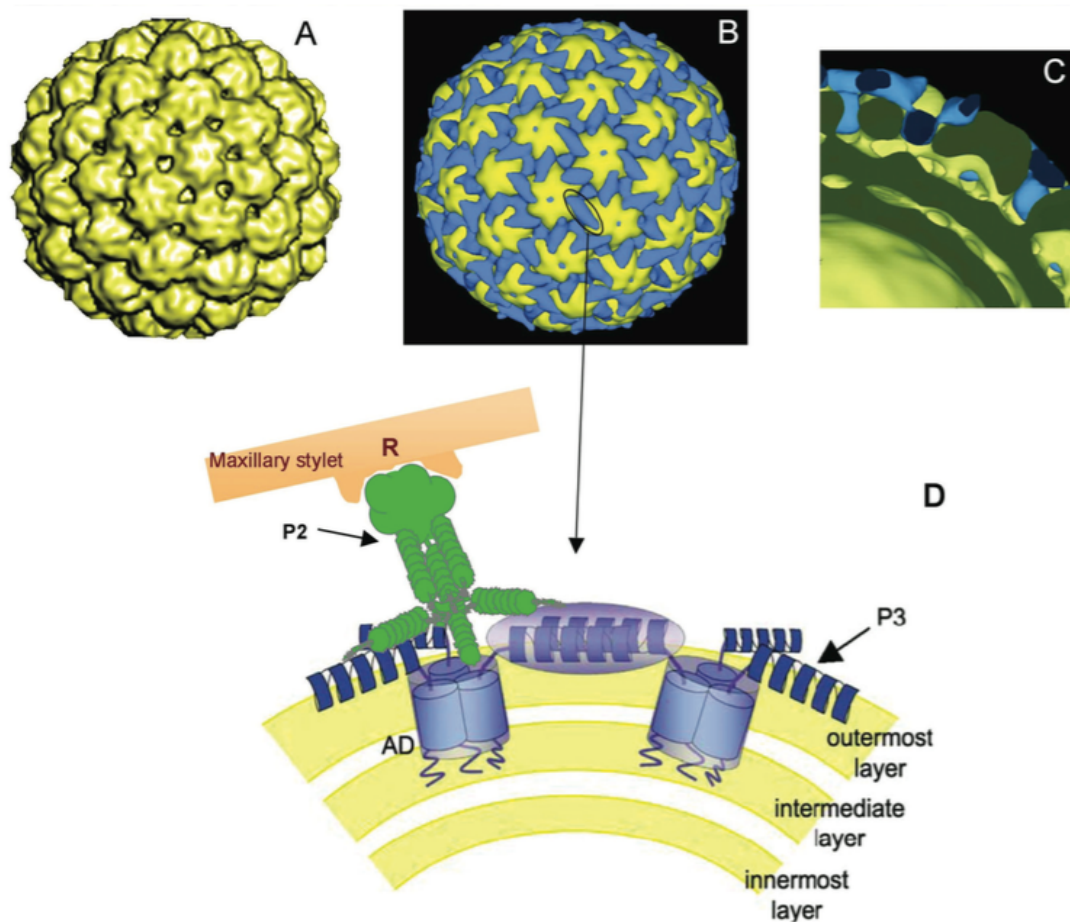


Figure 13 : Structure du complexe transmissible du CaMV. Reconstruction tridimensionnelle du CaMV (A) et des complexes CaMV-P3 (B) à une résolution de 26-Å. La protéine P3 (en bleu) est organisée en un réseau régulier autour de la capside (constituée de protéines de capside P4, en jaune). Une vue en coupe (C) permet de montrer la protéine P3 ancrée dans la capside. (D) Représentation schématique de l'interaction des trois composants du complexe transmissible du CaMV. La capside virale est composée de trois couches concentriques de protéines P4 où s'enfoncent 3 par 3 les extrémités C-terminales des protéines P3, composant ainsi le domaine d'ancrage (AD). Les extrémités N-terminales sont exposées à la surface, et interagissent de manière antiparallèle avec le domaine homologue des protéines P3 les plus proches, formant ainsi le domaine de digitation. Ce domaine de digitation interagit avec la région C-terminale des trimères de P2 (en vert). La région N-terminale de P2 est la région responsable de la fixation du complexe transmissible sur les récepteurs cuticulaires de l'insecte. Adapté de(Plisson et al., 2005) et (Uzest and Blanc, 2016).

4) L'activation de la transmission du CaMV

Au cours de leur réplication et de leur assemblage, les composants viraux (acides nucléiques et protéines) sont souvent confinés dans les corps d'inclusion appelées usines virales (*virus factories* ou VF) (de Castro et al., 2013). L'infection par le CaMV induit des VF principalement formées par auto-assemblage des protéines P6, et qui contiennent de nombreux complexes P3-virions. Le second type de corps d'inclusion induites par le CaMV est appelé corps à transmission (TB), car il est indispensable à la transmission (Bak et al., 2013; Espinoza et al., 1991; Khelifa et al., 2007; Woolston et al., 1983; Woolston et al., 1987). Les TB contiennent la totalité des protéines P2, ainsi que des protéines P3 et quelques virions. Lors de l'insertion des stylets du puceron dans les cellules d'une plante infectée, une réaction de défense de la plante, probablement liée à la perception des effecteurs présents dans la salive du puceron, entraîne une transformation rapide (quelques secondes) des TB et VF (Martiniere et al., 2013). Après la piqûre de l'insecte, une entrée de tubuline dans les TB induit leur dissociation ainsi que la libération des protéines P2. Un stress chimique (CO₂ et azoture de sodium), mimant potentiellement une réaction de défense face aux pucerons, induit également la libération des complexes P3-virions des VF (Bak et al., 2013). Les protéines P2 et les complexes P3-virions sont relocalisés le long des microtubules corticaux de la cellule, formant ainsi une super-structure appelée réseaux mixtes (*mixed networks*, MN). Cette structure permet de répartir dans toute la cellule les complexes transmissibles et facilite ainsi l'acquisition des complexes P2-P3-virions par le puceron lors des piqûres d'épreuve (Bak et al., 2013). La transformation des TB est complètement réversible tout comme le retour des particules virales dans les VF (**Fig. 14**).

La stratégie du facteur assistant est également retrouvée dans la famille des *Sesquiviridae*, chez les espèces membres des genres *Waikavirus* transmis par les cicadelles et *Sesquivirus* transmis par les pucerons (Murphy et al., 1995).

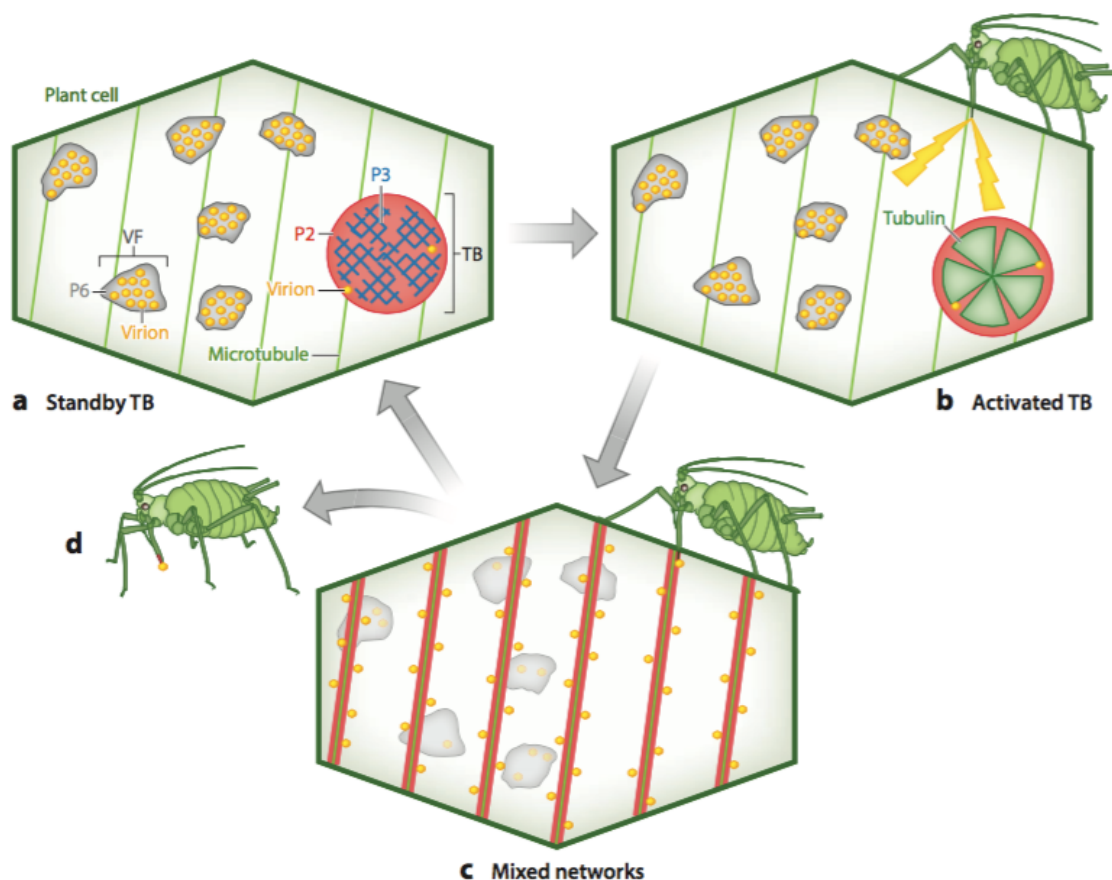


Figure 14 : L'activation de la transmission du CaMV. (a) Lorsque les cellules infectées par le CaMV sont au repos, les virus sont regroupés dans les corps à transmission (TB) et les usines virales (VF). Lors de l'insertion des stylets du puceron dans une cellule infectée (b), une entrée de tubuline dans les TB induit la libération des protéines P2, tandis que les complexes P3-virions sont libérés des VF. Les protéines P2 et les complexes P3-virions sont relocalisés le long des microtubules corticaux de la cellule (c), formant ainsi une super-structure appelée réseaux mixtes (*mixed networks*, MN). Cette structure permet aux complexes P2-P3-virions d'être acquis efficacement par le puceron lors des piqûres d'épreuve. Adapté de (Blanc et al., 2014).

5) Identification et caractérisation des sites de rétention des virus non circulants au niveau des insectes vecteurs

C'est à partir de l'étude de deux virus, le CaMV et le LIYV, que les preuves de la localisation des virus non circulants au niveau du stylet ou au niveau de l'oesophage ont été apportées. Chen et al. (Chen et al., 2011a) ainsi que Stewart et al. (Stewart et al., 2010) ont démontré par immunolocalisation que les virions se fixent sur la cuticule de l'intestin de l'aleurode vecteur, et que l'acquisition d'un anticorps dirigé contre la protéine mineure de capside (CPm) du LIYV inhibe efficacement la transmission en interférant avec la fixation de la particule du virus sur la cuticule de l'intestin de l'aleurode vecteur. Cependant, il n'existe

pour le moment aucune donnée sur la nature des molécules impliquées dans la rétention du virus sur ce site. Pour le CaMV, c'est l'incubation de stylets maxillaires disséqués provenant de pucerons vecteurs avec une protéine de fusion P2-GFP qui a permis de mettre en évidence le site de rétention du virus au niveau du canal commun entre les canaux alimentaire et salivaire (Uzest et al., 2007). Cette rétention de la P2-GFP ne fut pas observée sur les stylets d'un puceron non vecteur, *Acyrtosiphon lactucae*, ou en incubant les stylets avec la protéine P2 d'un mutant du CaMV non transmis par pucerons. Enfin, parmi les traitements chimiques visant à découvrir la nature chimique du récepteur du CaMV, seuls les prétraitements à la chitinase et à la protéase ont permis d'éliminer la fixation de la P2-GFP aux stylets, suggérant que les récepteurs de CaMV sont des protéines non glycosylées étroitement associées à la matrice de chitine (Uzest et al., 2007). Ces résultats représentent la première démonstration de l'existence de récepteurs de virus non circulants dans des vecteurs.

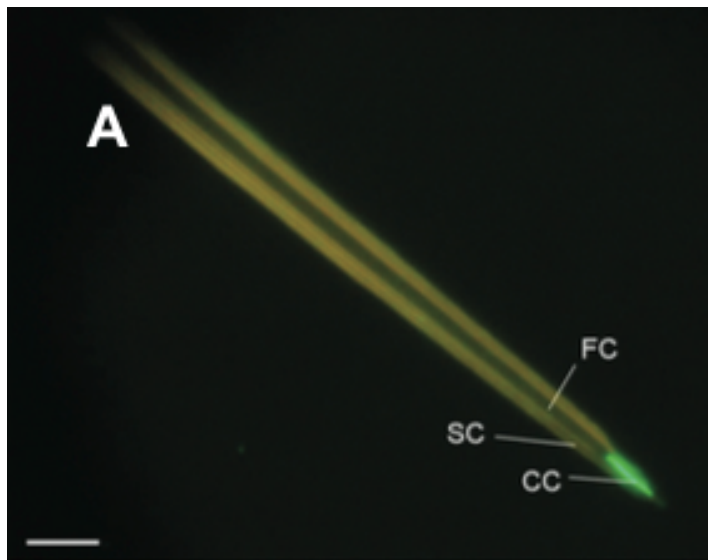
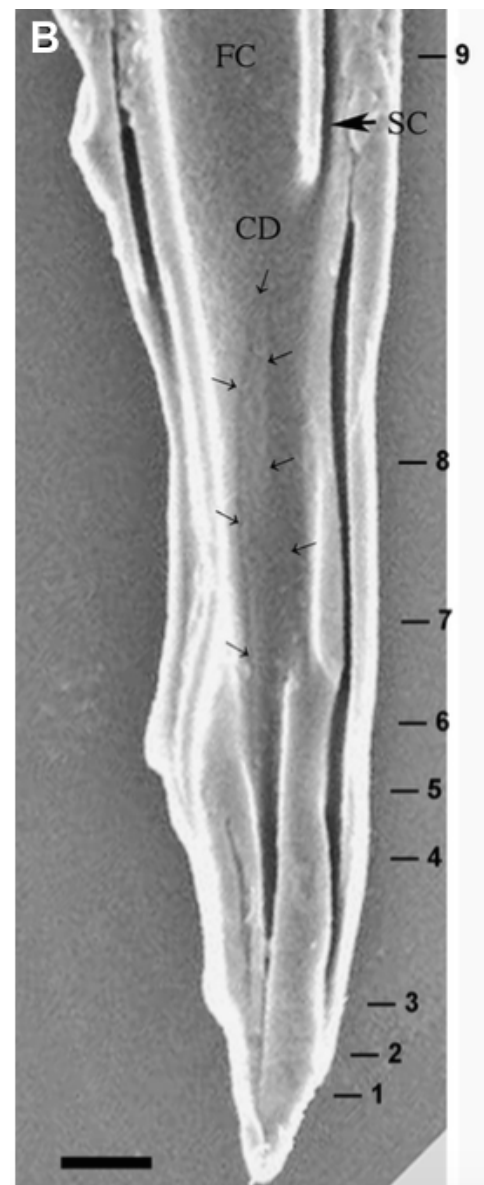


Figure 15 : L'acrostyle, site de fixation du CaMV. (A) Après avoir incubé des stylets maxillaires disséqués de pucerons vecteurs avec une protéine de fusion P2-GFP Maryline Uzest a pu mettre en évidence la rétention du virus au niveau des stylets, en un point précis situé au niveau du canal commun (CD ou CC) (Uzest et al., 2007). (B) Une réexamination de la paroi du canal commun au microscope électronique lui a ensuite permis de distinguer une nouvelle structure anatomique du stylet, l'acrostyle. L'acrostyle est un épaississement de la cuticule bordant le bas du conduit commun du stylet. Il est mis en évidence sur la figure de gauche par des fines flèches noires (Uzest et al., 2010). FC : canal alimentaire ; SC : canal salivaire.



Des études ultérieures ont permis d'identifier le site de rétention du CaMV au niveau d'une structure anatomique appelée acrostyle (**Fig. 15**). L'acrostyle est décrit comme un épaississement de la cuticule bordant le bas du conduit commun du stylet, présent chez toutes les espèces de pucerons, qu'elles soient vectrices ou non du CaMV (Uzest et al., 2010). Cette zone de rétention du CaMV contient de nombreuses protéines cuticulaires (CuP) de la sous-famille RR-2 nommées d'après la présence d'un motif décrit par (Rebers and Riddiford, 1988). Une banque de peptides représentant la majorité des protéines de la sous-famille RR-2, a été développée pour caractériser les séquences peptidiques consensus capables de fixer les particules virales du CaMV et du CMV. Cependant, aucune séquence consensus pour la fixation du CaMV n'a pu être dégagée de cette étude. A l'inverse, deux séquences consensus permettant la fixation *in vitro* du CMV ont été identifiées (Webster et al., 2017). Il serait tentant de penser que d'autres virus non circulants, tels que les *Potyvirus* également transmis par puceron, utilisent l'acrostyle comme site de fixation au niveau des stylets des insectes. Il n'a cependant pas été prouvé pour le moment qu'un virus non circulant autre que le CaMV se fixe sur l'acrostyle.

VII. Analogie avec la transmission mécanique des arbovirus vertébrés

La transmission mécanique a été considérée par de nombreux chercheurs comme un transport accidentel de virus, un phénomène biologique associé à l'évolution des comportements d'alimentation hématophage des arthropodes. Ces contaminations ne sont pourtant pas à négliger car elles touchent, entre autres, des animaux d'importance agro-alimentaire tels que les lapins, les cochons ou les vaches et dans une moindre mesure les humains. La transmission mécanique par insectes hématophages a par exemple contribué aux épidémies majeures du *Rift Valley fever* en Afrique et du *Venezuelan equine encephalitis* en Colombie (Hoch et al., 1985) (Weaver, 1997). On constate que les cas de transmission mécanique d'arbovirus se font notamment par l'intermédiaire d'insectes diptères (l'appellation vernaculaire des mouches) (Carn, 1996). Parmi les virus à ADN affectant fortement la santé animale on trouve, par exemple, le *Myxoma virus* (*Poxviridae*), le *Rabbit fibroma virus* (*Poxviridae*), le *Lumpy skin disease virus of cattle* (*Poxviridae*) (Chihota et al., 2001; Tuppurainen et al., 2015), et l'*African swine fever virus* (*Asfarviridae*). Les virus à ARN transmis mécaniquement comprennent l'*Equine infectious anemia virus* (*Retroviridae*), le *Bovine viral diarrhea virus* (*Flaviviridae*), le *Bovine leukemia virus* (*Retroviridae*), le *Classical swine fever* (*Flaviviridae*), et le *Rift Valley fever virus* (*Bunyaviridae*) (Kuno and Chang, 2005). Malgré l'importance des cas de transmission mécanique, il n'existe que très peu d'articles sur le sujet et très peu de connaissances sur les processus sous-jacents. A noter que ces observations de cas de transmission mécanique n'excluent pas totalement l'existence de mécanismes spécifiques de fixation du virus et de rétention dans les parties buccales du vecteur. De plus, il est souvent difficile de déterminer si un virus n'est transmis que de

manière mécanique car de nombreux arbovirus de vertébrés cumulent plus d'une voie de transmission (contact direct entre les vertébrés, transmission mécanique et transmission biologique). Cela explique peut-être pourquoi peu d'études se sont concentrées sur l'identification des mécanismes qui sous-tendent la transmission mécanique (Chihota et al., 2003; Day et al., 1956) malgré le nombre important d'espèces virales utilisant potentiellement cette voie de transmission (Carn, 1996; Kuno, 2004).

Quelques facteurs clés intervenant dans ce mode de transmission semblent cependant émerger de la littérature. Il s'agit, par exemple, de la concentration virale qui doit être élevée au point de prélèvement (vaisseaux sous la peau) car le volume de sang résiduel contaminant les parties buccales des insectes vecteurs est faible et généralement inférieur à 20 nanolitres (Baldacchino et al., 2014; Hoch et al., 1985). De plus, ces virus doivent pouvoir résister à des conditions environnementales le plus souvent défavorables à leur infectivité (Carn, V. M. 1996). Enfin, la transmission mécanique par les insectes augmente avec la densité des vertébrés infectés dans l'environnement (Hoch et al., 1985; Weaver, 1997).

VIII. Notre modèle principal d'étude au laboratoire : le *Turnip yellows virus* et son vecteur *Myzus persicae*

Le TuYV (*Turnip yellows virus*, auparavant appelé BWYV pour *Beet western yellows virus*) est un polérovirus de la famille des *Luteoviridae* qui partage donc toutes les spécificités des *Luteoviridae* citées précédemment. Il possède une large gamme d'hôtes et peut expérimentalement infecter 13 familles de plantes dont un grand nombre de plantes d'intérêt agro-économique. Le virus représente une menace particulièrement importante en tant qu'agent pathogène du colza (Hill et al., 1989; Jay et al., 1999; Smith and Hinckes, 1985) et de la laitue (Walkey and Payne, 1990; Walkey and Pink, 1990). Les symptômes provoqués par le TuYV sont principalement des jaunisses mais on peut également observer le rougissement et l'enroulement des feuilles qui peuvent aussi devenir plus friables (**Fig. 16**). Ces symptômes sont difficiles à reconnaître car ils sont facilement pris pour des carences nutritives ou une réaction à la sécheresse (Stevens et al., 2008). Le clone infectieux utilisé au laboratoire, appelé BWYV-FL1 a été isolé à partir de laitues infectées. L'utilisation d'un clone infectieux permet de s'affranchir des pucerons et d'utiliser la technique d'inoculation par agro-infection pour infecter les plantes (Leiser et al., 1992).



Figure 16 : Exemples de symptômes liés à l'infection du TuYV sur du colza (Brassicacée, à gauche) et sur laitue (Asteracée, à droite) Photos : INRA.

L'insecte vecteur principal du TuYV est le puceron *M. persicae* (Stevens et al., 1994) (**Fig. 17**). *M. persicae* est également capable de transmettre d'autres virus appartenant au genre *Polerovirus* tels que le CABYV, le PLRV ou le BMVYV (*Beet mild yellow virus*) (Brault et al., 2010b). Le clone que nous utilisons au laboratoire, *M. persicae* Sulzer, est élevé sur piment. Il est naturellement porteur d'un densovirus (van Munster et al., 2003a, b) qui réduit sa taille et sa fécondité, mais n'affecte pas sa capacité à transmettre les polérovirus (Véronique Brault, communication personnelle). Dans nos conditions de laboratoire, l'espèce *M. persicae* suit un cycle de vie parthénogénétique qui ne génère que des femelles aptères génétiquement identiques. Tous les individus sont porteurs de plusieurs générations de larves, et ce, dès la naissance. Le puceron possède 4 stades larvaires, L1, L2, L3 et L4 et le stade adulte. Les différents stades larvaires se distinguent par leur taille mais aussi par différents caractères morphologiques tels que la taille de la tête par rapport au corps, la taille et la forme de la cauda, des antennes et des cornicules (**Fig. 17**). Tous les stades sont *a priori* capables de transmettre le TuYV. Plusieurs techniques sont utilisées en laboratoire pour faire acquérir le TuYV aux pucerons : les pucerons peuvent être nourris soit sur une plante infectée, soit sur un milieu artificiel, le milieu MP148, additionné du virus purifié. Le milieu MP148 a été mis au point spécifiquement pour l'alimentation de *M. persicae* et contient divers éléments minéraux et protéiques qui reflètent la composition de la sève (Harrewijn, 1983).

Le TuYV forme des capsides icosaédriques non enveloppées de symétrie T = 3 de 25 nm de diamètre qui renferment un génome d'ARN simple brin de polarité positive d'environ 6 kb, ce qui représente 28% du poids des particules (**Fig. 18**). Une VPg (viral protein genome-

linked), nécessaire à la réplication du génome et à sa traduction, est liée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Il existe actuellement 9 ORF identifiés pour les polérovirus dont un ORF, sans numéro attribué, codant pour une protéine appelée Rap1. Le génome des polérovirus étant réduit, différentes stratégies d'expression des gènes sont utilisées par ces virus pour produire les protéines virales, dont la synthèse d'ARN subgénomiques. Les ORF 0, 1, 2 et l'ORF de Rap1 sont traduits à partir de l'ARN génomique, tandis que les ORF 3, 3a, 4, 5, 6 et 7 sont exprimés à partir de 2 ARN subgénomiques (sgRNA) appelés sgRNA1 et sgRNA2 (Ashoub et al., 1998) (**Fig. 19**).

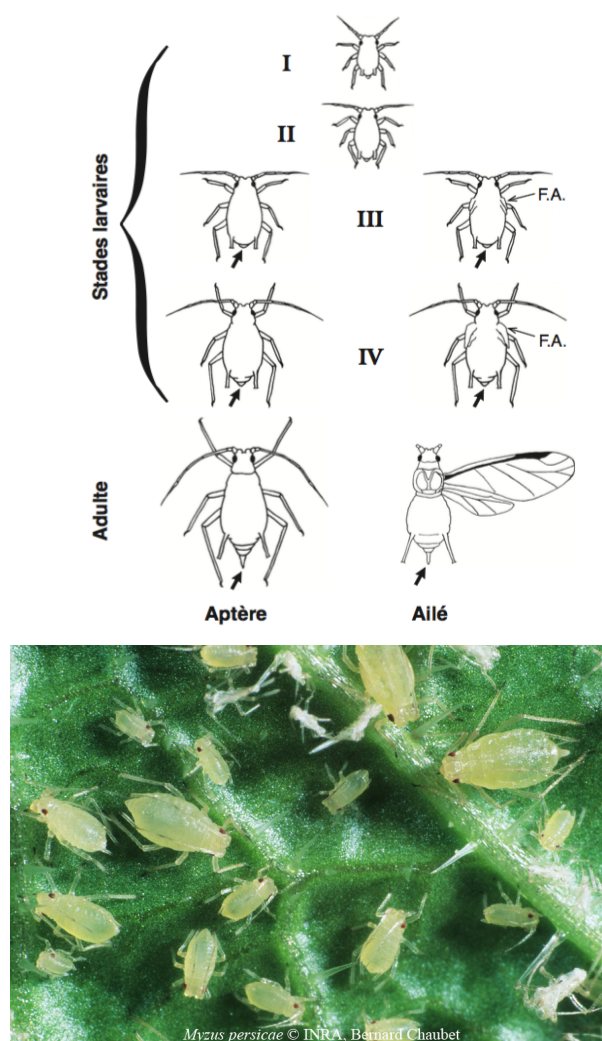


Figure 17 : Les différents stades larvaires du puceron *M. persicae*. En haut: Représentation des différents stades larvaires des pucerons. En bas: photo d'une colonie de *M. persicae* dans laquelle différents stades de développement sont visibles (F.A. : fourreaux allaires). Schéma extrait de (Godin and Boivin, 2002), photo de Bernard Chaubet, INRA.

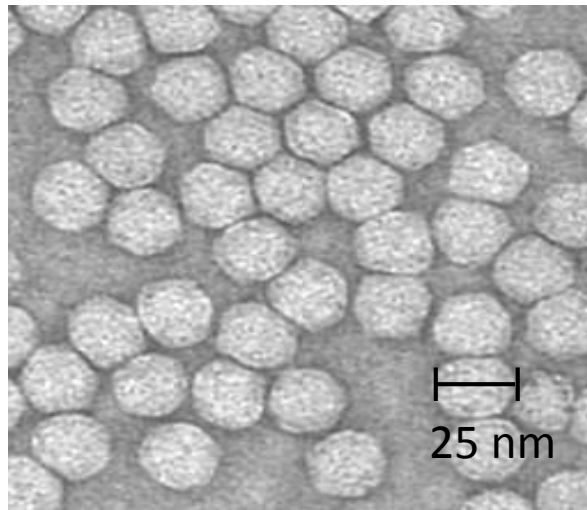


Figure 18 : Observation au microscope électronique de particules virales purifiées du TuYV. (Catherine Reinbold, INRA Colmar).

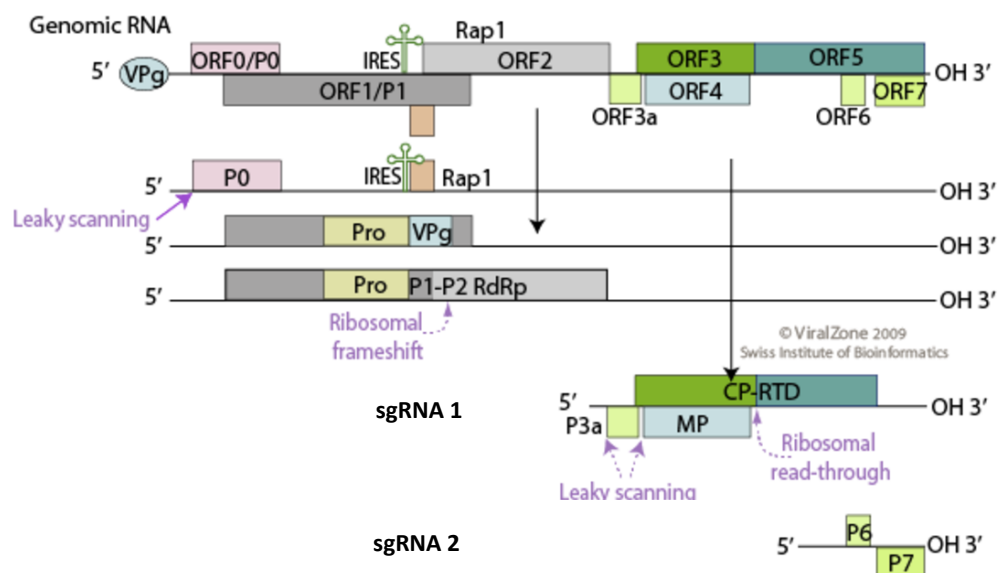


Figure 19 : Organisation génomique des polérovirus et stratégies d'expression. Deux ARN subgénomiques sont produits, le sgRNA1 et le sgRNA2. La protéine P0 codée par l'ORF0 est traduite à partir de l'ARN génomique. Le mécanisme de *leaky scanning* permet l'expression de l'ORF1 et la synthèse d'une polyprotéine portant un domaine protéase ainsi que la VPg. L'ORF2 est traduite par un mécanisme de décalage du cadre de lecture ou *frameshift*, permettant de produire une protéine de fusion P1-P2. Rap1 est traduite grâce à une structure *IRES* sur l'ARN génomique. La P3 (CP) est traduite à partir du sgRNA1, et le mécanisme de translecture du codon stop de l'ORF3, ou *readthrough*, permet de produire la protéine de fusion P3-P5 (CP-RTD). P3a est traduite à partir d'un codon d'initiation non conventionnel situé en amont du codon d'initiation de la CP. La protéine MP est produite à partir de l'ORF 4 du sgRNA1 par *leaky scanning*. Enfin, l'expression des protéines P6 et P7 à partir du sgRNA2 reste hypothétique. Schéma issu du site <https://viralzone.expasy.org/>.

1) Stratégies d'expression des protéines du TuYV et rôles des protéines dans le cycle viral

a. La protéine P0 (suppresseur de silencing)

La protéine P0 est la première protéine traduite à partir de l'ARN génomique. Elle n'est pas strictement nécessaire pour l'infection des plantes ni pour la transmission par pucerons. Elle est cependant requise pour contourner les défenses de la plante et permet au virus de s'accumuler dans les plantes à un niveau élevé. En effet, P0 est un suppresseur de silencing qui induit la dégradation de la protéine AGO1 (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). AGO1 est une protéine indispensable de la machinerie du RNA silencing, principal mécanisme de défense antivirale des plantes (plus de détails sur le RNA silencing dans le chapitre 1 : Méthodes de validation fonctionnelle des gènes de puceron : état de l'art et étude comparative de plusieurs méthodes basées sur l'ARN interférence chez le puceron *Myzus persicae*). P0 possède un domaine F-box capable d'interagir avec des enzymes d'ubiquitination de la plante (Pazhouhandeh et al., 2006). L'autophagie étant nécessaire à la dégradation de AGO1, on présume fortement que l'ubiquitination de AGO1 induite par la protéine P0 permet d'activer l'autophagie sélective des protéines AGO1 et des protéines associées (Derrien et al., 2012).

b. La protéine P1 (protéase et VPg)

Le codon d'initiation de la P0 étant situé dans un contexte défavorable pour la traduction, l'initiation s'effectue préférentiellement au codon d'initiation suivant par le mécanisme de *leaky scanning*. La protéine P1 ainsi synthétisée possède un site de fixation aux ARN, un domaine hélicase et un domaine protéase de type *chymotrypsin-like serine proteinase* capable d'induire le clivage, en trans, de la protéine P1. Elle libère ainsi à son extrémité C-terminale la VPg (Li et al., 2000; Mayo and Miller, 1999).

c. La protéine P1-P2 (ARN polymérase ARN dépendante)

La protéine P1-P2 est l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). Tout comme P1, elle est indispensable à la réplication du virus. Elle est exprimée grâce au phénomène de *frameshift* : lorsque le ribosome traduit l'ORF1, il va être ralenti par des repliements spécifiques de l'ARN génomique, et effectuer un décalage de lecture d'un nucléotide ce qui permet la traduction de la protéine de fusion P1-P2.

d. Les protéines P3 et P3-P5 (CP et RT)

Les ORF 3 et 5 permettent de traduire les protéines P3 et P3-5. Les protéines P3 et P3-P5 sont respectivement la protéine de capsid (CP) et la protéine de readthrough (RT). L'expression de ces deux protéines nécessite au préalable la synthèse de l'ARN subgénomique 1. La protéine RT résulte d'un mécanisme de translecture du codon stop de

l'ORF3 (*readthrough*): le ribosome, lors de la traduction recrute un ARNt rare, dit suppresseur, qui permet au ribosome d'insérer un acide aminé au lieu de terminer la traduction au niveau du codon stop (Bahner et al., 1990). Ce phénomène donne lieu à la synthèse d'une protéine de fusion (RT) qui contient la CP en N-terminal et le domaine de *readthrough* (DRT) en C-terminal.

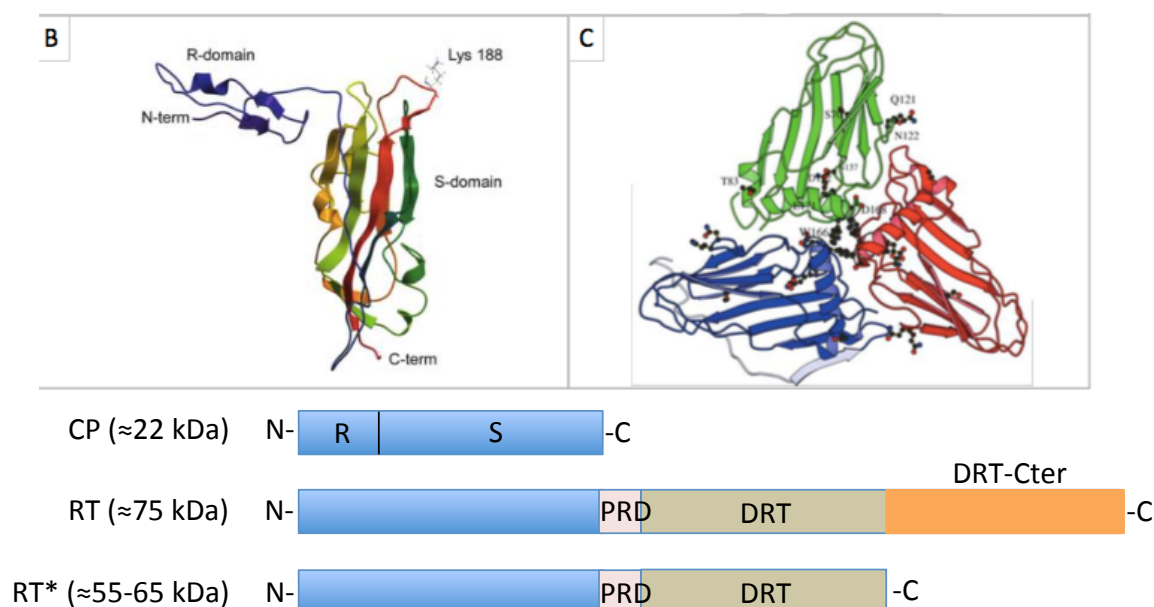


Figure 20 : Représentation en 3D de la CP et des trimères de CP composant la capside du TuYV et représentation schématique des protéines CP, RT, RT*. La CP est composée de deux domaines, le domaine N-terminal appelé domaine R riche en arginine, et le domaine S (shell) C-terminal. PRD: domaine riche en prolines ; DRT: domaine de *readthrough*. Adapté de (Brault et al., 2003).

La protéine P3 (ou CP) de 22 kDa est la protéine majeure de capside (Waterhouse, 1988) qui permet d'encapsider le génome viral. L'extrémité N-terminale riche en arginine est appelée domaine R. Ce domaine se situe à l'intérieur de la capside virale où il interagirait avec l'ARN génomique. Le domaine R est suivi d'un domaine S (pour *shell*) qui constitue la surface externe de la capside. (**Fig. 20**) (Dolja et al., 1991; Mayo and Ziegler-Graff, 1996; Rossmann and Johnson, 1989; Terradot et al., 2001; Torrance, 1992). Malgré l'absence de structure cristallographique des virions des polérovirus, ou de la CP, l'ensemble des données obtenues avec des virus portant des mutations dans la séquence de la CP a permis de valider un modèle tridimensionnel de la CP des polérovirus (Brault et al., 2003; Chavez et al., 2012; Kaplan et al., 2007; Lee et al., 2005) (**Fig. 20**).

La protéine RT d'environ 75 kDa est à l'origine de la protéine mineure de la capside. Avant

d'être incorporée dans la capside, la protéine RT est clivée et perd la partie C-terminale du domaine DRT. Cette protéine tronquée, d'environ 55 kDa appelée RT*, est la protéine mineure de la capside. Les protéines RT* sont imbriquées dans la capside par leur extrémité N-terminale (CP) et exposent leur domaine C-terminal à la surface de la particule (Brault et al., 1995). Une particule virale est composée de 180 sous-unités de CP et de seulement quelques sous-unités de RT* dont le nombre exact n'est pas connu (**Fig. 21**). Le domaine DRT est particulièrement important dans le processus de transmission (Brault et al., 1995; Bruyère et al., 1997; Chay et al., 1996; Peter et al., 2008). En effet, les virions des polérovirus dépourvus de RTD sont capables, avec une faible efficacité, de traverser les cellules intestinales, mais ne sont jamais transmis par pucerons suggérant son rôle indispensable pour traverser les cellules des glandes salivaires accessoires. Ces deux protéines de structure sont donc supposées interagir avec un ou des récepteurs protéiques du puceron au niveau de l'intestin et des glandes salivaires accessoires (voir le paragraphe « transmission des *Luteoviridae* »).

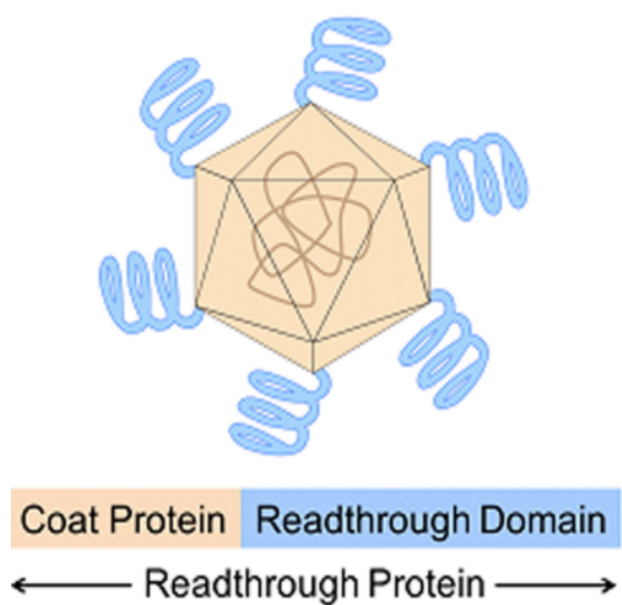


Figure 21 : Représentation schématique de la capside des polérovirus. La particule virale est composée de 180 sous-unités de CP et de seulement quelques sous-unités de RT*. Les protéines RT* sont ancrées dans la capside par leur extrémité N-terminale avec le domaine de readthrough à l'extérieur de la capside. Adapté de (Whitfield et al., 2015).

e. P4 (protéine de mouvement)

La protéine P4 est une protéine de 17 kDa qui comprend un domaine C-terminal basique, chargé positivement et possédant une structure en feuillets bêta, et un domaine N-terminal acide, chargé négativement et formant trois hélices alpha (Mayo and Ziegler-Graff, 1996). Elle est traduite par un mécanisme de *leaky scanning* à partir du sgRNA1. C'est une protéine non structurale qui possède des caractéristiques des protéines de mouvement telles que la

capacité de se fixer à l'ARN et l'ADN simple brin, la capacité de modifier la taille limite d'exclusion des plasmodesmes, la capacité de former des homodimères et celle d'être phosphorylée (Hofius et al., 2001; Schmitz et al., 1997; Sokolova et al., 1997; Tacke et al., 1993). Les mutations affectant la synthèse de cette protéine n'ont pas d'effet sur la réplication du virus dans des protoplastes mais réduisent la capacité du virus à infecter certaines espèces de plantes (Ziegler-Graff et al., 1996). La protéine P4 est donc une protéine de mouvement hôte spécifique et des études sont encore nécessaires pour comprendre son rôle exact dans le transport des complexes nucléoprotéiques (RNP) ou des particules virales dans les plantes. Des études récentes au laboratoire ont montré que la formation des virions dans la plante était nécessaire au mouvement à longue distance du TuYV (Hipper et al., 2013; Hipper et al., 2014). Il reste encore à identifier la forme virale (virions ou complexes RNP) nécessaire au mouvement du TuYV de cellule à cellule.

f. P3a (protéine de mouvement à longue distance)

La protéine P3a a été récemment identifiée chez les polérovirus par une analyse *in silico* (Smirnova et al., 2015). Elle est traduite à partir du sgRNA1 et d'un codon d'initiation de la traduction non conventionnel (codon ACG). Des virus mutants du TuYV n'exprimant pas cette protéine ne se déplacent plus à longue distance et ne sont donc plus capables d'infecter les plantes de manière systémique. Par contre, l'expression en *trans* de la protéine P3a restaure le mouvement à longue distance d'un mutant du TuYV n'exprimant pas la P3a, ce qui confirme que cette protéine est impliquée dans le mouvement systémique du TuYV (Smirnova et al., 2015). Des études sont en cours afin de comprendre le rôle exact de P3a dans le transport des particules virales dans les plantes.

g. P6 et P7 (protéines putatives)

L'ARN subgénomique 2, de 0,8 kb a été mis en évidence dans des plantes et des protoplastes infectés par le BYDV (Dinesh-Kumar et al., 1992), et dans les plantes infectées par le PLRV et le CABYV (Ashoub et al., 1998). Il contient les ORFs 6 et 7 codant potentiellement pour les protéines P6 et P7. Une interaction P7/ARN a d'ailleurs été mise en évidence *in vitro* pour le PLRV (Ashoub et al., 1998). Cependant, la présence de ces protéines dans les plantes infectées n'a pour le moment pas été démontrée, et les fonctions de ces protéines, si elles sont exprimées, ne sont pas connues.

h. Rap1 (Replication-associated protein 1)

La protéine Rap1 (*Replication-associated protein 1*) est exprimée chez le PLRV grâce à la présence d'une séquence IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) localisée 22 nucléotides en aval de l'AUG de cette ORF. Il semblerait que cette protéine intervienne dans la réplication du PLRV, mais également dans la synthèse de sgRNA1. En effet, un mutant du PLRV ne produisant pas la protéine Rap1 est incapable de se multiplier, mais est capable de traduire

l'ensemble des protéines à l'exception de la CP (Jaag et al., 2003). On ne sait cependant pas si cette protéine Rap1 est exprimée par le TuYV.

IX. Les objectifs de la thèse

Les projets de recherche portés par l'équipe Virologie-Vection de Colmar portent (i) sur l'étude de la biologie d'un virus très dommageable pour la vigne (le virus du court noué ou GFLV, népovirus), (ii) sur les différentes méthodes de lutte, biotechnologiques, conventionnelles ou par prémunition, contre les viroses majeures de la vigne et (iii) sur les mécanismes de transmission des virus par des vecteurs. Dans le cadre de ce dernier objectif, plusieurs projets sont développés sur l'étude de la biologie de la vection des virus de l'enroulement de la vigne par les cochenilles, l'étude des mécanismes moléculaires de la transmission des népovirus de la vigne par nématodes et enfin l'étude du dialogue plante/polérovirus/puceron. C'est dans le cadre de cette dernière thématique, dirigée par Mme Véronique Brault, que j'ai effectué ma thèse. L'étude des interactions entre la plante, les polérovirus et les pucerons est développée à l'heure actuelle selon deux axes majeurs. Le premier consiste à analyser les modifications induites par le virus dans les plantes infectées qui peuvent avoir un impact sur les pucerons et donc agir sur la transmission du virus. Le deuxième axe porte sur la recherche et l'identification des récepteurs des polérovirus chez les pucerons. L'ensemble de ces travaux est mené afin d'identifier de nouvelles cibles moléculaires pour lutter contre ces virus et leur transmission par puceron. Mes travaux de thèse se sont insérés dans la thématique de la recherche des récepteurs des polérovirus chez les pucerons en utilisant le pathosystème *Myzus persicae* / polérovirus / *Arabidopsis thaliana*.

Partant des connaissances acquises sur le rôle essentiel des protéines structurales des polérovirus dans la transmission par puceron, des cribles double hybride dans la levure d'une banque de cDNA totale de *M. persicae* en utilisant les CP et RT* du CABYV et du TuYV comme appâts avaient été réalisés par un post-doctorant au laboratoire, Baptiste Monsion (2008 à 2012). Cette analyse a permis d'identifier les protéines ALY (crible avec la CP du TuYV) et Eph (crible avec la RT* du CABYV et du TuYV) comme protéines candidates pour la fonction de récepteur viral des polérovirus.

L'objectif de cette thèse était de confirmer l'implication de la protéine *Ephrin Receptor* (Eph) et de la protéine ALY du puceron dans la transmission des polérovirus. ALY est une protéine nucléaire et nucléolaire intervenant dans des modifications des ARN (maturation des ARN ribosomiques, épissage des mRNA) et dans le transport des mRNA du noyau vers le cytoplasme. La protéine Eph est, quant à elle, une protéine membranaire qui est impliquée dans les communications cellulaires et également dans l'endocytose. Cette protéine était

donc un bon candidat pour être impliquée dans l'accrochage et l'internalisation du virus. Il a récemment été montré que certains virus infectant les mammifères utilisent des protéines de la famille des récepteurs de l'éphrine comme un récepteur permettant l'internalisation des virus (voir chapitre 2 de la thèse, Analyse de l'implication des gènes *Eph* et *ALY* dans la transmission virale des polérovirus à l'aide de méthodes d'ARN interférence). Les travaux d'interaction dans la levure ont été poursuivis par Sylvaine Boissinot (Ingénieure) au laboratoire qui a montré que les protéines de structure du TuYV se liaient également à la protéine Eph. Ce virus, plus facilement manipulable que le CABYV a été choisi pour poursuivre les expériences de validation fonctionnelle chez le puceron.

Ces travaux de validation fonctionnelle des candidats ont été amorcés par Baptiste Monsion, puis poursuivis par Maryam Rastegar (étudiante iranienne en thèse) dans le cadre d'un séjour de 10 mois au laboratoire (mars-décembre 2013). Ces expériences de validation fonctionnelle, basées sur l'utilisation du RNAi, consistaient à produire dans des plantes transgéniques des structures ARN en tige-boucle (hpRNA) ciblant le gène candidat dans le puceron. Les premières expériences d'ingestion de ces molécules d'ARN interférence produites dans la plante, ont permis d'inhiber l'expression du gène *Eph* chez le puceron et de réduire la transmission du TuYV lorsque celui-ci était acquis à partir d'une solution de virus purifié. Ces premiers éléments semblaient montrer que le gène *Eph* est directement impliqué dans le processus de transmission du TuYV.

Le projet initial proposé dans le cadre de cette thèse était de poursuivre la caractérisation des candidats identifiés précédemment dans l'équipe, et notamment la protéine Eph, afin de préciser leur rôle dans le processus de transmission des polérovirus par puceron. Cependant, l'utilisation des générations suivantes des plantes transgéniques exprimant des dsRNA ciblant le gène *Eph* n'a pas permis d'obtenir à nouveau l'inhibition de l'expression de ce gène, ni l'inhibition de la transmission du virus. Nous avons donc du rechercher une nouvelle méthode basée sur le RNAi pour poursuivre la validation fonctionnelle des candidats. En raison de la faible reproductibilité des résultats émanant des expériences d'ARN interférence chez le puceron, ces expériences ont du être reproduites de nombreuses fois afin d'obtenir des résultats robustes. Nous avons ainsi dû réviser les objectifs initiaux de la thèse à la baisse, et le candidat ALY n'a été que peu étudié pendant ma thèse. Mes travaux ont donc consisté à mener une analyse comparative de différentes méthodes d'ARN interférence appliquées au puceron *M. persicae* en utilisant les gènes *ALY* et *Eph* comme gènes cibles. Le développement de certaines de ces méthodes nous a ensuite permis de valider l'implication du gène *Eph* dans la transmission du TuYV, et de l'identifier comme un récepteur potentiel de ce virus chez *M. persicae*.

**Chapitre 1 : Méthodes de validation fonctionnelle des gènes
de puceron : état de l'art et étude comparative de plusieurs
méthodes basées sur l'ARN interference chez le puceron
*Myzus persicae***

I. L'ARN interférence : une révolution dans le domaine de la biologie

L'ARN interférence (RNAi, aussi appelé RNA silencing ou simplement silencing par abus de langage angliciste) désigne un ensemble de voies de régulation de l'expression des gènes faisant intervenir des petits ARN non codants (*small interfering RNA* ou siRNA) de 20 à 30 nucléotides et des protéines spécifiquement associées. Ces voies de régulation génétique, tout d'abord observées chez le vers *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998; Lee et al., 1993) ont ensuite été mises en évidence chez les animaux, les plantes et les protistes (Shabalina and Koonin, 2008). La découverte de l'ARN interférence a révolutionné notre compréhension de la régulation des gènes et les deux investigateurs pionniers de ces phénomènes, Craig Mello et Andrew Fire ont reçu pour leurs travaux sur le RNAi le prix Nobel en Médecine en 2006. La courbe croissante des articles scientifiques publiés annuellement entre 1998 et 2009 dont le sujet principal est l'ARN interférence (Leydesdorff and Rafols, 2011; Mattick, 2009) témoigne de l'engouement du milieu de la recherche scientifique pour ces phénomènes biologiques (**Fig. 22**). Aujourd'hui, le nombre d'articles référencés sur NCBI contenant les mots « RNA interference » atteint 61583.

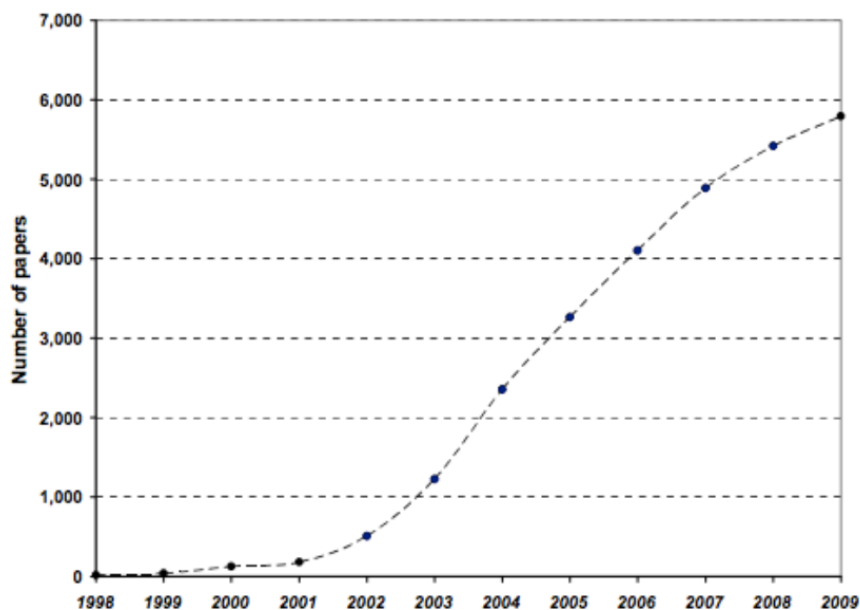


Figure 22 : Évolution du nombre d'articles scientifiques publiés annuellement entre 1998 et 2009 dans le Science Citation Index et dont le sujet principal est l'ARN interférence (Leydesdorff and Rafols, 2011; Mattick, 2009).

II. Les voies de l'ARN interférence

L'ARN interférence (RNAi) est essentiellement un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle des gènes chez les eucaryotes (Castel and Martienssen, 2013). Les trois voies connues du RNAi sont la voie des micro-ARN (miRNA), la voie des petits ARN interférents (siRNA) et la voie des ARN interagissant avec la protéine Piwi (piRNA). De manière générale, la voie des miRNA et la voie des piRNA sont des mécanismes d'origine endogène. La voie des miRNA permet à l'organisme de contrôler l'expression des gènes au cours du développement tandis que la voie des piRNA permet de maintenir l'intégrité des génomes en clivant les éléments mobiles de type transposons. La voie des siRNA est quand à elle un processus dédié à la défense antivirale (Carthew and Sontheimer, 2009). Les mécanismes d'ARN interférence impliquent toujours la présence de petits ARN non codants de séquence spécifique à une cible génétique. Les voies des siRNA et des miRNA sont très similaires et aboutissent à la formation de siRNA de 21 à 24 nucléotides indispensables aux mécanismes du RNAi. Cependant, l'origine des siRNA diffère selon la voie. Dans la voie des siRNA, les siRNA dérivent du clivage d'une molécule d'ARN double brin d'origine exogène, typiquement le génome des virus à ARN double brin et les intermédiaires de réplication viraux de type dsRNA. Dans la voie des miRNA, les siRNA dérivent du clivage des miRNA, des tiges boucles de dsRNA provenant de la maturation nucléaire de pri-miRNA, de longs transcrits d'origine génomique d'environ 1 000 nucléotides de long, contenant une ou plusieurs structures en tige boucle. Les pri-miRNA sont pris en charge dans le noyau par le complexe du microprocesseur, qui est composé de l'endonucléase Drosha liée à la protéine DGCR8. Le microprocesseur mature le pri-miRNA en pré-miRNA qui est ensuite exporté vers le cytoplasme, où le découpage en miRNA matures et leur chargement dans le complexe RISC se déroulent de manière identique à la voie des siRNA (Saini et al., 2007).

Dans les deux voies, la molécule initiatrice de la formation des siRNA est une molécule de dsRNA. Une ribonucléase de type III, appelée Dicer, reconnaît et clive les dsRNA (Bernstein et al., 2001; Elbashir et al., 2001) en duplexes de siRNA ou miRNA (selon la voie) de 19 à 24 nucléotides (Bass, 2000; Hamilton and Baulcombe, 1999). Ces siRNA et miRNA sont recrutés par des protéines Argonaute pour former le complexe ribonucléoprotéique RISC (*RNA-induced silencing complex*). La protéine Argonaute est composée de différents domaines appelés N-terminal, RNase, PAZ (PIWI/Argonaute/Zwille), et MID (Middle) (Song et al., 2004; Wang et al., 2009; Wang et al., 2008). Le complexe RISC déclenche alors l'inhibition de l'expression d'un ou de plusieurs gènes cibles possédant une complémentarité de séquence avec le petit ARN pris en charge (Hammond, 2005; Simmer et al., 2002). Les siRNA sont parfaitement complémentaires à leur ARN messager (mRNA) cible, et vont permettre de dégrader le mRNA grâce à l'activité endonucléasique de la protéine Argonaute, tandis que les miRNA contiennent des sites de non-appariement et déclenchent soit l'inhibition de la

traduction du mRNA cible soit la déadénylation suivie de la dégradation des mRNA cibles grâce au recrutement des protéines Gawky (GW) et PABP (poly(A)-binding protein) (**Fig. 23**).

III. RNAi chez les insectes

Les mécanismes et les composants de la machinerie de RNAi ont été identifiés dans de nombreuses espèces d'insectes (Dowling et al., 2016), ce qui a permis aux chercheurs de mener des expériences de validation fonctionnelle des gènes chez les insectes modèles et non modèles (Price and Gatehouse, 2008). En effet, l'introduction dans les cellules d'insecte de molécules de siRNA et/ou de dsRNA permet de déclencher l'inhibition du gène cible. Les réponses induites par l'introduction de molécules initiateuses du RNAi sont cependant variables et ont été classées en deux catégories : On distingue le RNAi non systémique, où le mécanisme de silencing est limité à la cellule contenant les dsRNA, et le RNAi systémique, où le signal de silencing se propage de cellule en cellule comme chez le ver *C. elegans* (Huvenne and Smagghe, 2010; Whangbo and Hunter, 2008). Cependant, il semblerait que le mécanisme de diffusion du RNAi diffère entre les nématodes et les insectes. Chez *C. elegans*, les siRNA primaires issus du découpage de dsRNA par Dicer sont utilisés comme amorces par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) pour produire des siRNA secondaires à partir de l'ARN messager ciblé (Sijen et al., 2001; Smardon et al., 2000) (**Fig. 24**). Ces siRNA secondaires ont des séquences complémentaires aux séquences en amont ou en aval de la région ciblée initialement dans le mRNA cible. On parle alors de transitivité du signal. Un mécanisme identique d'amplification des siRNA est présent chez les plantes. Cependant, chez les insectes, la preuve de l'existence des protéines RdRp n'a pas encore été démontrée (Tijsterman et al., 2002; Zong et al., 2009), et le mécanisme d'amplification ou de diffusion du signal de RNAi chez les insectes n'est pas encore complètement élucidé. Ce mécanisme est cependant fortement suspecté chez les insectes et mettrait en œuvre des gènes différents de ceux identifiés chez les autres organismes. Le coléoptère *Tribolium castaneum* est apparu comme l'insecte modèle pour l'étude du RNAi systémique (Bucher et al., 2002; Tribolium Genome Sequencing et al., 2008).

Des études ont été menées pour tenter de comprendre pourquoi certains insectes présentent une réponse systémique au RNAi tandis que d'autres non. La mouche *Drosophila melanogaster*, par exemple, contrairement à *Tribolium castaneum*, ne présente pas ou peu de réponse systémique au RNAi (Roignant et al., 2003). Cette différence a d'abord été attribuée au gène SID-1 (*systemic RNA interference deficient-1*). Ce gène a été identifié chez *C. elegans* comme étant un facteur de la diffusion du signal de RNAi, permettant de créer un canal pour le passage des dsRNA entre les cellules (Winston et al., 2002). Le génome de *T. castaneum* contient trois gènes similaires à SID-1 alors que les gènes orthologues de SID-1 sont absents chez *D. melanogaster* (Feinberg and Hunter, 2003; McEwan et al., 2012).

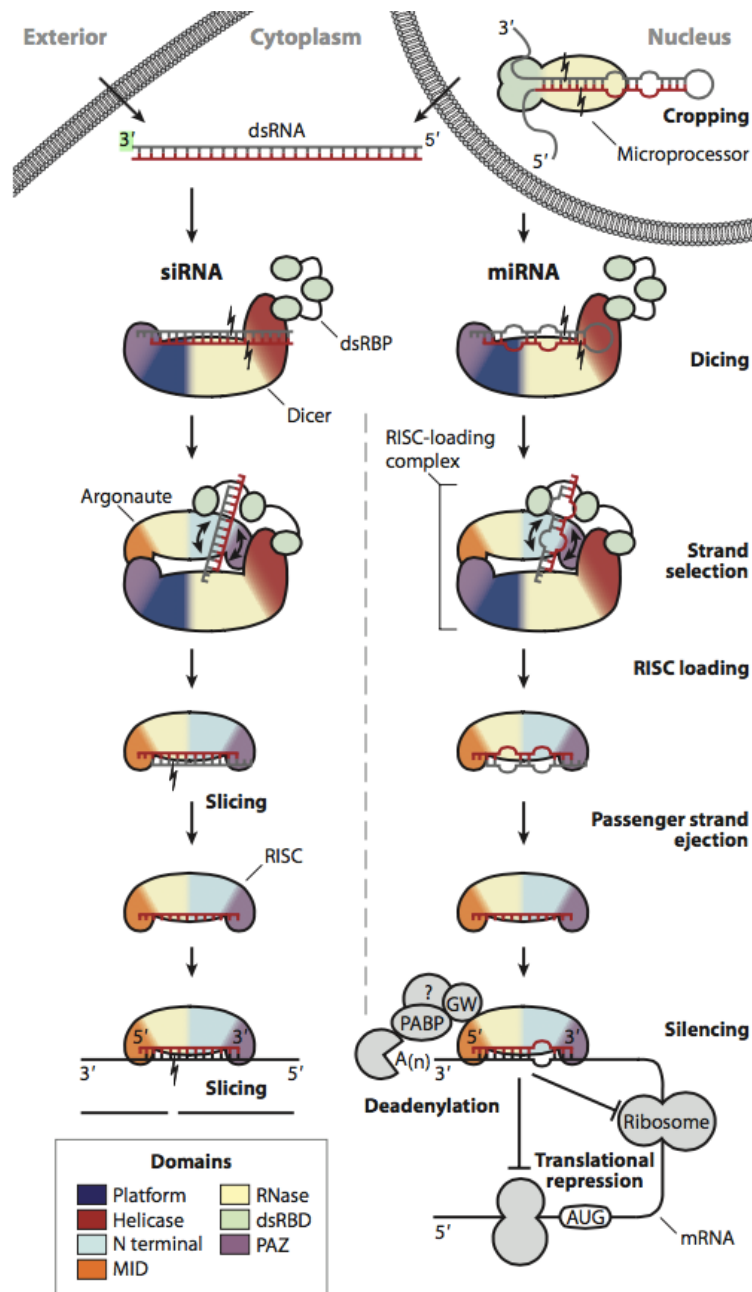


Figure 23 : Schéma des voies des siRNA et des miRNA. La voie des siRNA (à gauche) débute par le clivage d'un dsRNA d'origine exogène ou nucléaire par Dicer. Le duplex de siRNA résultant est chargé sur Argonaute (composé des domaines N-terminal, RNase, PAZ, et MID) par le complexe multiprotéique RISC, qui comprend Dicer, des protéines de liaison aux dsRNA (dsRBP) et une protéine Argonaute. Un des deux brins du siRNA, appelé brin passager (ici en gris) est clivé et éjecté. Le second brin, appelé brin guide (ici en rouge), reste lié à Argonaute, formant le complexe RISC effectif. RISC se lie à des séquences cibles complémentaires, ici en noir, et les clive via l'activité endonucléasique d'Argonaute. Dans la voie des miRNA (à droite), un pri-miRNA est pris en charge par le complexe du microprocesseur, qui consiste en l'endonucléase Drosha liée à la protéine DGCR8. Il est maturé en pré-miRNA et exporté vers le cytoplasme, où le découpage en siRNA et le chargement des siRNA dans le complexe RISC se déroulent de manière identique à la voie des siRNA. Après éjection du brin passager, le complexe RISC recrute plusieurs protéines, dont PABP et GW, afin d'initier l'inhibition traductionnelle du mRNA cible ou la déadénylation suivie de la dégradation des mRNA cibles. Adapté de (Wilson and Doudna, 2013)

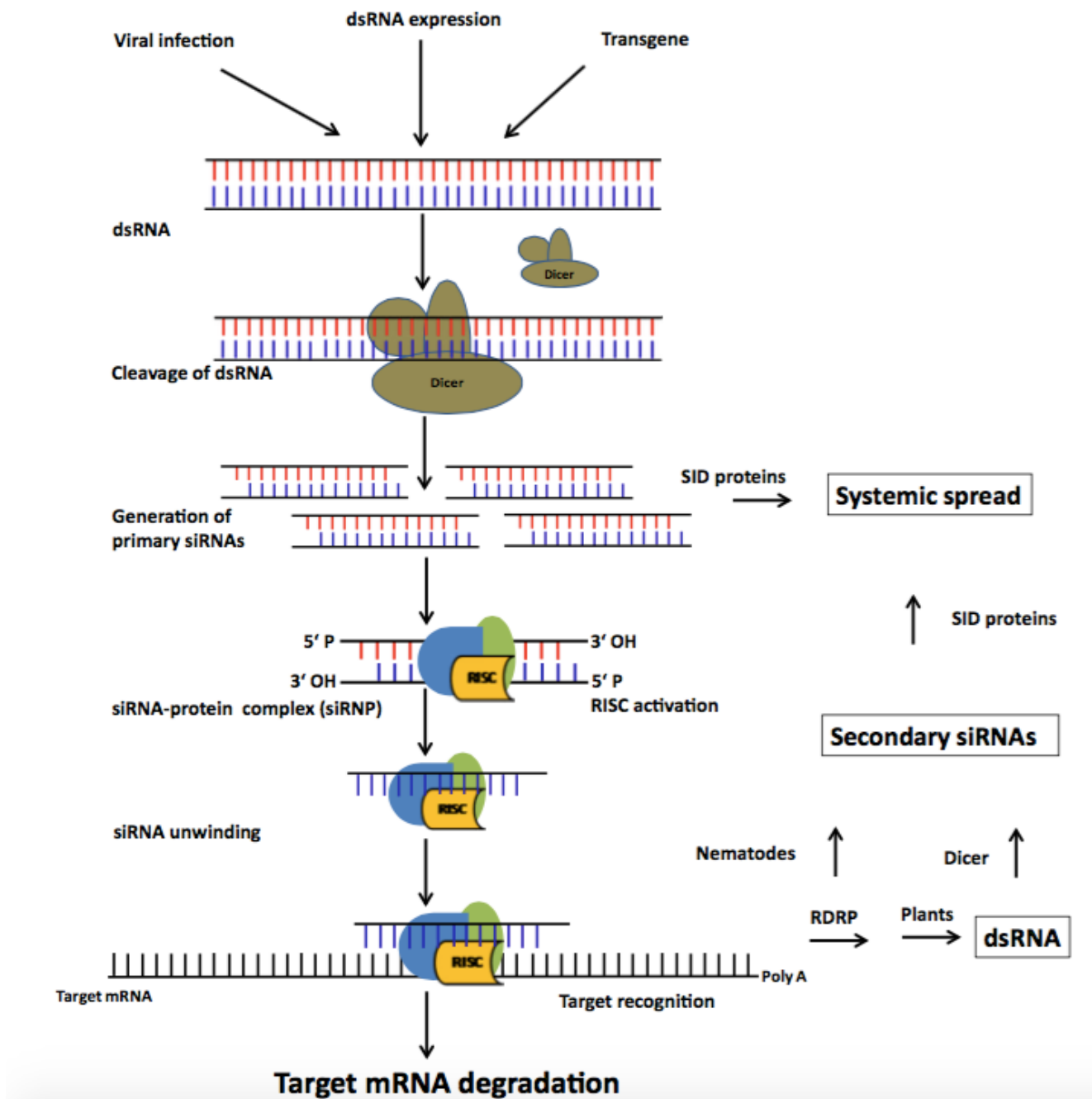


Figure 24 : Rôle des RdRp et des protéines SID dans l'amplification et la diffusion du signal de RNAi adapté de (Tamilarasan and Rajam, 2013).

Il apparaît que les drosophiles possèdent en fait une immunité systémique antivirale basée sur le RNAi et médiée par les hémocytes (Tassetto et al., 2017). Les hémocytes sont des cellules semblables aux macrophages chez les vertébrés qui circulent dans le système circulatoire des insectes et sont impliqués dans l'immunité innée antibactérienne, notamment par les mécanismes de phagocytose et d'encapsulation (Lavine and Strand, 2002; Ribeiro and Brehelin, 2006). Les auteurs (Tassetto et al., 2017) ont découvert que les hémocytes, après avoir phagocyté les cellules contenant les molécules de dsRNA exogène, utilisent les transcriptases inverses endogènes codées par les transposons de l'insecte pour obtenir des copies d'ADN à partir de ces dsRNA (**Fig. 25**). Ces copies d'ADN complémentaires dérivées des dsRNA viraux sont appelées vDNA (*virus-derived complementary DNA*) et servent ensuite de matrice pour la production de siRNA viraux secondaires (vsRNA) par le complexe RISC et la protéine DICER. Ces vsRNA sont ensuite excrétés à l'extérieur des hémocytes dans des vésicules de type exosomes, ce qui permet de répandre le signal de silencing. Cette découverte est de grande importance, car elle met en évidence un nouveau mécanisme de propagation du RNAi chez les insectes. Cette étude permet de comprendre pourquoi l'expression tissu-spécifique de dsRNA chez la drosophile avait permis de suggérer qu'il n'existait pas de systémie et de transitivity du RNAi chez cet insecte (Roignant et al., 2003), alors qu'il était devenu évident que la réponse systémique de RNAi est indispensable pour la défense antivirale des drosophiles (Saleh et al., 2006). Cette étude est aussi importante car elle révèle une nouvelle forme d'immunité adaptative. Les auteurs ont démontré que les insectes utilisent les vDNA comme « système de mémoire immunitaire » afin de s'immuniser contre des infections ultérieures. Jusqu'à aujourd'hui, il était admis que les insectes ne possèdent pas de système immunitaire adaptatif mais uniquement un système immunitaire inné très proche de celui des mammifères, ce qui en faisait un modèle de référence pour l'étude des mécanismes de l'immunité innée.

Concernant les pucerons, une étude a démontré en 2013 que le puceron *Aphis Glycinae* exprime l'ensemble des gènes majeurs impliqués dans le RNAi chez les insectes, Dicer 2 (Dcr2), Argonaute2 (Ago2), and R2d2. (Bansal and Michel, 2013). Les auteurs ont aussi pu mettre en évidence l'expression d'un gène homologue à SID-1 appelé sid-1.

Le RNAi a été appliqué à de nombreuses reprises sur les pucerons et l'inhibition des gènes des pucerons a eu des effets phénotypiques et physiologiques significatifs sur ces insectes tels que la mortalité et la réduction de la fécondité (**Table 8**). Cependant, l'abondante littérature sur le sujet indique que la réponse des pucerons vis-à-vis des molécules de silencing varie énormément selon les gènes visés, la méthode employée pour introduire les dsRNA dans les cellules de l'insecte, les tissus et l'espèce de puceron utilisée (Scott et al.,

2013) (voir références **Table 8**). Il apparaît même que la réponse au silencing peut varier d'un laboratoire à l'autre lorsque les gènes ciblés, les techniques et l'insecte sont identiques (Christiaens et al., 2014; Whyard et al., 2009). Des travaux sont menés à l'heure actuelle pour comprendre précisément l'origine de ces variations, en analysant, par exemple, au sein de différentes espèces de pucerons la diversité des RNAses cellulaires qui pourraient être responsables de la dégradation des dsRNA initiateurs du RNAi. Il n'existe pas pour le moment de preuves formelles de systémie ou de transitivity du signal de silencing chez le puceron. Cependant, le suivi de la distribution de dsRNA fluorescents après l'acquisition de ces molécules par voie orale semble montrer que ces molécules diffusent dans le corps du puceron entre 24h et 72h après l'ingestion (Wang et al., 2015a; Zhang et al., 2013a). Enfin, deux études suggèrent une transmission du signal de silencing à la descendance ainsi que des effets phénotypiques associés (Coleman et al., 2015; Xiao et al., 2015b).

Il est intéressant de noter que le génome de *D. melanogaster* contient 5,35% de transposons, tandis que le génome de *T. castaneum* et de *A. pisum* en contiennent respectivement 27% et 38% (Canapa et al., 2015). En considérant ces données, la recherche de voies de silencing médiées par les hémocytes et les transposons telles que celle observée chez la drosophile semble être une piste à explorer pour comprendre la propagation du silencing chez les insectes répondant de manière inefficace aux molécules de dsRNA. La compréhension des bases moléculaires de la réponse systémique du puceron au RNAi est cruciale car elle pourrait aider à développer des méthodes de RNAi efficaces pour le contrôle des insectes vecteurs en champs.

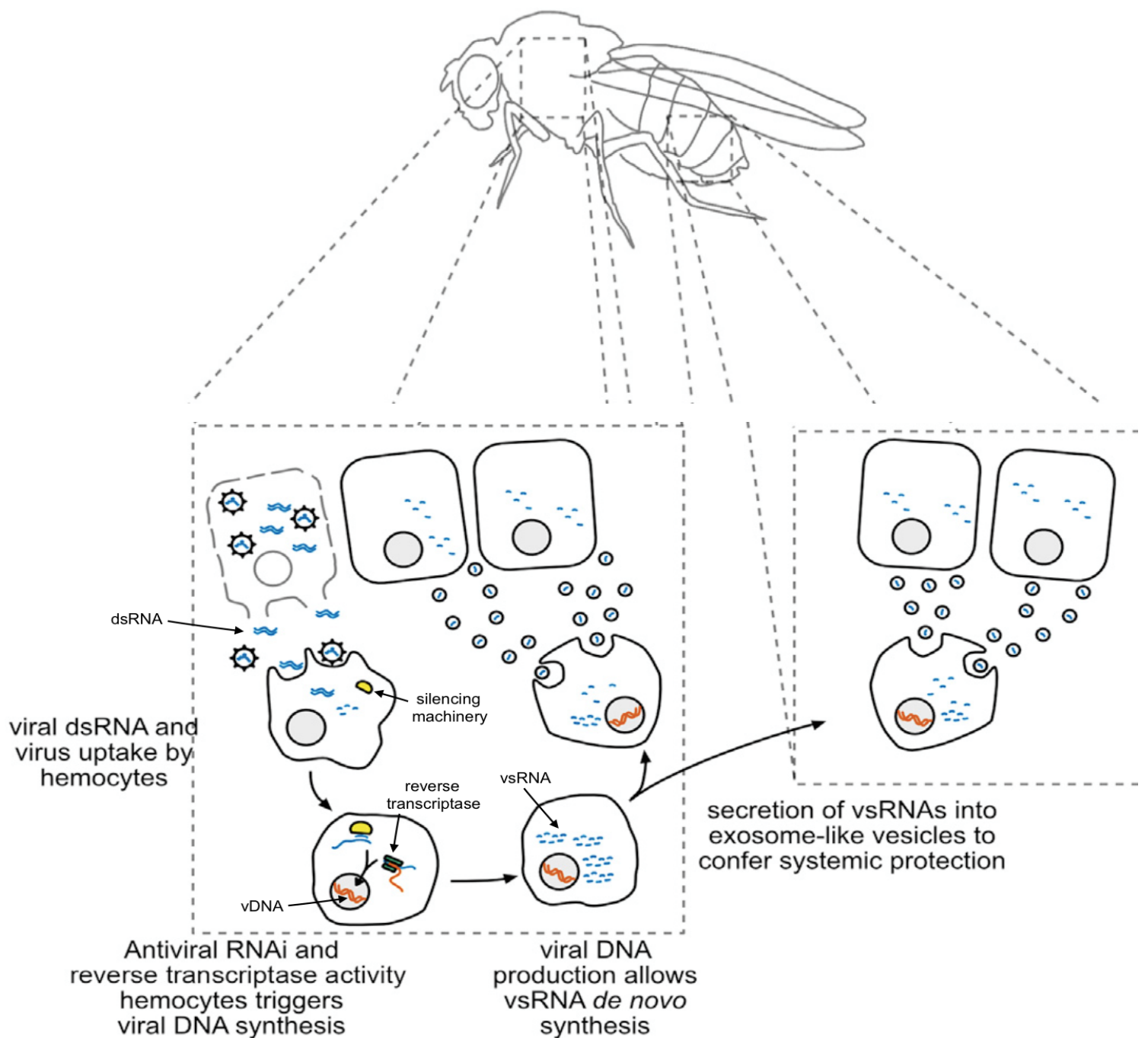


Figure 25 : Réponse antivirale adaptative systémique basée sur le RNAi chez *D. melanogaster*. Les hémocytes chez la drosophile phagocytent les dsRNA viraux qui sont copiés par des transcriptases inverses pour obtenir des copies d'ADN. Ces copies d'ADN complémentaires dérivées des dsRNA viraux sont appelés vDNA et servent ensuite de matrice pour la production de siRNA viraux secondaires (vsRNA). Les vsRNA sont excrétés à l'extérieur des hémocytes dans des vésicules ce qui permet de répandre le signal de silencing. Adapté de (Tassetto et al., 2017).

IV. Utilisation du RNAi pour la validation fonctionnelle chez le puceron

La validation fonctionnelle des gènes consiste à inhiber, supprimer ou augmenter l'expression d'un gène, *in vivo*, afin d'observer un effet phénotypique. L'ARN interférence est actuellement le seul moyen disponible pour valider la fonction d'un gène chez le puceron. Cette méthode consiste à introduire dans les cellules de l'insecte les molécules initiateuses du RNAi afin d'inhiber l'expression du gène cible. Chez la drosophile, organisme modèle de référence en génétique, des méthodes de transgénèse, basées entre autre sur l'utilisation des transposons P, peuvent être développées pour exprimer de manière constitutive les molécules de dsRNA (Bachmann and Knust, 2008). L'introduction de séquences de type miRNA dans le génome des drosophiles permet de générer un silencing endogène et ciblé par l'utilisation de promoteurs tissus-spécifiques (Haley et al., 2008; Lin et al., 2013). L'utilisation de lignées cellulaires chez la drosophile permet aussi de faciliter la mise en place du RNAi (Clemens et al., 2000; Zhou et al., 2013b). Cependant, il n'existe pas actuellement de lignées cellulaires de puceron, ni d'outils disponibles de modification du génome. Plusieurs équipes travaillent néanmoins sur la mise au point du système CRISPR-Cas9 chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Gaël Le Trionnaire, INRA Rennes, non publié). Le système CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9) est un système bactérien de coupures ciblées du génome qui 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). Il est depuis peu utilisé en routine chez la drosophile (Bassett et al., 2014).

Une méthode permettant d'introduire les molécules initiateuses du silencing dans les cellules du puceron est l'alimentation à partir de sources de dsRNA et de siRNA. Il est ainsi possible de nourrir ces insectes à partir de dsRNA synthétisés *in vitro*, à partir de siRNA synthétisés chimiquement ou obtenus après clivage enzymatique de dsRNA [réf : voir **Table 8**]. Les pucerons peuvent également acquérir les dsRNA à partir de plantes exprimant de manière stable ou transitoire des dsRNA [réf : voir **Table 8**]. Une autre méthode pour introduire des dsRNA ou siRNA dans les pucerons est la micro-injection des molécules dans le corps des insectes. Cette dernière méthode est cependant très invasive, et peut causer des dommages mécaniques importants chez l'insecte, pouvant être considérés à tort comme des effets phénotypiques. De plus, cette technique est peu adaptée aux cribles génétiques à grande échelle. Si l'efficacité de l'inhibition de l'expression des gènes ciblés peut varier selon l'espèce de puceron et la nature des gènes, de nombreux paramètres peuvent également intervenir. Il s'agit, par exemple, du choix de la séquence et de la taille des dsRNA utilisés. La plupart des expériences réalisées chez les pucerons fait appel à des dsRNA ayant une taille allant de 50 à 520 paires de bases (pb), la meilleure efficacité étant obtenue en moyenne avec des dsRNA de 50 à 200 pb (Huvenne and Smagghe, 2010). Des études ont aussi montré

que certaines régions des gènes étaient plus favorables à l'action des molécules de silencing (dsRNA ou siRNA) et que ces régions variaient selon les gènes ciblés, illustrant ainsi la nécessité de tester de multiples combinaisons de séquences de dsRNA pour obtenir un silencing efficace du gène ciblé (Loy et al., 2012; Mao and Zeng, 2012; Pridgeon et al., 2008). Les prédictions informatiques peuvent aider à l'optimisation du choix des séquences en analysant des critères tels que la spécificité du siRNA, la complexité de la structure de l'ARN cible et l'efficacité prédite du siRNA vis-à-vis de sa séquence cible. E-RNAi est un exemple d'outil en ligne permettant de prédire les séquences les plus favorables au RNAi pour de nombreux insectes dont les génomes ont été séquencés (Horn and Boutros, 2010).

Study	Aphid species	Administration mode	Targeted transcripts	RNAi efficiency	Phenotype
				% expression reduction	
Mutti et al., 2006	<i>A. pisum</i>	siRNAs injection	<i>C002</i> (effector)	40%	Lethal
Jaubert-Possamai et al., 2007	<i>A. pisum</i>	dsRNAs injection	<i>Cathepsin-L</i>	40%	No phenotype
			<i>Calreticulin</i>	40%	No phenotype
Mutti et al., 2008	<i>A. pisum</i>	siRNAs injection	<i>C002</i> (effector)	40%	Reduced performance
Whyard et al., 2009	<i>A. pisum</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>vATPase</i>	31%	Lethal
Shakesby et al., 2009	<i>A. pisum</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>Aquaporin 1</i>	50%	Elevated osmotic pressure
Pitino et al., 2011	<i>M. persicae</i>	dsRNA transient expression in <i>N. benthamiana</i> and constitutive expression in <i>A. thaliana</i>	<i>Rack1</i>	30-40% <i>N. benthamiana</i>	Reduced aphid fecundity
			<i>C002</i> (effector)	50%-60% <i>A. thaliana</i>	Reduced aphid fecundity
Bhatia et al., 2012	<i>M. persicae</i>	dsRNA hp constitutive expression in <i>N. tabacum</i>	<i>serine protease</i>	40-65%	Inhibition of gut protease activity and reduced fecundity
Mao & Zeng, 2012	<i>A. pisum</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>Hunchback</i>	50%	Lethal
Zhang et al., 2013	<i>S. avenae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	16 different genes including <i>SaC002</i>	20%-80%	Lethal
Pitino & Hogenhout, 2013	<i>M. persicae</i>	dsRNA transient expression in <i>N. benthamiana</i> and constitutive expression in <i>A. thaliana</i>	<i>PlntO1, PlntO2</i> (effectors)	20-30% <i>N. benthamiana</i>	Reduced aphid fecundity for PlntO2 and not for PlntO1
				40% <i>A. thaliana</i>	
Christiaens et al., 2014	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>C002</i> (effector)	0%	No phenotype
	<i>A. pisum</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>vATPase</i>	0%	No phenotype
Xu et al., 2014	<i>S. avenae</i>	dsRNA constitutive expression in <i>Triticum aestivum</i>	<i>Carboxylesterase</i>	30 to 60%	Reduced fecundity
			<i>CbE E4</i>		
Deng & Zhao, 2014	<i>S. avenae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Catalase</i>	50%	Reduced survival rate and ecdysis index
Elzinga et al., 2014	<i>M. persicae</i>	Transient dsRNA expression in <i>N. tabacum</i> and <i>N. benthamiana</i> ; constitutive expression in <i>A. thaliana</i>	<i>MP55</i> (saliva protein, putative effector)	80%	Higher susceptibility to plant defense
Mao & Zeng, 2014	<i>M. persicae</i>	dsRNA constitutive expression in <i>N. tabacum</i>	<i>Hunchback</i>	30%	Reduced fecundity
					Reduced biomass

Study	Aphid species	Administration mode	Targeted transcripts	RNAi efficiency	Phenotype
				% expression reduction	
Sapountzis et al., 2014	<i>A. pisum</i>	dsRNAs injection and feeding	<i>Cathepsin-L</i>	Variable depending on the administration mode and the body part analyzed	Molting and gut epithelial cells defect
Guo et al., 2014a	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>Cystein-rich protein</i>	32%	No phenotype
Guo et al., 2014b	<i>M. persicae</i>	dsRNA (hp or amiRNA) constitutive expression in <i>N. tabacum</i>	<i>V-ATPase</i>	0-20% AChE	30% reduced fecundity (higher aphid resistance with artificial miRNA)
			<i>RR1 cuticle protein</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>40S ribosomal protein</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>Actin dependent regulator of chromatin</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>Tubulin folding co-factor</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>Coatomer subunit</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>Ribosomal protein S14</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>mediator complex subunit 31</i>	Not mentioned	Not mentioned
			<i>Acetylcholinesterase</i>	Not mentioned	Not mentioned
Gong et al., 2014	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Carboxylesterase</i>	33%	Increased susceptibility to pesticides
Fan et al., 2015	<i>S. avenae</i>	siRNA feeding	olfactory co receptor	65%	modified olfactory behavior and wing determination
Wang et al., 2015b	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	salivary effector	39%-48%	Modifications in plant defense, life span, feeding behavior
Wang et al., 2015c	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>Angiotensin-converting 193 ACEs 1, 2 et 3</i>	22%-67%	Feeding and survival
Zhang et al., 2015	<i>S. graminum</i>	Feeding on artificial medium with siRNA	salivary protein <i>C002</i>	80%	Lethal
Wang et al., 2015	<i>S. avenae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	4 non-annoted genes	90%	Lethal
Xiao et al., 2015b	<i>R. padi</i> and <i>S. avenae</i>	dsRNA injection	<i>acetylcholinesterases</i>	0%-90%	Susceptibility to pirimicarb and malathion, altered fecundity
Zhang et Lu 2015	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>Peroxisredoxin 1</i>	35%	Lethality caused by increased oxidative stress
Will and Vilcinskas, 2015	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>structural sheath protein</i>	35%	Altered phloem feeding
Tzin et al., 2015	<i>M. persicae</i>	TRV VIGS	aquaporin (<i>MpAQP1</i>), sucrose (<i>MpSUC1</i>), sugar transporters (<i>MpST4</i>)	10% in single-target method, 50% in multi-targets	Modified osmoregulation

Study	Aphid species	Administration mode	Targeted transcripts	RNAi efficiency	Phenotype
				% expression reduction	
Naessens et al., 2015	<i>A. pisum</i>	dsRNAs injection	salivary cytokine	30-60%	Modified host plant-insect interaction
Coleman et al., 2015	<i>M. persicae</i>	dsRNA (hp or amiRNA) constitutive expression in <i>N. tabacum</i>	<i>rack1</i> , <i>MpC002</i> and <i>MpPlntO2</i>	70%	Lethal, transgenerational effect
Xiao et al., 2015a	<i>R. padi</i> and <i>S. avenae</i>	dsRNA injection	<i>acetylcholinesterases</i>	90%-45%	Reduced fecundity in the aphids and their progeny
Rebijith et al., 2015a	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Juvenile Hormone-Binding Protein</i> and <i>Vacuolar ATPase-H</i>	9%–73%	Lethal
Rebijith et al., 2016b	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>OBP2</i>	55–77 %	Altered electrophysiological responses
Shang et al., 2016a	<i>Toxoptera citricida</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>lipid synthesis and degradation gene, glycogen gene</i>	10%-20%	Lipid synthesis affected, modified wing determination
Peng et al., 2016a	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Cytochrome P450</i>	Not mentioned	Sensitivity to gossypol
Chen et al., 2016	<i>A. pisum</i>	dsRNAs Injection and feeding	<i>Cytochrome P450</i>	45% after oral acquisition, 85% after microinjection	Lethal, sensitivity to dessication
Wang et al., 2016	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>octopamine receptor agonists</i>	Effective on nymphs and adult heads 40%	Modified wing determination
Peng et al., 2016b	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Cytochrome P450</i>	85%	Increased sensitivity to insecticide
Guo et al., 2016	<i>A. pisum</i>	dsRNA injection	<i>Insulin related peptide 5</i>	20%	Modified embryo development and biochemical composition
Shang et al., 2016b	<i>Toxoptera citricida</i>	Soaking of plants in dsRNA	<i>chitine synthase</i>	48%	No molting
Yan et al., 2016	<i>S. avenae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>Ecdysone Receptor Genes EcR</i>	85%	Lethal, reduced fecundity
Ma et al., 2017	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>DICER, AGO</i>	35%-40%	Susceptibility to allochemicals
Will et al., 2017	<i>A. pisum</i>	dsRNAs injection	<i>HSP83</i>	+80% (upregulation)	affect embryogenesis, longevity, and fecundity
Pan et al., 2017	<i>A. gossypii</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>acetyl-coenzyme A carboxylase</i>	78%	Lethal
Mou et al., 2017	<i>A. citricidus</i>	Soaking of plants in dsRNA	<i>acetylcholinesterase</i>	45-50%	Reduced enzymatic activity, lethal
Thairu et al., 2017	<i>A. pisum</i> , <i>A. glycines</i> and <i>S. graminum</i> .	Aerosolization of siRNA–nanoparticle complexes	<i>carotene degdrogenase (bcat)</i> , <i>amino acid transaminase (AAT)</i>	12%-30%	Lethal (AAT), modified pigmentation (bcat)
BY Ding et al., 2017	<i>Aphis toxoptera</i>	Feeding on artificial medium with dsRNAs	<i>Insulin Receptor</i>	72%	Disrupted nymph/adult transition
Y Liang et al., 2017	<i>M. persicae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA	<i>Cuticle Protein Gene</i>	51%	Reduced virus binding on cuticle
T-C Mathers et al., 2017	<i>M. persicae</i>	dsRNA constitutive expression in <i>A. thaliana</i>	<i>cathepsin B</i>	10-80%	Lethal, affect nymph production
Vineeta Bilgi et al., 2017	<i>M. persicae</i>	Feeding on artificial medium with dsRNA and vital dyes	<i>vha-8</i>	Semi-quantitative PCR analysis	Lethal

Table 8 : Liste rassemblant les expériences de RNAi chez le puceron. Au total, 10 espèces de pucerons ont déjà été utilisées dans ces expériences. Différents gènes ont été testés, dont des gènes codant pour des protéines à activité enzymatique, des protéines de structure des tissus, des protéines impliquées dans le métabolisme et des protéines impliquées dans le développement. 7 méthodes ont été utilisées pour faire pénétrer les siRNA et dsRNA dans les cellules des pucerons, incluant la microinjection, l'acquisition orale sur milieu artificiel, l'acquisition orale à partir de plantes qui expriment des dsRNA de manière transitoire ou constitutive, l'acquisition orale à partir de plantes infectées avec un virus modifié, l'acquisition orale sur des plantes incubées dans des solutions de dsRNA, et la pulvérisation directe de siRNA associés à des nanoparticules. Des variations d'expression des gènes cibles allant de -90% à +80% ont été observées.

V. Inhibition de l'expression des gènes *Eph* et *ALY* chez *Myzus persicae* via le mécanisme d'ARN interférence : une étude comparative de différentes méthodes

Dans le cadre du projet de validation fonctionnelle des gènes *Eph* et *ALY* dans la transmission des polérovirus, nous avons mené une étude afin d'identifier et d'optimiser la méthode d'ARN interférence la plus adaptée pour inhiber l'expression de ces 2 gènes dans le puceron *M. persicae*. Pour cela, nous avons employé 5 méthodes basées sur l'acquisition orale de dsRNA et siRNA par les insectes (**Fig. 26**). Ces méthodes sont :

- 1) l'utilisation de plantes transgéniques permettant la synthèse d'ARN en structure « tiges boucles » (hpRNA) ;
- 2) l'utilisation de feuilles exprimant de manière transitoire les hpRNA ;
- 3) l'utilisation de plantes infectées par un virus recombinant, le *Tobacco rattle virus* (TRV) portant des séquences des gènes cibles ;
- 4) l'acquisition de siRNA purifiés à partir de plantes produisant transitoirement des hpRNA ;
- 5) l'acquisition de dsRNA synthétisés *in vitro*.

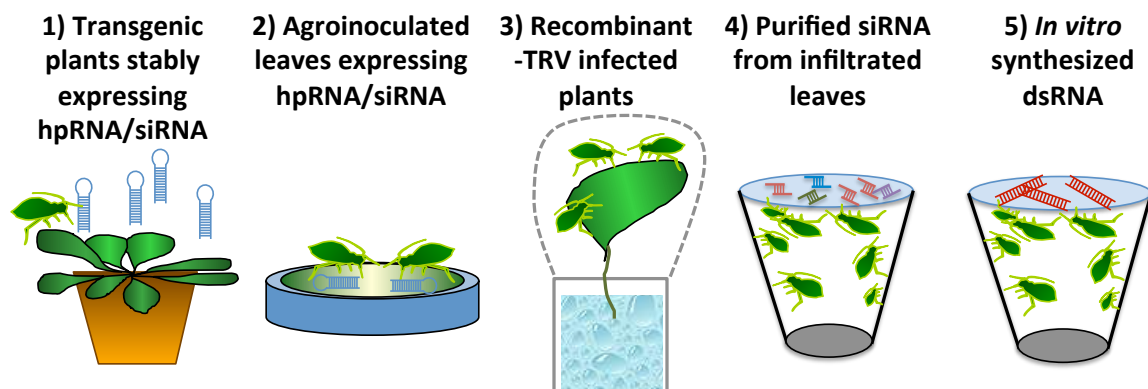


Figure 26 : représentation schématique des 5 méthodes utilisées pour inhiber l'expression des gènes *Eph* et *ALY*, toutes basées sur l'absorption orale de dsRNA et de siRNA par les insectes.

Nous avons montré par qRT-PCR que l'expression de ces gènes varie selon le stade larvaire du puceron *M. persicae* (**Fig. 27**), et avons toujours utilisé des individus du 4^{ème} stade larvaire ou des adultes pour la suite des expériences.

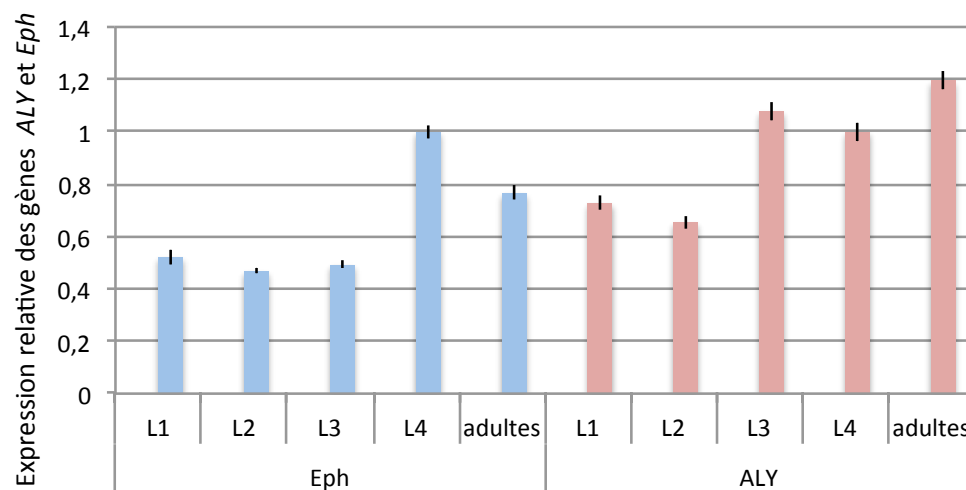


Figure 27 : Expression des gènes *Eph* et *ALY* dans les différents stades de *M. persicae* (corps entier) élevés sur poivrons *Capsicum annuum*. L'expression des gènes est normalisée par rapport aux gènes RPL7 et L27.

L'analyse de données de RNA Seq provenant du puceron *M. persicae* et extraites de la base de données Aphidbase a révélé que les mRNA du gène *ALY* sont plus exprimés que les ARN messagers du gène *Eph* dans *M. persicae* (8 fois plus dans le corps entier et 75 fois plus dans le tissu intestinal, données obtenues par Manuella Van Munster, INRA Montpellier). Ces données proviennent d'un clone de puceron (G006) différent de celui utilisé au laboratoire. Le fait que ces deux gènes soient exprimés à des niveaux différents dans le puceron *M. persicae* nous a ainsi permis de vérifier si le niveau d'expression d'un gène peut ou non être un facteur de variabilité dans l'application des méthodes de RNAi. Les résultats de cette étude sont présentés ici sous la forme de la publication parue dans la revue Viruses en octobre 2016 :

VI. Publication n°1 :

Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*

Article

Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*

Michaël Mulot ¹, Sylvaine Boissinot ^{1,†}, Baptiste Monsion ^{1,2,†}, Maryam Rastegar ^{1,3}, Gabriel Clavijo ¹, David Halter ¹, Nicole Bochet ¹, Monique Erdinger ¹ and Véronique Brault ^{1,*}

¹ Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, 28 rue de Herrlisheim, Colmar, 68021 Strasbourg, France; michael.mulot@colmar.inra.fr (M.M.); sylvaine.boissinot@colmar.inra.fr (S.B.); baptiste.monsion@supagro.inra.fr (B.M.); rastgarmaryam@gmail.com (M.R.); gaclavijo@hotmail.com (G.C.); david.halter@inra.fr (D.H.); nicole.bochet@colmar.inra.fr (N.B.); monique.erdinger@colmar.inra.fr (M.E.)

² INRA, UMR BGPI INRA-CIRAD-SupAgro, CIRAD TA-A54/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, France

³ Plant Protection Department, Shiraz University, Shiraz, Iran

* Correspondence: veronique.brault@inra.fr; Tel.: +33-389-224-934

† These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Ralf Dietzen

Received: 4 August 2016; Accepted: 11 November 2016; Published: 19 November 2016

Abstract: With the increasing availability of aphid genomic data, it is necessary to develop robust functional validation methods to evaluate the role of specific aphid genes. This work represents the first study in which five different techniques, all based on RNA interference and on oral acquisition of double-stranded RNA (dsRNA), were developed to silence two genes, *ALY* and *Eph*, potentially involved in polerovirus transmission by aphids. Efficient silencing of only *Eph* transcripts, which are less abundant than those of *ALY*, could be achieved by feeding aphids on transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing an RNA hairpin targeting *Eph*, on *Nicotiana benthamiana* infected with a *Tobacco rattle virus* (TRV)-*Eph* recombinant virus, or on in vitro-synthesized *Eph*-targeting dsRNA. These experiments showed that the silencing efficiency may differ greatly between genes and that aphid gut cells seem to be preferentially affected by the silencing mechanism after oral acquisition of dsRNA. In addition, the use of plants infected with recombinant TRV proved to be a promising technique to silence aphid genes as it does not require plant transformation. This work highlights the need to pursue development of innovative strategies to reproducibly achieve reduction of expression of aphid genes.

Keywords: gene silencing; functional validation; aphids

1. Introduction

Aphids are small sap-sucking insects belonging to the *Hemiptera* order. They display important demographic potential and adapt easily to changes in environmental conditions, causing significant damage to crops by direct feeding. Furthermore, they are vectors of numerous deleterious plant viruses, and are considered as one of the main animal pests for agriculture [1–3]. Several methods, mainly pesticide use, have been deployed in the field to reduce aphid populations, but the development of insecticide resistance has been an increasing problem for agriculture [3–5]. Additionally, the French Ecophyto 2018 plan [6], a program launched at the “Grenelle of Environment” which is aimed at reducing the use of inputs by 50% by 2018, could not be reached in the proposed period and was recently extended to 2025. In order to develop novel non-chemical methods to decrease aphid populations, or to reduce virus transmission, new molecular targets need to be discovered. The

genomes of several aphid species, *Acyrtosiphon pisum* [7], *Myzus persicae* [8], and *Diuraphis noxia* [9] are now available, which offers a tremendous opportunity to identify genes with vital functions, or which are involved in virus transmission. Bioinformatic annotation assigns a putative function to a gene, but functional validation is required for confirmation. Functional validation is usually performed by inhibiting the expression of a gene and linking a specific phenotype to a gene function. Alternatively, over-expression of a candidate gene can be applied, particularly for genes belonging to multigenic families for which inhibition of one gene can be masked by the redundant function of the other family members. RNA interference (RNAi)-based strategies have been developed in aphids to conduct gene functional validation [10–12]. RNAi is based on the detection of double-stranded RNA (dsRNA) molecules by the cell machinery, which are diced into small interfering RNAs (siRNA) of 21–25 nucleotides. Each siRNA serves as a guide strand for the degradation of all RNA molecules sharing sequence-specific homology to the siRNA [13–17]. dsRNA or mature siRNA can activate RNA degradation in insect cells, and different methods to deliver these molecules into whole aphids have been employed [12,18]. Aphids can be fed on dsRNA or siRNA sources, such as (1) in vitro-synthesized dsRNA [19–26]; (2) siRNA synthesized chemically or obtained after enzymatic cleavage of the dsRNA [27,28]; or (3) plants stably or transiently expressing dsRNA [29–34]. An alternative method to deliver dsRNA or siRNA into aphids is by microinjection, although this technique is not well adapted to a large scale analysis of genes [19,22,27,28,30,35–37]. Regardless of the delivery method (oral acquisition or microinjection), genes expressed in the gut, at the salivary gland level, in the embryos, the head, or the carcass can be affected [10]. The non-cell autonomous effect of RNAi was confirmed by tracking distribution of fluorescently-labeled dsRNA in the aphid's body after oral acquisition [24,26]. Importantly, persistent down-regulation of target genes was observed in the progeny of aphids that have been fed on transgenic plants expressing dsRNA [38].

Although several RNAi methods have been successfully applied, either to investigate aphid physiology, or to manage aphid populations, no description of any method have been so far reported to show the function of candidate genes in virus transmission by aphids. Moreover, the increasing literature on RNAi in aphids exemplifies the high degree of variability in silencing efficiency and expression inhibition seems to vary depending on the targeted gene and the method used to deliver dsRNA into the aphids. More surprisingly, silencing efficiency of a similar gene using the same method was also shown to vary depending on the laboratories conducting the experiments [19].

In this study, we sought to compare different RNAi-based silencing techniques in *M. persicae* all based on oral acquisition of long dsRNA, RNA hairpin, or siRNA. The two genes, *ALY* and *Eph*, potentially involved in polerovirus (family *Luteoviridae*) transmission by aphids were selected. Indeed, both encoded proteins displayed the ability to bind to the structural proteins of two aphid-transmitted poleroviruses in yeast (unpublished data) [39]. To confirm the role of these two genes in polerovirus transmission by aphids, it is necessary to efficiently and reproducibly inhibit expression of these genes in aphids before addressing the ability of these aphids to transmit the virus. *ALY* is a mRNA export factor which shuttles between the nucleus and the cytoplasm [40] and *Eph* plays a role in the maintenance of epithelial tissue homeostasis [41]. Both are expressed throughout the aphid body and in the gut, but *ALY* transcripts accumulated at a higher level compared to *Eph* transcripts. We were able to silence *Eph* after feeding aphids (1) on transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing an RNA hairpin; (2) on *Nicotiana benthamiana* infected with a Tobacco rattle virus (TRV)-recombinant virus; or (3) on artificial medium containing in vitro synthesized dsRNA. In contrast, we were unable to reproducibly achieve silencing of *ALY*.

2. Materials and Methods

2.1. Aphid Rearing

Colonies of *M. persicae*, and *M. persicae* ssp. *nicotianae* were reared, respectively, on pepper (*Capsicum annuum*) or tobacco (*Nicotiana tabacum*) at 20 °C with a 16 h photoperiod.

2.2. Plant Material

N. benthamiana were grown in greenhouses for four weeks before being agroinfiltrated. Agroinfiltrated plants were grown in an environment-controlled chamber at 23 °C during the day and 20 °C during the night with a 10 h photoperiod. *A. thaliana* were grown in growth chambers with the same aforementioned setup.

2.3. Constitutive and Transient Expression of RNA Hairpins in Plants

Selection of the targeted sequences used in this study was made using the E-RNAi webtool (3.2 version) [42]. The transcript sequences from *A. pisum* (based on ACYPI accessions) were used to select the target region for *M. persicae*. LacZ fragment was determined using “sequence input” method with the full-length gene from pUC18. A fragment of 249 bp (nt 1198 to 1446 on the *Eph* coding sequence, homologous to the *A. pisum* gene accession number ACYPI064034-RA) was amplified by reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) on total *M. persicae* RNA extracted using a commercial purification kit (RNeasy Plant Mini Kit, animal tissue protocol, QIAGEN, Hilden, Germany). The reverse primer contained BamHI and SmaI restriction sites, and the forward primer XbaI and AscI. The amplified DNA fragment was introduced in the sense and antisense orientations into the pFGC5941 vector (GenBank accession AY310901.1) in a sequential process: the PCR-amplified DNA fragment was first digested with AscI and SmaI and introduced into the pFGC5941 digested with the same enzymes. The recombinant plasmid bearing the sense sequence was further digested with XbaI and BamHI, and the PCR-amplified and enzyme-digested *Eph*-cDNA antisense sequence was introduced into this plasmid leading to pFGC:Eph. A similar procedure was followed to introduce a 182 bp fragment of the coding sequence of *ALY* (homologous to the *A. pisum* gene accession number ACYPI006176-RA) in sense and antisense orientations into the pFGC5941 vector. The *ALY* cDNA fragment was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from *M. persicae*. As a control, a 276 bp fragment from the *lacZ* gene was amplified by PCR from the pUC18 vector (GenBank accession L09136.1). The resulting plasmids were respectively referred to as pFGC:ALY and pFGC:LacZ. A complete list of primers used throughout the experiment is provided in Supplementary Materials Table S1. The pFGC:Eph, pFGC:ALY and pFGC:LacZ plasmids were further introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1.

To constitutively express the RNA hairpin sequences, pFGC:Eph, pFGC:ALY, and pFGC:LacZ were used to transform *A. thaliana* (Col-0) by floral dip as described by Martinez-Trujillo et al. [43]. T0 seeds were sown, and seedlings sprayed with phosphinothricin at 300 mg/L (BASTA® F1; Bayer, Leverkusen, Germany) to select positive transformants. Subsequent generations (T1 to T3) were produced by selfing and selection with BASTA® F1. Insertion of the transgene in the BASTA® F1 resistant plants was verified by PCR on fresh tissue using the KAPA3G Plant PCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA), but the number of insertions was not determined. In the experiments using the T1 progeny of transgenic plants expressing an RNA hairpin targeting *ALY* or *Eph*, *A. thaliana* transformed with an RNA hairpin targeting the *green fluorescent protein (GFP)* gene were used as control [32].

To transiently express the RNA hairpin sequences in *N. benthamiana*, *A. tumefaciens* harboring the pFGC-derived plasmids were grown to an optical density (OD) of 0.5 at 600 nm and agroinfiltrated into fully-expanded leaves of 4–6 week old plants [44].

2.4. Tobacco Rattle Virus (TRV)-Derived Constructs and Inoculation

TRV has a bipartite genome split between RNA1 and RNA2. TRV-derived constructs referred to as pTRV1 and pTRV2 were used to induce the synthesis of dsRNA and siRNA in *N. benthamiana*. PCR-amplified DNA fragments corresponding to partial sequences of *Eph* (249 bp), *ALY* (182 bp) or *lacZ* (276 bp) were obtained as described above using primers listed in Table S1. The resulting PCR products were cloned in the sense orientation into BamHI/XbaI-cut pTRV2 [45] resulting in

pTRV2-Eph, pTRV2-ALY, and pTRV2-LacZ. pTRV1 and pTRV2 derivatives were introduced into *A. tumefaciens* C58C1. The *Agrobacterium* cultures containing the TRV1-construct or the TRV2-derived plasmids were grown to an OD of 0.5 at 600 nm and mixed in equal proportions before infiltration of 4–6 week old *N. benthamiana*. Plant infection with TRV was confirmed by DAS-ELISA [46] using TRV-specific antibodies (Sediag, Bretenière, France).

2.5. Detection of Small Interfering RNA (siRNA) by Northern Blot and Small RNAs Purification for Aphid Acquisition

To evaluate siRNA accumulation in transgenic *A. thaliana* or in the agroinoculated leaves of *N. benthamiana*, total RNA was extracted from leaves using TRIzol™ Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ten micrograms of total RNA were mixed with an equal volume of deionized formamide and denatured for 5 min at 95 °C. Total RNAs were resolved on a 17.5% polyacrylamide gel (19:1 acrylamide-bisacrylamide ratio, 7 M urea in Tris-Borate-EDTA buffer 0.5X) and blotted onto an Amersham Hybond-NX membrane (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) by liquid transfer (Bio Rad, Criterion Blotter, Hercules, CA, USA) for 75 min at 80 V/300 mA. RNAs were fixed on the membrane by UV crosslinking (120,000 µJ/cm², Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker; Spectronics, Westbury, NY, USA). DNA probes were prepared by PCR amplifications of 249 bp fragment for *Eph*, 182 bp fragment for *ALY* and 276 bp fragment for *lacZ* using primers listed in Supplementary Materials Table S1. In a second step, the PCR products were further labeled using a Klenow fragment (Roche, Basel, Switzerland) with digoxigenin (DIG) dUTP (Roche). Alternately, *ALY*-probe was labeled with ³²P. To ensure equal loading of RNA, blots were hybridized with a probe targeting the U6 RNA (Supplementary Materials Table S1). The signals were detected using the chemiluminescence kit (CDP-Star; Roche) when using a DIG-labeled probe, or by autoradiography when using the radioactive probe.

The small RNAs were further precipitated from total RNA before delivery to aphids by membrane feeding. The RNA pellet from the Trizol extraction procedure was washed three times with 70% ethanol to eliminate toxic phenol traces before being suspended in RNase-free water. An equal volume of 20% PEG 8000 was then added to the total RNA suspension together with 1/10 volume of NaCl 5M. After a one hour incubation on ice, the mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant containing the small RNAs was mixed with three volumes of 100% ethanol before incubation at −20 °C for 2 h. After centrifugation at 13,000 rpm for 30 min at 4 °C, the pellet was washed 3 times with ethanol 70%, then resuspended in RNase-free water. Integrity of the small RNAs was checked by diluting in an equal volume of formamide and running at 50 V in TAE 0.5X.

2.6. In Vitro-Synthesized double-stranded RNA (dsRNA)

In vitro dsRNA fragments were produced using the RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit (Promega, Madison, WI, USA) on PCR fragments made from LITMUS 28i recombinant vectors (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The recombinant plasmids were obtained after introducing a 249 bp *Eph* fragment, a 182 bp *ALY* fragment, or a 276 bp *lacZ* fragment, synthesized by RT-PCR of total RNA extracted from *M. persicae* for the Eph and ALY constructs, or by PCR of pUC18 for the LacZ construct. These PCR fragments were digested by BamHI and XbaI before being introduced into LITMUS 28i digested with the same enzymes. To synthesize dsRNA, the recombinant LITMUS 28i vectors were used as templates to synthesize PCR fragments containing the introduced sequences flanked by T7 promoters at both extremities using T7 primers. PCR fragments were then purified with MSB™ Spin PCRapace system (Stratagene, Birkenfeld, Germany) and used as template for in vitro transcription. The transcription mixtures containing both sense and anti-sense RNAs were denatured at 96 °C for 5 min and annealing of both RNA strands was performed by a progressive decrease to room temperature. RNase H and DNase Q1 treatments were subsequently performed on dsRNA for 20 min at 37 °C to remove DNA templates and single-stranded RNA. dsRNA were further purified using the MEGAClear™ Transcription Clean-Up Kit, (Thermo Fisher Scientific Ambion™, Austin,

TX, USA), spectrophotometrically quantified at 260 nm (Nanodrop 2000; Thermo Fisher Scientific), subjected to agarose gel electrophoresis to determine purity and stored at -20°C before use.

2.7. dsRNA and/or siRNA Acquisition by *M. persicae*

For all the delivery methods, the acquisition time was selected in order to reach the maximum uptake of dsRNA and/or siRNA while maintaining a good survival rate of the aphids. These acquisition times varied, therefore, between the different dsRNA and/or siRNA sources.

On transgenic *A. thaliana* expressing hairpin constructs, fourth instar or adult individuals of *M. persicae* were deposited on the transgenic plants for two days. Adults were then removed, and nymphs born on the transgenic plants were kept for 10 to 13 additional days before collection for RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis.

From *N. benthamiana* infiltrated with the hairpin constructs, acquisition of siRNA or RNA hairpin by *M. persicae* ssp. *nicotianae* was performed by placing 1st instar for 10 days on leaf discs cut from infiltrated leaves. The leaf discs were placed on top of 1% water agarose in small Petri dishes covered with a mesh, and were replaced with fresh infiltrated (five or six days post-infiltration) leaf discs every three days during a 10-day period to ensure consistent high levels of siRNA throughout the experiment.

Acquisition of small RNAs extracted from the aforementioned infiltrated leaves of *N. benthamiana* was done by feeding 4th instars or adults of *M. persicae* onto an artificial medium containing the small RNA fraction diluted in sucrose (20% final concentration) for a period ranging from 24 h to three days. Younger aphid stages did not survive onto this preparation.

M. persicae ssp. *nicotianae* (2nd instars) were deposited on *N. benthamiana* detached leaves from TRV-infected plants that were first washed and gently rubbed on their surface [47]. This leaf treatment improved aphid survival until seven days after deposition, when aphids started to decline and were collected for analysis. For *M. persicae* acquisition of dsRNA synthesized in vitro, 4th instars or adults were artificially fed for 72 h on dsRNA diluted in sucrose (20% final concentration) or in MP148 [47] placed between two Parafilm MTM layers. For each experimental condition, approximately 150 to 200 individuals were placed in a single black feeding chamber.

All experimental devices i.e. plant material infested with aphids, or aphids fed artificially, were placed in a containment growth chamber at 23°C day and 20°C night with a 10 h photoperiod.

2.8. RNA Extraction from Whole Aphids or Guts

Total RNA was extracted from whole *M. persicae* (8–20 aphids were pooled in each sample) using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) following the procedure for animal tissue. Aphids were first ground with a pestle in the RLT lysis buffer in Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). RNA was eluted in 50 μL of RNase-free water. Total RNA was also extracted from dissected guts. Dissection was performed by first immobilizing aphids on double-sided tape and then pulling with tweezers the aphid's head which comes along the foregut, the anterior midgut, and part of the posterior midgut. After removing the heads, 100 guts were pooled and collected in cold RLT lysis buffer from RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Total RNA was extracted as described above, except that grinding with pestles was avoided and the tube was placed in dry ice before RNA purification. RNA was eluted in 24 μL of RNase-free water and quantified at 260 nm with the Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). These batches of RNA corresponding to several aphids or several guts extracts were reverse transcribed and analyzed by real-time PCR.

2.9. Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) and Biological Repeats

For qRT-PCR, complementary DNA (cDNA) was first synthesized using oligo (dT) 15 Primer (Promega) with the M-MLV reverse transcriptase kit (Promega) starting from 200–1000 ng of total RNA from guts or whole aphids, respectively. qRT-PCR reactions were performed in triplicates in 96-well optical plates using 10 to 50 ng of cDNA, 0.6 μL of each primer at 10 mM, and 10 μL of SYBRTM Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), in a final volume of 20 μL . The primers used to amplify *ALY*-

or *Eph*-mRNA were located outside the target sequences to avoid amplification in the aphids of the acquired dsRNA. The qRT-PCR reactions were conducted on a CFX cycler (Bio-Rad) initiated with a 3 min incubation at 90 °C, followed by 40 cycles of amplification (10 s at 95 °C, 30 s at 60 °C). Melt curve analysis was performed from 60 °C to 95 °C with 5 s of 0.5 °C increments. Threshold cycle (CT) values were calculated using Bio-Rad CFX Manager™ software (Bio-Rad). Relative expression levels were normalized to *Rpl7* [35] and *L27* [28] (Supplementary Materials Table S1) by subtracting the control CT values from CT values of *Eph*/*ALY*, to yield the Δ CT. The stability of *Rpl7* and *L27* expression was verified in five batches of 15 *M. persicae* adults or three batches of 80–90 digestive tubes collected from adults (in whole aphids, mean Cq values for *rpl7*: 20.27 ± 0.08 or *L27*: 16.28 ± 0.07 and in guts, mean Cq values for *rpl7*: 20.54 ± 0.07 or *L27*: 16.65 ± 0.05). The specificity of PCR primers was assessed by melting curve analysis of PCR products, and average amplification efficiency was determined by Bio-Rad CFX Manager™ software. The relative expression levels of *Eph* and *ALY* were calculated using the $\Delta\Delta$ CT method. The results were analyzed for significant differences with Student's *t*-test in which *n* = 3 refers to technical triplicates.

For all different RNAi methods, biological repeats were conducted when a reduction of the expression of the target gene was observed at least once. When the method resulted in an overexpression of the target gene or in instability of the reference genes for the four conditions tested (*Eph* and *ALY*, whole aphids, and guts), it was not systemically repeated.

3. Results

3.1. Selection of the Candidate Genes to be Silenced in *M. persicae*

In order to evaluate the efficacy of different RNAi-based silencing techniques in aphids, we selected two genes from *M. persicae*, *Eph* and *ALY*, that are potentially involved in polerovirus transmission. To confirm the function of these genes in the aphid transmission process, functional validation is required which can be addressed by analyzing virus transmissibility of aphids in which expression of these genes is inhibited. *ALY* transcripts accumulated at a higher level compared to *Eph* mRNA in non-viruliferous *M. persicae*, which provided the opportunity to compare the efficacy of the silencing techniques with two genes that have different baseline levels of transcript abundance. *Eph*, a homolog of the Mammalian Ephrin receptor (Eph), encodes a membranous tyrosine kinase receptor and is involved in cell communication, clathrin-mediated endocytosis, and cellular trafficking [48]. *ALY* encodes a nuclear protein known to be involved in mRNA trafficking between nucleus and cytoplasm [40,49]. RNA sequencing data analysis from Aphidbase revealed that *ALY*-mRNA was about eight-fold and 75-fold more abundant in whole aphids and gut cells, respectively, compared to *Eph*-mRNA. These data were obtained from female adults of a different aphid clone than the one used in the present study. We however verified the higher accumulation of *ALY*-mRNA compared to *Eph*-mRNA in whole aphids and in guts by qRT-PCR using the *M. persicae* clone reared in the laboratory (data not shown). Expression of *ALY* and *Eph* was also confirmed by RT-PCR in *M. persicae* ssp. *nicotianae*, another clone of *M. persicae* used in some of the following experiments (Figure 1).

The aphid gene sequences that were targeted by RNAi met several criteria as the specificity for the target gene in *M. persicae* and a length of about 200 bp. *ALY* has a short coding sequence (801 bp) and the target sequence of 182 bp corresponds to 22.7% of this sequence. On the other hand, *Eph* is a larger gene (about 3200 bp) which mRNA is subjected to alternative splicing, giving rise to different variants [50]. The target sequence of 249 bp is included in a central sequence shared by all *Eph*-mRNA and represents around 7.7% of the coding sequence. None of the selected sequences share a perfect homology of more than 14 bp with the genomic sequences of *A. thaliana* or *N. benthamiana*. These sequence homologies are not sufficient to induce silencing of genes in these two plant species. A 276 bp sequence from the *lacZ* gene served as a control in all RNAi-based experiments. This bacterial sequence does not share any identity with the genome of either *M. persicae* or the aphid primary symbiont

Buchnera aphidicola. The target sequences have different GC content, 35.0%, 51.2%, and 55.0% for *ALY*, *Eph* and *lacZ*, respectively, which could account for differential stability of the dsRNA.

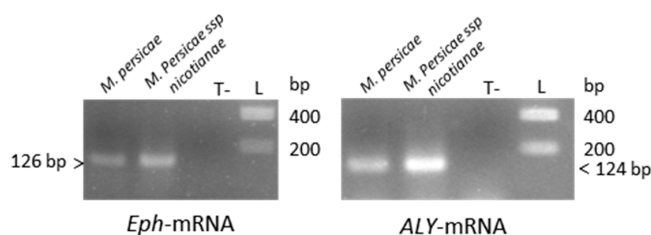


Figure 1. Detection of *ALY*- and *Eph*-mRNA in *M. persicae* (Sulzer) or in *M. persicae* ssp. *nicotianae* by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR; Supplementary Materials Table S1). PCR amplified fragments were loaded on a 1.5% agarose gel and visualized by UV after ethidium bromide staining. This detection is not quantitative since different amounts of RNA have been used in the RT-PCR reactions. T-: negative control, L: DNA ladder.

3.2. Acquisition of dsRNA or siRNA from Plants Constitutively Expressing RNA Hairpins

One of the strategies employed to inhibit the expression of *ALY* and *Eph* genes in aphids was the feeding of aphids on plants constitutively expressing RNA hairpin structures targeting the genes of interest. This strategy has already been validated in numerous studies with aphids [29,31–34,38,51–53]. The fragment of 249 bp from the *Eph* coding sequence was introduced in sense and antisense orientations into the pFGC5941 vector. These two sequences were separated by the chalcone synthase intron sequence, and the whole construct was placed under the control of the 35S promoter of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). A similar strategy was followed to introduce the 182 bp inverted tandem sequence of *ALY* into pFGC5941. These recombinant plasmids were used to transform *A. thaliana* by floral dip, and the resulting transgenic plants were referred to as Hp-*ALY* and Hp-*Eph*. Transcription of the introduced sense and antisense sequences in the transgenic plants is expected to result in the synthesis of RNA hairpin structures that can further be processed into siRNA by the silencing machinery of the plants. Control plants designed to produce the 276 bp RNA-hairpin sequence targeting the *lacZ* gene (plants named Hp-*LacZ*) were also engineered. Processing of the RNA hairpin into siRNA was further analyzed by northern blot in two to four plants from independent lines of the T1 (Figure 2) or T3 (not shown) progenies. Presence of small RNAs derived from the hairpin sequences was observed in lines transformed with Hp-*Eph*, Hp-*ALY* and Hp-*LacZ*, although variability in siRNA accumulation was sometimes observed between lines. In particular, Hp-*Eph* plants from line 1 of the T1 progeny accumulated a slightly higher level of siRNA compared to line 2 (Figure 2a). Specificity of each probe was controlled on RNA extracts from non-transformed Col-0 plants (Figure 2a for *Eph*-probe; not shown for other probes). Overall, we observed that all of the transgenic plants designed to express RNA hairpins accumulated siRNA corresponding to the introduced hairpins with no major differences between the different progenies (not shown).

To address whether aphid feeding on the transgenic plants Hp-*Eph* or Hp-*ALY* expressing RNA hairpins could induce a reduction of *Eph*-mRNA or *ALY*-mRNA accumulation, *Eph*- and *ALY*-mRNA accumulation was measured by qRT-PCR on *M. persicae* fed on these plants. Although inhibition of *Eph* expression was reproducibly observed in aphids fed on plants from the T1 progeny, no such consistent results were obtained when using the T3 progeny (Table 1A). It is interesting to point out that the silencing efficiency of *Eph* was more pronounced in aphids fed on line 1 plants of Hp-*Eph*, which is also the line that accumulated more siRNA (Figure 2a). Surprisingly, some experiments showed an over-accumulation of *Eph*-mRNA in aphids fed on Hp-*Eph* (for example, 12% over-expression in one replicate of Exp. 6, Table 1A). These unexpected data may correspond to a genuine increase of *Eph*-mRNA, as it was already reported 24 h after acquisition of dsRNA targeting the *Cathepsin-L* gene in *A. pisum* [22], but could also represent intrinsic variability between biological samples. Taking

into account this potential variability in the results, we thereafter considered a true inhibition of gene expression when the mRNA accumulation of the targeted gene was at least reduced by 25%.

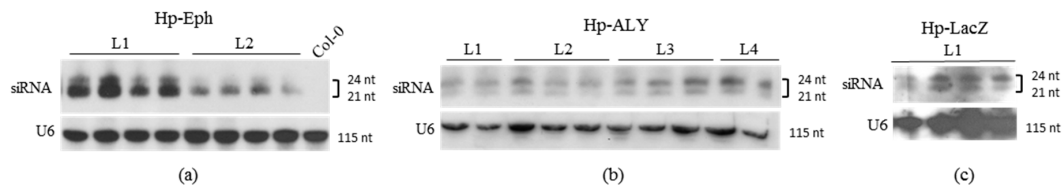


Figure 2. Small interfering RNA (siRNA) detection in *A. thaliana* (a) Hp-Eph; (b) Hp-ALY and (c) Hp-LacZ. Total RNA was extracted from four-week old seedlings of the T1 progeny of transgenic *A. thaliana*. Each lane was loaded with 20 µg of total RNA and the blots were hybridized with digoxigenin (DIG)-labeled probes, except in (b), where radioactive probes were used to detect U6 RNA and *ALY*-siRNA. The other blots were further stripped and hybridized with a DIG-labeled U6 probe as a loading control. Col-0: total RNA extract from a non-transformed *A. thaliana* Col-0 plant.

Table 1. Silencing efficiency of *Eph* in whole *M. persicae* using different RNA interference (RNAi)-based methods.

Aphid Feeding Source	Exp.	Plant or RNA Concentration	AAP ^b	Relative Fold Change <i>Eph</i> -mRNA in Whole <i>M. persicae</i> ^c
A	1	Ara:Hp-Eph (T1) line 1	10 d	0.248 ± 0.037 (−75.2%) ^{d,*}
		Ara:Hp-Eph (T1) line 2		0.873 ± 0.103 (−12.7%) ^d
	2	Ara:Hp-Eph (T1) line 1	10 d	0.140 ± 0.065 (−86.0%) ^{d,*}
		Ara:Hp-Eph (T1) line 2		0.533 ± 0.089 (−46.7%) ^{d,*}
	3	Ara:Hp-Eph (T3)	10 d	0.818 ± 0.032 (−18.2%) [*]
		Ara:Hp-Eph (T3)		1.032 ± 0.024 (+3.2%)
B	4	Ara:Hp-Eph (T3)	10 d	1.048 ± 0.028 (+4.8%)
		Ara:Hp-Eph (T3)		1.027 ± 0.060 (−2.8%)
	5	Ara:Hp-Eph (T3)	10 d	0.843 ± 0.049 (−15.7%) [*]
		Ara:Hp-Eph (T3)		1.065 ± 0.055 (+6.5%)
	6	Ara:Hp-Eph (T3)	13 d	0.914 ± 0.43 (−8.6%) [*]
		Ara:Hp-Eph (T3)		0.882 ± 0.078 (−11.8%)
C	1	Ara:Hp-Eph (T3)	13 d	1.120 ± 0.068 (+12.0%)
		Ara:Hp-Eph (T3)		0.726 ± 0.034 (−27.3%) [*]
	2	Bentha:Hp-Eph	10 d	<i>unstable reference genes</i> ^f
		Bentha:TRV-Eph		0.581 ± 0.018 (−41.9%) ^{*,e}
	3	siRNA 60 ng/µL	24 h	0.581 ± 0.012 (−41.9%) [*]
		siRNA 120 ng/µL		1.143 ± 0.054 (+14.3%)
D	4	siRNA 70 ng/µL	36 h	0.856 ± 0.042 (−14.4%) ^{NA}
		siRNA 100 ng/µL		0.832 ± 0.048 (−16.8%) ^{NA}
	5	siRNA 100 ng/µL	72 h	0.936 ± 0.077 (−6.3%)
		siRNA 100 ng/µL		1.056 ± 0.060 (+5.6%)
	6	siRNA 100 ng/µL	72 h	<i>unstable reference genes</i>
		siRNA 100 ng/µL		<i>unstable reference genes</i>
E	1	dsRNA-Eph	72 h	0.902 ± 0.013 (−9.8%) [*]
		dsRNA 100 ng/µL		0.917 ± 0.092 (−8.3%)

^a In brackets: *A. thaliana* T1 or T3 progeny; ^b Acquisition Access Period; ^c Relative fold change of *Eph*-mRNA accumulation ± standard deviation of triplicates; In brackets, the level of expression compared to aphids fed on control conditions (*A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* transiently expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* infected with a recombinant TRV-LacZ, in vitro synthesized dsRNA-LacZ). Each result corresponds to one pool of 20 aphids; In bold, the samples of aphids in which silencing of *Eph* was observed; In grey, samples in which *Eph*-mRNA was reduced by more than 25%; ^d *A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting GFP used as control; ^e In this experiment, only the *Rpl7* reference gene has been used because of instability of the *L27* gene; ^f unstable reference genes: *Rpl7* and *L27* genes were not expressed at the same level in aphids being subjected to different treatments; * indicates significant differences between aphids fed on LacZ control and aphids that have acquired silencing molecules targeting *Eph* (Student's *t*-test, *p* < 0.05); ^{NA} Analysis of variance not applicable; Exp., experiment; d, days; h, hours; TRV, Tobacco rattle virus; dsRNA, double-stranded RNA; siRNA, small interfering RNA.

When aphids feed on transgenic *A. thaliana*, the orally acquired long dsRNA or processed siRNA must be first internalized into *M. persicae* intestinal cells. We, therefore, addressed whether the inhibition of *Eph* expression could also be observed in aphid guts. *Eph*-mRNA accumulation was measured specifically in the gut cells after dissecting the aphid guts seven days after feeding on Hp-Eph. This experiment was performed on aphids fed on the T3 or T4 progenies of Hp-Eph. Although no consistent silencing was observed in whole aphids fed on T3 transgenic lines, an 87% decrease of *Eph*-mRNA accumulation was observed at the gut level (Table 2A). It should be mentioned that the same batch of aphids was used to analyze gene expression in whole insects and in guts. This result suggests that inhibition of *Eph* expression is probably effective in aphids fed on the T3 progeny of Hp-Eph but at a level which can only be observed when analyzing aphid guts. However, no such sustained inhibition of *Eph* expression at the gut level was obtained when feeding aphids on the T4 progeny (Table 2A), suggesting a variability in the silencing efficiency between plant generations.

Table 2. Silencing efficiency of *Eph* in *M. persicae* guts using different RNAi-based methods.

	Aphid Feeding Source	Exp.	Plant or RNA Concentration	AAP ^b	Relative Fold Change <i>Eph</i> -mRNA in <i>M. persicae</i> Guts ^c
A	Transgenic <i>A. thaliana</i> expressing Hp-Eph ^a	1	Ara:Hp-Eph (T3)	7 d	0.126 ± 0.021 (−87.4%) *
		2	Ara:Hp-Eph (T4)		0.928 ± 0.062 (−7.8%)
B	<i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp-Eph	1	Bentha:Hp-Eph	10 d	1.038 ± 0.037 (+3.8%)
C	<i>N. benthamiana</i> infected with TRV-Eph	1	Bentha:TRV-Eph	7 d	0.812 ± 0.013 (−18.8%) *
		2			0.441 ± 0.037 (−55.9%) *
D	siRNA purified from <i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp-Eph	1	siRNA 100 ng/μL	72 h	<i>unstable reference gene</i> ^d
E	In vitro-synthesized dsRNA-Eph	1	dsRNA 200 ng/μL	72 h	0.470 ± 0.021 (−53.0%) *
		2	dsRNA 400 ng/μL		0.153 ± 0.015 (−84.7%) *

^a In brackets: *A. thaliana* T3 or T4 progeny; ^b Acquisition Access Period; ^c Relative fold change of *Eph*-mRNA accumulation ± standard deviation of triplicates. In brackets the level of expression compared to aphids fed on control conditions (*A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* transiently expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* infected with a recombinant TRV-LacZ, in vitro synthesized dsRNA-LacZ). Each result corresponds to one pool of 100 aphid guts. In bold, the samples of aphids in which silencing of *Eph* was observed. In grey, samples in which *Eph*-mRNA was reduced by more than 25%; ^d unstable reference genes: *Rpl7* and *L27* genes were not expressed at the same level in aphids being subjected to different treatments; * indicates significant differences between aphids fed on LacZ control and aphids that have acquired silencing molecules targeting *Eph* (Student's *t*-test, *p* < 0.05).

When aphids were fed on Hp-ALY plants, no visible down-regulation of *ALY* was observed in whole aphids or in guts (Tables 3A and 4A).

Table 3. Silencing efficiency of *ALY* in whole *M. persicae* using different RNAi-based methods.

	Aphid Feeding Source	Exp.	Plant or RNA Concentration	AAP ^b	Relative Fold Change <i>ALY</i> -mRNA in Whole <i>M. persicae</i> ^c
A	Transgenic <i>A. thaliana</i> expressing Hp- <i>ALY</i> ^a	1	Ara:Hp- <i>ALY</i> (T1)	10 d	0.862 ± 0.105 (−13.8%) ^{d *}
		2			1.177 ± 0.023 (+17.7%) ^{d *}
		3			1.040 ± 0.026 (+4.0%) ^d
		4			1.079 ± 0.161 (+7.9%) ^d
B	<i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp- <i>ALY</i>	1	Bentha:Hp- <i>ALY</i>	10 d	unstable reference genes ^e
D	<i>N. benthamiana</i> infected with TRV- <i>ALY</i>	1	Bentha:TRV- <i>ALY</i>	7 d	0.881 ± 0.033 (−11.9%)
		2			0.847 ± 0.033 (−15.3%) [*]
C	siRNA purified from <i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp- <i>ALY</i>	1	siRNA 100 ng/μL	72 h	unstable reference genes
E	In vitro synthesized dsRNA- <i>ALY</i>	1	dsRNA 400 ng/μL	72 h	1.041 ± 0.037(+4.0%)

^a In brackets: *A. thaliana* T1 progeny; ^b Acquisition Access Period; ^c Relative fold change of *ALY*-mRNA accumulation ± standard deviation of triplicates. In brackets the level of expression compared to aphids fed on control conditions (*A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* transiently expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* infected with a recombinant TRV-*LacZ*, in vitro synthesized dsRNA-*LacZ*). Each result corresponds to one pool of 20 aphids. In bold, the samples of aphids in which silencing of *ALY* was observed; ^d *A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting GFP used as control; ^e unstable reference genes: *Rpl7* and *L27* genes were not expressed at the same level in aphids being subjected to different treatments. * indicates significant differences between aphids fed on *LacZ* control and aphids that have acquired silencing molecules targeting *ALY* (Student's *t*-test, *p* < 0.05).

Table 4. Silencing efficiency of *ALY* in *M. persicae* guts using different RNAi-based methods.

	Aphid Feeding Source	Exp.	Plant or RNA Concentration	AAP ^b	Relative Fold Change <i>ALY</i> -mRNA in <i>M. persicae</i> Guts ^c
A	Transgenic <i>A. thaliana</i> expressing Hp- <i>ALY</i> ^a	1	Ara:Hp- <i>ALY</i> (T3)	13 d	1.315 ± 0.055 (+31.5%) [*]
		2		13 d	1.062 ± 0.007 (+6.2%) [*]
B	<i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp- <i>ALY</i>	1	Bentha:Hp- <i>ALY</i>	10 d	1.073 ± 0.051 (+7.3%)
C	<i>N. benthamiana</i> infected with TRV- <i>ALY</i>	1	Bentha:Hp- <i>ALY</i>	7 d	1.136 ± 0.036 (+13.6%) [*]
		2			0.915 ± 0.023 (−8.5%) [*]
D	siRNA purified from <i>N. benthamiana</i> transiently expressing Hp- <i>ALY</i>	1	siRNA 100 ng/μL	72 h	unstable reference genes ^d
E	In vitro-synthesized dsRNA- <i>ALY</i>	1	dsRNA 400 ng/μL	72 h	0.263 ± 0.023 (−73.7%) [*]
		2			0.942 ± 0.039 (−5.8%)

^a In brackets: *A. thaliana* T3 progeny; ^b Acquisition Access Period; ^c Relative fold change of *ALY*-mRNA accumulation ± standard deviation. In brackets the level of expression compared to aphids fed on control conditions (*A. thaliana* constitutively expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* transiently expressing dsRNA targeting *lacZ*, *N. benthamiana* infected with a recombinant TRV-*LacZ*, in vitro synthesized dsRNA-*LacZ*). Each result corresponds to one pool of 100 aphid guts. In bold, the samples of aphids in which silencing of *ALY* was observed. In grey, samples in which *ALY*-mRNA was reduced by more than 25%; ^d unstable reference genes: *Rpl7* and *L27* genes were not expressed at the same level in aphids being subjected to different treatments; * indicates significant differences between aphids fed on *LacZ* control and aphids that have the silencing molecules targeting *ALY* (Student's *t*-test, *p* < 0.05).

3.3. Acquisition of dsRNA/siRNA from Plants Expressing Transiently RNA Hairpins

The second strategy we used to decrease *Eph* and *ALY* expression was the transient expression in *N. benthamiana* of RNA hairpins targeting these two aphid genes. The recombinant plasmids pFGC:Eph and pFGC:ALY previously used to stably transform *A. thaliana* were introduced into *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration. As shown in Figure 3a, a high accumulation of siRNA was observed 5–6 days after infiltration. Aphid acquisition of siRNA or RNA hairpin was performed using *M. persicae* ssp. *nicotianae* clone since these aphids are well adapted to *N. benthamiana*, unlike *M. persicae* for which we observed a high mortality on this plant species. Unfortunately, the real-time RT-PCR

data obtained from whole aphids fed for 10 days on *N. benthamiana* transiently expressing Hp-Eph or Hp-ALY could not be used due to unstable values of the reference genes between different samples (Tables 1B and 3B). Unexpectedly, such variation in the reference gene values was not observed in guts dissected from these aphids, but no down-regulation of either *Eph*- or *ALY*-mRNA was observed (Tables 2B and 4B).

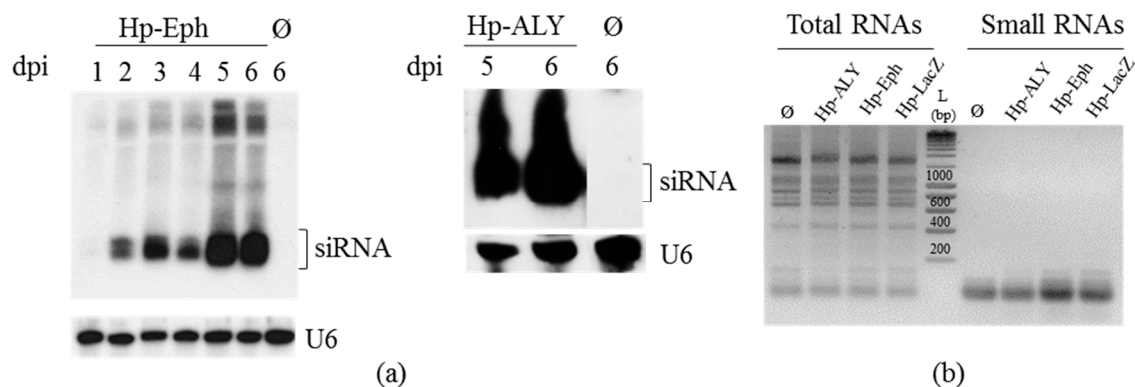


Figure 3. (a) siRNA detection and purification from *N. benthamiana* transiently expressing Hp-Eph and Hp-ALY. siRNA were extracted at different days after infiltration (dpi) of *N. benthamiana* leaves with *Agrobacterium* carrying pFGC5941-derived plasmids expressing hairpin RNAs targeting *Eph* or *ALY*. Each lane was loaded with 10 µg of PEG-purified small RNAs and the blots were hybridized with DIG-labeled probes. The blot on the left was further stripped and hybridized with a DIG-labeled U6 probe as loading control, whereas the U6-probe was added together with the ALY-probe in the blot on the right. The two panels of this blot were manually organized (probe detection placed under siRNA) for consistency. Ø: Non-infiltrated *N. benthamiana* leaves; (b) 2.5% agarose gel loaded with 1.0 to 1.8 µg of total RNAs extracted from *N. benthamiana* leaves five days after infiltration with *Agrobacterium* bearing pFGC5941-derived plasmids expressing hairpin RNAs targeting *Eph*, *ALY* and *lacZ*. Small RNAs were purified with PEG and used for aphid feeding; 0.8 to 1.0 µg of small RNAs were loaded on the gel. The gel was stained with ethidium bromide. The size (in bp) of the DNA ladder (L) is indicated.

In order to increase the amount of siRNA potentially acquired by aphids from the infiltrated leaves, small RNAs were purified from leaves infiltrated with one of the following constructs, pFGC:Eph, -ALY or -LacZ, five days after agroinfiltration. As shown in Figure 3b, enriched fractions of small RNAs were recovered from total RNAs, which contained a mixture of small RNAs, including siRNA and miRNAs. These small RNA-enriched samples were delivered to aphids by membrane feeding. Aphid viability was affected when feeding on this medium and we, therefore, tested different concentrations of small RNAs in the aphid diet (from 60 to 120 ng/µL) and different acquisition times (24 h to 3 days) to select the optimal conditions for this assay. Using a concentration of small RNAs of 100 ng/µL and a 72 h-acquisition time (conditions kept for the other experiments), we obtained a good aphid survival rate, but did not obtain consistent silencing of *Eph* in whole insects (Table 1C). Important modifications in the aphid metabolism probably occurred when feeding for three days on purified small RNA preparations targeting *Eph* or *ALY*, since no exploitable data of the reference genes were obtained for any of the conditions tested (Tables 1D, 2D, 3D and 4D). From these experiments, we can conclude that delivering significant amounts of small RNAs to aphids may induce perturbations of aphid metabolism that are not compatible with accurate measurement of transcripts accumulation.

3.4. RNAi-Based Silencing by Feeding Aphids on Plants Infected with a TRV-Recombinant Virus

Double-stranded RNA viral replication intermediates can initiate the RNAi mechanism, ultimately resulting in the production of siRNA targeting the whole viral genome. Therefore, introducing a foreign sequence into the viral genome can lead to the production of siRNA targeting the introduced sequence and also any mRNA sharing homology with this sequence, a mechanism referred to as

virus-induced gene silencing (VIGS) [54,55]. Partial sequences from *Eph*, *ALY* or *lacZ* genes were inserted into TRV-RNA2, and different recombinant TRV-RNA2 constructs were agroinfiltrated in *N. benthamiana* together with TRV1 [45]. Plant infection with TRV was confirmed by DAS-ELISA four weeks post-inoculation and the presence of the inserted sequence in the viral progeny was also verified by RT-PCR on total RNA extracted from non-inoculated leaves using specific primers (data not shown). *N. benthamiana* plants inoculated with TRV1 and one of the following recombinant constructs TRV2-Eph, TRV2-ALY, or TRV2-LacZ displayed milder symptoms compared to plants inoculated with TRV1 and the non-recombinant TRV2 (Figure 4). This observation has already been reported in tomato inoculated with TRV-derived constructs and seems to be linked to the introduction of exogenous sequences in TRV2 [56]. As in previous studies, however, no change in virus accumulation measured by DAS-ELISA was observed (data not shown).

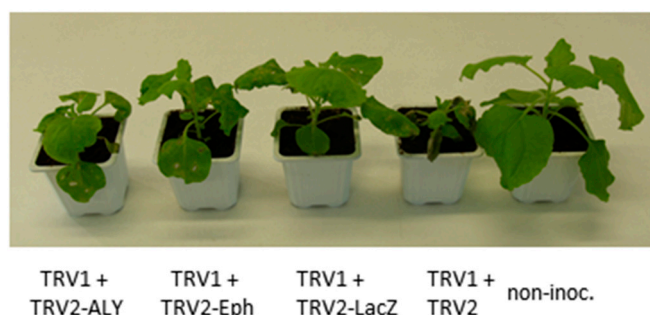


Figure 4. Development of *N. benthamiana* infected with recombinant Tobacco rattle virus (TRV). *N. benthamiana* eight days after infiltration with a mixture of *Agrobacterium* containing TRV1 and TRV2 constructs, or one of the following TRV2-derivatives: TRV2-Eph), TRV2-ALY, or TRV2-LacZ. non-inoc.: non-inoculated *N. benthamiana*.

Interestingly, when *M. persicae* ssp. *nicotianae* (second instar nymphs) were deposited on recombinant TRV-infected *N. benthamiana*, *Eph*-mRNA accumulation was reduced in whole aphids by 41.9% in two independent experiments (Table 1C) and by 18.8% and 55.9% in the aphid guts (Table 2C). The level of *ALY* silencing in aphids fed on *N. benthamiana* infected with TRV-ALY was much lower in whole aphids (11.9% and 15.3% reduction of *ALY*-mRNA) compared to the silencing obtained for *Eph* and was not reproducibly obtained in aphid guts (Tables 3C and 4C).

3.5. RNAi-Based Silencing by Artificial Feeding on In Vitro Synthesized dsRNA

In vitro-synthesized dsRNA of 249 bp for *Eph*, 182 bp for *ALY*, and 276 bp for *lacZ* (Figure 5), were delivered to aphids in an artificial medium. When using a 72 h acquisition period and a concentration of 100 ng/ μ L for the dsRNA, no significant reduction of *Eph*-mRNA accumulation (8.3% to 9.8% inhibition) was obtained in whole aphids (Table 1E). By raising the dsRNA concentration in the aphid diet to 200 and 400 ng/ μ L, a 53% and 84.7% of *Eph*-mRNA inhibition was observed in the aphid guts, respectively (Table 2E). Silencing of *ALY* was not observed in whole aphids fed for three days on an artificial medium containing 400 ng/ μ L of dsRNA targeting *ALY* (Table 3E), but when we analyzed the aphid guts of aphids from the same experimental set-up, a high silencing of *ALY* was obtained in one experiment (73% of *ALY* expression inhibition) out of the two performed (Table 4E). The discrepancy between these two experiments may be attributed to the gut dissection procedure that could release cellular contents and potentially inhibitory components affecting the qRT-PCR reaction.

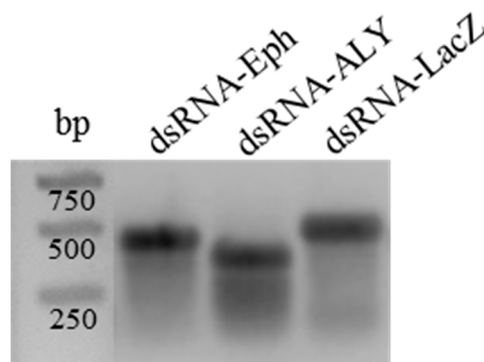


Figure 5. Electrophoretic mobility of in vitro synthesized double-stranded RNA (dsRNA). 800 ng of dsRNA-Eph, -ALY, and -LacZ synthesized in vitro were deposited on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Sizes (in bp) of the molecular markers are indicated. Due to the double-stranded structure of the RNA, their mobility is reduced.

4. Discussion

RNAi-based techniques have previously been developed to conduct functional validation in several aphid species. However, the reduction of accumulation of the targeted gene transcripts varies considerably depending on the gene and the method used to deliver dsRNA to aphids. This significant variability in RNAi efficiencies complicate the choice of a functional validation technique when analyzing the function of a selected gene. Our main objective was to compare the efficiency of several RNAi methods for their capacity to inhibit the expression of two genes in *M. persicae*, *ALY* and *Eph*, which are potentially involved in polerovirus transmission by aphids, but for which a functional validation assay is required to ascertain their function. Even though candidate genes have been identified as potential virus receptors in aphids [57–60], no functional validation was yet reported, likely due to the difficulty to obtain a significant and reproducible inhibition of the candidate genes in aphids. In particular, the identification of the first receptor for *Pea enation mosaic virus* (family *Luteoviridae*) in *A. pisum*, the alanyl aminopeptidase N, was based on in vitro experiments and in vivo competition experiments between the virus and a peptide potentially mimicking the viral determinant binding the aphid receptor [61,62]. The discovery of candidate genes reinforces the necessity to assess the efficacy of functional validation methods to confirm the role of virus receptor candidates in aphids. The work described in this paper is, however, not a comprehensive exploration of all technical means to achieve gene silencing in aphids, as several methods potentially able to target an aphid gene were not included in the analysis (microinjection of synthetic siRNA or dsRNA and oral acquisition of synthetic siRNA, for example). However, this is the first study in which several silencing methods were assessed in a single laboratory using the same genes, similar aphid clones, and assessment criteria (qRT-PCR), thus eliminating a number of potentially significant sources of variation. In addition, all methods targeted the same region of each gene which corresponds to part of the coding sequence. Additionally, oral acquisition of the silencing molecules (long dsRNA, RNA hairpin, or siRNA) offers the possibility to adapt the silencing strategy to large scale analyses of aphid genes.

4.1. Oral Acquisition of dsRNA/siRNA from Transgenic Plants, from Plants Infected with Recombinant TRV, and from In Vitro-Synthesized Transcripts Are the Most Efficient Gene Silencing Methods in Aphids

Among the five different RNAi techniques assessed, the most efficient methods to silence *Eph* were the feeding of aphids (1) on transgenic *A. thaliana* expressing an RNA hairpin targeting *Eph*; (2) on *N. benthamiana* infected with TRV-Eph; and (3) on in vitro-synthesized transcripts derived from *Eph* sequences. However, we observed differences in the silencing efficiency induced by the three techniques. Reproducible silencing was obtained in whole aphids when they were fed on Hp-Eph plants from the T1 progeny. In contrast, no consistent silencing of *Eph* was obtained when using the

following progeny (T3). Surprisingly, this difference was not correlated with a low accumulation of siRNA in the T3 plants suggesting that the long dsRNA, rather than the siRNA, may be the molecules priming silencing. A size requirement of more than 60 bp for the dsRNA molecules to achieve efficient silencing of the target gene was already observed in western corn rootworm [63]. Silencing of *Eph* was particularly efficient at the gut level when the aphids were fed on T3 plants, but not when they were placed on T4 plants, suggesting that the silencing efficiency may vary greatly between plant generations. When feeding aphids on in vitro synthesized dsRNA targeting *Eph*, an efficient silencing was reproducibly observed at the gut level and not in whole aphids. These data suggest that the gut cells, and more likely the non-chitinous midgut and hindgut cells, are the preferential sites for dsRNA uptake and for efficient RNA silencing. These observations also point out that the silencing signal may not be well amplified and/or not efficiently transferred to neighboring cells. Although genes coding for the complete silencing machinery have been identified in the genome of the aphid *A. pisum* [64], phylogenetic analyses found that aphids lack the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), an enzyme responsible for signal amplification during RNAi [65,66]. The mechanism of RNAi signal spread is unknown in insects but there is strong evidence that this mechanism occurs in aphids [38]. Interestingly, *Eph* silencing was reproducibly obtained in whole aphids and in the guts after feeding the insects on *N. benthamiana* infected with TRV-*Eph*. To our knowledge, this technique has never been tested before to silence genes in aphids, but was successfully developed to silence genes in some phloem feeding insects as the potato psyllid *Bactericera cockerelli*, and the mealybugs *Planococcus citri* and *Phenacoccus solenopsis* [67–69]. In these previous experiments, a Tobacco mosaic virus- or a Potato virus X-derived virus was used to silence the insect genes. The use of a viral vector to generate silencing molecules that can be taken over by aphids is a very promising technique, as it does not require plant transformation and is potentially not affected by the silencing variations observed between plant progenies. Moreover, it is less expensive than in vitro dsRNA synthesis.

Silencing of *ALY* was more challenging. Reduction of *ALY*-mRNA accumulation was only found in the gut cells and only after feeding aphids on in vitro synthesized transcripts targeting *ALY*. Again, using *N. benthamiana* infected with a TRV-recombinant virus targeting *ALY* was the only way to observe a moderate silencing in whole aphids.

Taken together, these experiments show that the efficiency of silencing may depend greatly on the level of expression of a target gene. However, several other factors can also influence the silencing efficiency as the size of the dsRNA, the primary sequence and the secondary structure of the mRNA that can affect accessibility by the RISC complex, the temporal and tissue specificity expression of the gene, and the turnover of transcripts. The stability of the dsRNA in the aphid digestive tubes can also be a criteria for the success of silencing and, in this respect, the lower GC content of *ALY*-dsRNA could result in a higher degradation in the gut lumen compared to *Eph*-dsRNA. In addition, plant dicer-like proteins (DCLs) seem to operate preferentially on GC-rich region which would be in favor of a higher silencing activity on *Eph* [70]. The percentage of coverage of the target gene by the dsRNA does not seem to impact the gene silencing efficiency since the dsRNA targeting *ALY*-mRNA covers a larger portion of the coding sequence compared to *Eph*, without inducing a higher gene inhibition. Another observation deduced from our data is that the gut cells, which are the first to be targeted by dsRNA after oral acquisition, are more responsive to silencing than the other parts of the aphid body.

4.2. Feeding Aphids on *N. benthamiana* Transiently Expressing Hairpin RNAs, or on Small RNAs from These Plants, Are Not Efficient Silencing Methods

The other two techniques tested, which consisted of feeding aphids on *N. benthamiana* transiently expressing hairpin RNAs, or on siRNA purified from these plants, resulted in a particularly inefficient, or non-reproducible, silencing of *ALY* or *Eph*. Several reasons can be put forward to explain this result. Firstly, in infiltrated leaves transiently expressing hairpin constructs, dsRNA or siRNA mainly accumulate in epidermal cells which are only briefly sampled during the short aphid probes. Ingestion of these cells for only a brief period of time may not be sufficient to induce a strong gene silencing in

aphids. It should however be mentioned that Pitino et al. [32] obtained 30% to 40% inhibition of the accumulation of the gut gene *Rack-1* and the salivary gland gene *MpC002* gene after feeding aphids on agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana*. Whether or not this difference is due to the expression level of the different genes targeted, or to other factors, needs to be addressed. Secondly, feeding aphids on small RNAs purified from agroinfiltrated leaves to concentrate the amount of siRNA acquired by the aphids may result in instability of the two reference genes used in the qRT-PCR analyses. It is likely that ingestion of high amounts of small RNAs may saturate the silencing machinery resulting in aphid metabolism perturbations. Probably for similar reasons, such aberrant values of the reference genes were sometimes observed after feeding aphids on *N. benthamiana* transiently expressing hairpin RNAs.

4.3. Future Developments

To increase the efficiency of dsRNA uptake by aphids, several strategies can be followed: First of all, expression of the dsRNA specifically in phloem cells, under the control of phloem-specific promoters, could potentially increase dsRNA or siRNA release in sieve tubes and thus their uptake by phloem-feeding insects [12]. This promising development is moreover strengthened by the detection of miRNA and siRNA in sieve tubes [71,72], suggesting an efficient loading of small RNAs from companion cells or phloem parenchyma cells into sieve tubes. Another alternative is the use of transfection reagents or coating reagents for dsRNA or siRNA to increase stability and internalization of these molecules in insect cells [25,73,74]. This technology has already been successfully developed to boost gene silencing in mosquitoes [75].

Despite the development of several strategies to silence genes in aphids, there is still an urgent need to further elaborate technological innovations to increase the silencing efficiency and the persistence of silencing in aphids. Introducing stable genomic modifications in aphids has already been achieved in *A. pisum* using non-targeted ethyl methanesulfonate (EMS) [76], and future developments will focus on application of the increasingly popular CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 gene-editing tool in aphids [77]. Another promising technology to conduct functional validation in aphids is the use of a gene vector derived from an aphid virus. In this respect, the *Myzus persicae* densovirus [78,79], which possesses a small single-stranded DNA genome, represents a good candidate following similar work with a mosquito densovirus [80]. This functional virus-based technology was used to inhibit gene expression, but also to over-express a specific gene, which would represent a major breakthrough in aphid post-genomic research.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/1999-4915/8/11/316/s1. Table S1: List of primers.

Acknowledgments: We would like to thank Shahine Garcia (INRA, Colmar) and Elodie Klein (IBMP, Strasbourg) for providing technical advice on small RNA extraction and detection. We are grateful to Dinesh Kumar (Davis University, USA) for his kind donation of TRV constructs and to Saskia Hogenhout (BBSRC, England) for providing the transgenic *A. thaliana* expressing GFP-dsRNA. Manuella van Munster (INRA, Montpellier) helped in getting the bioinformatics data. This work was supported by an INRA and Region Alsace (France) grant to Michaël Mulot. Ali Akbar Behjatnia and Keramat Izadpanah both supervisors of the Shiraz University Ph.D. program for Maryam Rastegar are kindly acknowledged for their administrative support. Maryam Rastegar was recipient of a scholarship from the Iran Ministry of Science, Research and Technology, as part of his Ph.D project. We are grateful to Véronique Ziegler-Graff (IBMP, Strasbourg) and Etienne Herrbach (INRA, Colmar) for carefully reading the manuscript and Mariko Alexander (Cornell University, USA) and Craig Webster (INRA, Montpellier) for English corrections. Finally, we thank Eric Duchêne (INRA, Colmar) for his assistance in the statistical analyses.

Author Contributions: B.M. and V.B. designed the experiments; M.M., S.B., B.M., M.R., G.C., N.B., M.E. and V.B. performed the experiments; D.H. did the statistical analyses; M.M., S.B. and V.B. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brault, V.; Uzest, M.; Monsion, B.; Jacquot, E.; Blanc, S. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* **2010**, *333*, 524–538. [CrossRef] [PubMed]

2. Dedryver, C.A.; Le Ralec, A.; Fabre, F. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *C. R. Biol.* **2010**, *333*, 539–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tagu, D.; Klingler, J.P.; Moya, A.; Simon, J.C. Early progress in aphid genomics and consequences for plant-aphid interactions studies. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2008**, *21*, 701–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bass, C.; Denholm, I.; Williamson, M.S.; Nauen, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *121*, 78–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Bass, C.; Puinean, A.M.; Zimmer, C.T.; Denholm, I.; Field, L.M.; Foster, S.P.; Gutbrod, O.; Nauen, R.; Slater, R.; Williamson, M.S. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *51*, 41–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Le plan ecophyto. Available online: <http://agriculture.gouv.fr/ministere/le-plan-ecophyto-2018> (accessed on 12 April 2013).
7. IAGC. Genome sequence of the pea aphid *acyrthosiphon pisum*. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000313.
8. Mathers, T.C.; Chen, Y.; Kaithakottil, G.; Legeai, F.; Mugford, S.T.; Baa-Puyoulet, P.; Bretaudeau, A.; Clavijo, B.; Collela, S.; Collin, O.; et al. A clonally reproducing generalist aphid pest colonises diverse host plants by rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters. *bioRxiv* **2016**.
9. 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*, 429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Brisson, J.A.; Jacquierey, J.; Legeai, F.; Le Trionnaire, G.; Tagu, D. Genomics of phenotypic plasticity in aphids. In *Management of Insects Pests to Agriculture*; Czosnek, H., Ghanim, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 65–96.
11. Scott, J.G.; Michel, K.; Bartholomay, L.C.; Siegfried, B.D.; Hunter, W.B.; Smagghe, G.; Zhu, K.Y.; Douglas, A.E. Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* **2013**, *59*, 1212–1221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yu, X.D.; Liu, Z.C.; Huang, S.L.; Chen, Z.Q.; Sun, Y.W.; Duan, P.F.; Ma, Y.Z.; Xia, L.Q. RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest. Manag. Sci.* **2016**, *72*, 1090–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Jinek, M.; Doudna, J.A. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **2009**, *457*, 405–412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Meister, G.; Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **2004**, *431*, 343–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Mello, C.C.; Conte, D., Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* **2004**, *431*, 338–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Sen, G.L.; Blau, H.M. A brief history of RNAi: The silence of the genes. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1293–1299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Siomi, H.; Siomi, M.C. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* **2009**, *457*, 396–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Li, J.; Wang, X.P.; Wang, M.Q.; Ma, W.H.; Hua, H.X. Advances in the use of the RNA interference technique in hemiptera. *Insect Sci.* **2013**, *20*, 31–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Christiaens, O.; Swevers, L.; Smagghe, G. DsRNA degradation in the pea aphid (*acyrthosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* **2014**, *53*, 307–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gong, Y.H.; Yu, X.R.; Shang, Q.L.; Shi, X.Y.; Gao, X.W. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton aphid, *aphis gossypii* glover. *PLoS One* **2014**, *9*, e102823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mao, J.; Zeng, F. Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *acyrthosiphon pisum*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e48718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sapountzis, P.; Duport, G.; Balmand, S.; Gaget, K.; Jaubert-Possamai, S.; Febvay, G.; Charles, H.; Rahbe, Y.; Colella, S.; Calevro, F. New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *acyrthosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *51*, 20–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Shakesby, A.J.; Wallace, I.S.; Isaacs, H.V.; Pritchard, J.; Roberts, D.M.; Douglas, A.E. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wang, D.; Liu, Q.; Li, X.; Sun, Y.; Wang, H.; Xia, L. Double-stranded RNA in the biological control of grain aphid (*Sitobion avenae* F.). *Funct. Integr. Genomics.* **2015**, *15*, 211–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

25. Whyard, S.; Singh, A.D.; Wong, S. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *39*, 824–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhang, M.; Zhou, Y.; Wang, H.; Jones, H.; Gao, Q.; Wang, D.; Ma, Y.; Xia, L. Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* f.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. *BMC Genomics* **2013**, *14*, 560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. 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. A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9965–9969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mutti, N.S.; Park, Y.; Reese, J.C.; Reeck, G.R. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* **2006**, *6*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Bhatia, V.; Bhattacharya, R.; Uniyal, P.L.; Singh, R.; Niranjan, R.S. Host generated siRNAs attenuate expression of serine protease gene in *Myzus persicae*. *PLoS One* **2012**, *7*, e46343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Guo, K.; Wang, W.; Luo, L.; Chen, J.; Guo, Y.; Cui, F. Characterization of an aphid-specific, cysteine-rich protein enriched in salivary glands. *Biophys. Chem.* **2014**, *189*, 25–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Mao, J.; Zeng, F. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Res.* **2014**, *23*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pitino, M.; Coleman, A.D.; Maffei, M.E.; Ridout, C.J.; Hogenhout, S.A. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One* **2011**, *6*, e25709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pitino, M.; Hogenhout, S.A. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **2013**, *26*, 130–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Xu, L.; Duan, X.; Lv, Y.; Zhang, X.; Nie, Z.; Xie, C.; Ni, Z.; Liang, R. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of phoxim insecticides. *Transgenic Res.* **2014**, *23*, 389–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jaubert-Possamai, S.; Le Trionnaire, G.; Bonhomme, J.; Christophides, G.K.; Rispe, C.; Tagu, D. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. *BMC Biotechnol.* **2007**, *7*, 63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Xiao, D.; Lu, Y.H.; Shang, Q.L.; Song, D.L.; Gao, X.W. Gene silencing of two acetylcholinesterases reveals their cholinergic and non-cholinergic functions in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Pest. Manag. Sci.* **2015**, *71*, 523–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, Y.; Lu, Z. Peroxiredoxin 1 protects the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* from oxidative stress induced by *Micrococcus luteus* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **2015**, *127*, 115–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Coleman, A.D.; Wouters, R.H.; Mugford, S.T.; Hogenhout, S.A. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 541–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Monsion, B.; Mulot, M.; Rastegar, M.; Boissinot, S.; Erdinger, M.; Bochet, N.; Brault, V. Identification of an aphid protein involved in turnip yellows virus transmission by *Myzus persicae*. In preparation.
40. Zhou, Z.; Luo, M.J.; Straesser, K.; Katahira, J.; Hurt, E.; Reed, R. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **2000**, *407*, 401–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Perez White, B.E.; Getsios, S. Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia. *Cell. Adh. Migr.* **2014**, *8*, 327–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. E-RNAi. Available online: <http://www.e-rnai.org> (accessed on 5 May 2010).
43. Martinez-Trujillo, M.; Limones-Briones, V.; Cabrera-Ponce, J.L.; Herrera-Estrella, L. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant. Mol. Biol. Report.* **2004**, *22*, 63–70. [[CrossRef](#)]
44. English, J.J.; Davenport, G.F.; Elmayan, T.; Vaucheret, H.; Baulcombe, D.C. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* **1997**, *12*, 597–603. [[CrossRef](#)]
45. Liu, Y.; Schiff, M.; Dinesh-Kumar, S.P. Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* **2002**, *31*, 777–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Clark, M.F.; Adams, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **1977**, *34*, 475–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bruyère, A.; Brault, V.; Ziegler-Graff, V.; Simonis, M.T.; Van den Heuvel, J.F.; Richards, K.; Guilley, H.; Jonard, G.; Herrbach, E. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* **1997**, *230*, 323–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Pitulescu, M.E.; Adams, R.H. Eph/ephrin molecules—a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2480–2492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Stutz, F.; Bachi, A.; Doerks, T.; Braun, I.C.; Seraphin, B.; Wilm, M.; Bork, P.; Izaurralde, E. Ref, an evolutionary conserved family of hnnp-like proteins, interacts with tap/mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA* **2000**, *6*, 638–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Aphidbase. Available online: <http://www.aphidbase.com/> (accessed on 6 May 2010).
51. Abdellatef, E.; Will, T.; Koch, A.; Imani, J.; Vilcinskis, A.; Kogel, K.H. Silencing the expression of the salivary sheath protein causes transgenerational feeding suppression in the aphid sitobion avenae. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 849–857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Guo, H.; Song, X.; Wang, G.; Yang, K.; Wang, Y.; Niu, L.; Chen, X.; Fang, R. Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e97410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Tzin, V.; Yang, X.; Jing, X.; Zhang, K.; Jander, G.; Douglas, A.E. Rna interference against gut osmoregulatory genes in phloem-feeding insects. *J. Insect Physiol.* **2015**, *79*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Purkayastha, A.; Dasgupta, I. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant. Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 967–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ratcliff, F.; Martin-Hernandez, A.M.; Baulcombe, D.C. Technical advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **2001**, *25*, 237–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wu, C.; Jia, L.; Goggin, F. The reliability of virus-induced gene silencing experiments using tobacco rattle virus in tomato is influenced by the size of the vector control. *Mol. Plant Pathol.* **2011**, *12*, 299–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Cilia, M.; Tamborindéguy, C.; Fish, T.; Howe, K.; Thannhauser, T.W.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Li, C.; Cox-Foster, D.; Gray, S.M.; Gildow, F. Vector specificity of barley yellow dwarf virus (bydv) transmission: Identification of potential cellular receptors binding bydv-mav in the aphid, sitobion avenae. *Virology* **2001**, *286*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Seddas, P.; Boissinot, S.; Strub, J.M.; Van Dorsselaer, A.; Van Regenmortel, M.H.; 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yang, X.; Thannhauser, T.W.; Burrows, M.; Cox-Foster, D.; Gildow, F.E.; Gray, S.M. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J. Virol.* **2008**, *82*, 291–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Linz, L.B.; Liu, S.; Chougule, N.P.; Bonning, B.C. In vitro evidence supports membrane alanyl aminopeptidase as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11203–11212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Liu, S.; Sivakumar, S.; Sparks, W.O.; Miller, W.A.; Bonning, B.C. A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. *Virology* **2010**, *401*, 107–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bolognesi, R.; Ramaseshadri, P.; Anderson, J.; Bachman, P.; Clinton, W.; Flannagan, R.; Ilagan, O.; Lawrence, C.; Levine, S.; Moar, W.; et al. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (diabrotica virgifera virgifera leconte). *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Jaubert-Possamai, S.; Rispe, C.; Tanguy, S.; Gordon, K.; Walsh, T.; Edwards, O.; Tagu, D. Expansion of the miRNA pathway in the hemipteran insect acyrthosiphon pisum. *Mol. Biol. Evol.* **2010**, *27*, 979–987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gordon, K.H.; Waterhouse, P.M. Rnai for insect-proof plants. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1231–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Tomoyasu, Y.; Miller, S.C.; Tomita, S.; Schoppmeier, M.; Grossmann, D.; Bucher, G. Exploring systemic RNA interference in insects: A genome-wide survey for RNAi genes in tribolium. *Genome Biol.* **2008**, *9*, R10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Khan, A.M.; Ashfaq, M.; Khan, A.A.; Rasool, A.; Iqbal, J.; Mansoor, S. Inoculation of nicotiana tabacum with recombinant potato virus x induces RNA interference in the solenopsis mealybug, phenacoccus solenopsis tinsley (hemiptera: Pseudococcidae). *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 2083–2090. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

68. Khan, A.M.; Ashfaq, M.; Kiss, Z.; Khan, A.A.; Mansoor, S.; Falk, B.W. Use of recombinant tobacco mosaic virus to achieve RNA interference in plants against the citrus mealybug, planococcus citri (hemiptera: Pseudococcidae). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Wuriyanghan, H.; Falk, B.W. RNA interference towards the potato psyllid, bactericera cockerelli, is induced in plants infected with recombinant tobacco mosaic virus (TMV). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ho, T.; Wang, H.; Pallett, D.; Dalmay, T. Evidence for targeting common siRNA hotspots and gc preference by plant dicer-like proteins. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3267–3272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Buhtz, A.; Springer, F.; Chappell, L.; Baulcombe, D.C.; Kehr, J. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of brassica napus. *Plant J.* **2008**, *53*, 739–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Kehr, J.; Buhtz, A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Johnson, J.A.; Bitra, K.; Zhang, S.; Wang, L.; Lynn, D.E.; Strand, M.R. The uga-cie1 cell line from chrysodeixis includens exhibits characteristics of granulocytes and is permissive to infection by two viruses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 394–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Yu, N.; Christiaens, O.; Liu, J.; Niu, J.; Cappelle, K.; Caccia, S.; Huvenne, H.; Smagghe, G. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: An overview and future directions. *Insect Sci.* **2013**, *20*, 4–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Zhang, X.; Zhang, J.; Zhu, K.Y. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the african malaria mosquito (anopheles gambiae). *Insect Mol. Biol.* **2010**, *19*, 683–693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Tagu, D.; Le Trionnaire, G.; Tanguy, S.; Gauthier, J.P.; Huynh, J.R. Ems mutagenesis in the pea aphid acyrthosiphon pisum. *G3* **2014**, *4*, 657–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **2012**, *337*, 816–821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Van Munster, M.; Dulleman, A.M.; Verbeek, M.; van den Heuvel, J.F.; Reinbold, C.; Brault, V.; Clerivet, A.; van der Wilk, F. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid myzus persicae. *J. Invertebr. Pathol.* **2003**, *84*, 6–14. [[CrossRef](#)]
79. Van Munster, M.; Dulleman, A.M.; Verbeek, M.; van den Heuvel, J.F.; Reinbold, C.; Brault, V.; Clerivet, A.; van der Wilk, F. A new virus infecting myzus persicae has a genome organization similar to the species of the genus densovirus. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 165–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Gu, J.; Liu, M.; Deng, Y.; Peng, H.; Chen, X. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Supplementary Materials: Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*

Michael Mulet, Sylvaine Boissinot, Baptiste Monsion, Maryam Rastegar, Gabriel Clavijo, David Halter, Nicole Bochet, Monique Erdinger and Véronique Brault

Table S1. List of primers.

Primer Sequence 5' > 3'	Position (on CDS Sequence When Relevant)	Sense	Restriction Sites (Underlined)	Experiments
TAGGATCCATTAAATAGATAGCGT GATCTCGGACG	1427–1446	Reverse	BamHI, SmaI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-EPHR Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp:EPHR pLilMUS28i-derived vector TRV-derived vector Control of transgene integration
TTTCTAGAGCGCGCCGGTCCATCC GTTGTTCAT	1198–1217	Forward	XbaI, AscI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-EPHR Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp:EPHR pLilMUS28i-derived vector TRV-derived vector Control of transgene integration
CCGGATCCATTAAATCGAGTTTTA ATGCTCCAAA	391–410	Reverse	BamHI, SmaI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-ALY Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp:ALY pLilMUS28i-derived vector TRV-derived vector Control of transgene integration ALY probe for siRNA detection/transgene detection in plants
TGTCAGAGGGCGCCCTTCTAAGGGT GATGTGAATG	228–247	Forward	XbaI, AscI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-ALY Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp:ALY TRV-derived vector pLilMUS28i-derived vector ALY probe for siRNA detection/transgene detection in plants
TAGGATCCATTAAATTAGAGTCGAC CTGCAGGCAT	from pUC18	Reverse	BamHI, SmaI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-LacZ Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp:LacZ

				pLIMUS28i-derived vector TRV-derived vector Control of transgene integration
GTTCTAGAGGGCGGCCCGGCATCAG AGCAGATTGTA	from pUC18	Forward	XbaI, AscI	Constitutive expression in <i>A. thaliana</i> of hp-LacZ Transient expression in <i>N. benthamiana</i> of hp-LacZ pLIMUS28i-derived vector TRV-derived vector Control of transgene integration
AGATAGCGTGAICTCGGACG	1427–1446	Reverse		Eph probe for siRNA detection/ transgene detection in plants
GGTCCATCCGTTGTGTTCA	1198–1217	Forward		Eph probe for siRNA detection/ transgene detection in plants
TAGAGTCGACCTGCAGGCAT	from pUC18	Reverse		LacZ probe for siRNA detection/ transgene detection in plants
CGGCATCAGAGCAGATTGTA	from pUC18	Forward		LacZ probe for siRNA detection/ transgene detection in plants
AAATTTCGACCATTTCTC	394–411	Reverse		U6 control probe
ATTGTCCCTTCGGGAC	308–324	Forward		U6 control probe
CCATGATTACGCCAAGCTACG	T7 promoter	Forward		in vitro transcription/dsRNA synthesis
ACGTTGTAAAACGACGGCCAG	T7 promoter	Reverse		in vitro transcription/dsRNA synthesis
ATGTTGTTAAAAGCGCTCCGAGA	1414–1435	Forward		Eph-mRNA qRT-PCR detection
				Eph-mRNA detection in <i>M. persicae nicotianae</i>
ACTCGTCACCTCGGGCATAGAAC	1518–1540	Reverse		Eph-mRNA qRT-PCR detection
				Eph-mRNA detection in <i>M. persicae nicotianae</i>
ACTGTTGCTAATCTTGCTACAC	562–583	Forward		ALY-mRNA qRT-PCR detection
				ALY-mRNA detection in <i>M. persicae nicotianae</i>
TCTTGCCACGAGTATTACCG	666–685	Reverse		ALY-mRNA qRT-PCR detection
				ALY-mRNA detection in <i>M. persicae nicotianae</i>
gCGCGCCGAGGCTTAT *	154–168	Forward		RPL7 reference gene qRT-PCR detection
CCGcaTTCTTTGCATTCTTG *	221–233	Reverse		RPL7 reference gene qRT-PCR detection
CCGAAAAGCTGTCAATGAAGAC	1812–1835	Forward		L27 reference gene qRT-PCR detection
GGTGAACCTTGTCTACTGTACATC				
TTG	2014–2042	Reverse		L27 reference gene qRT-PCR detection

* In lower case: mismatches when hybridization on the *M. persicae* sequence.

VII. Conclusion sur l'étude comparative des méthodes de RNAi pour l'inhibition des gènes *Eph* et *ALY* chez *M. persicae*

Parmi les 5 méthodes de RNAi utilisées dans cette étude, seules 3 ont permis d'inhiber l'expression du gène *Eph* à l'échelle du corps entier ; la méthode la plus efficace étant l'utilisation des plantes transgéniques de première génération (T1). Cependant, cet effet sur l'inhibition de l'expression du gène, n'a pas été reproduit avec les plantes des générations suivantes (T3). Il faut signaler que le nombre d'insertions du transgène dans les plantes de premières générations n'a pas été caractérisé. Il est donc possible qu'un nombre multiple d'insertions du transgène ait pu induire un mécanisme de silencing dans les générations suivantes, bien que des siRNA correspondant au transgène aient été détectés dans les plantes de génération T3. L'utilisation du TRV génétiquement modifié ou l'utilisation des dsRNA synthétisés *in vitro* a également été efficace pour inhiber de manière reproductible l'expression d'*Eph* dans le corps entier du puceron, mais avec des efficacités moindres comparées aux plantes transgéniques. Par contre ces deux techniques ont permis d'inhiber l'expression d'*Eph* de manière reproductible dans les cellules du tube digestif du puceron.

L'inhibition du gène *ALY* n'a quant à elle jamais été obtenue de manière reproductible, quelle que soit la méthode utilisée, et quel que soit le tissu analysé (corps entier ou tube digestif). Cette étude est la première qui compare au sein d'un même laboratoire plusieurs méthodes basées sur le RNAi ciblant les mêmes gènes, en utilisant un même clone de pucerons et en utilisant le même critère d'évaluation de l'expression des gènes. Ceci permet d'éliminer un certain nombre des sources potentielles de variation de l'efficacité du silencing. De plus, les méthodes de RNAi utilisées ciblaient toujours la même région codante des gènes *Eph* et *ALY*. La liste des méthodes d'ARN interférence utilisées dans cette étude n'est cependant pas exhaustive, et ne comprend pas, par exemple, la microinjection de dsRNA dans le corps du puceron ou l'acquisition de siRNA synthétisés *in vitro*. La microinjection de dsRNA a été tentée une fois au laboratoire mais en raison de la très faible survie des pucerons suite à ce traitement, cette condition a été abandonnée. L'acquisition de siRNA n'a pas été retenue en raison de son coût élevé de mise en œuvre.

Cette étude démontre néanmoins que pour inhiber de manière reproductible et efficace l'expression d'un gène par RNAi dans le puceron, le choix de la méthode et du gène ciblé sont tous deux des facteurs déterminants. De même, nous montrons ici qu'un gène efficacement inhibé par une méthode ne sera pas forcément efficacement inhibé par une autre méthode, même si la séquence nucléotidique ciblée est strictement la même. Ces travaux renforcent l'idée que l'inhibition des gènes du puceron est un processus délicat à mettre en œuvre, et que, pour augmenter ses chances de réussite, il faut déployer plusieurs techniques en parallèle.

VIII. Développements afin d'augmenter l'efficacité des technologies permettant d'inhiber l'expression d'un gène chez le puceron

Ne disposant pas à l'heure actuelle d'une technique efficace et reproductible pour valider la fonction d'un gène chez le puceron, il apparaît crucial de poursuivre la recherche de nouvelles stratégies permettant d'inhiber l'expression des gènes chez cet insecte. Dans ce contexte, certaines avancées ont déjà été obtenues.

Un des problèmes liés à la reproductibilité des expériences de RNAi peut être l'acquisition variable par les pucerons des molécules de dsRNA contenues dans le milieu artificiel. Pour remédier à ce problème, des chercheurs ont identifié des colorants permettant le suivi de l'ingestion des dsRNA acquis par *M. persicae* (Bilgi et al., 2017). Les auteurs ont ainsi observé que le rouge neutre et l'orange d'acridine sont des traceurs appropriés: ils restent visibles dans le stylet et l'intestin après une alimentation de 24 h et peuvent même être attractifs pour les pucerons. Ces travaux montrent que l'inhibition de l'expression du gène ciblé (V-ATPase) est plus importante lorsque seuls les pucerons ayant acquis le colorant sont récoltés.

Une autre voie d'amélioration de l'efficacité du RNAi pourrait être l'acquisition simultanée de plusieurs dsRNA ciblant différentes séquences d'un même gène (Ding et al., 2017). De même, une étude a montré que la technique du VIGS pouvait être améliorée par l'infection simultanée des plantes avec plusieurs virus modifiés contenant différentes séquences de dsRNA ciblant un même gène (Tzin et al., 2015). Concernant la microinjection de dsRNA synthétisés *in vitro*, l'efficacité pourrait être améliorée en micro-injectant une seconde fois les insectes avec les dsRNA 3 jours après la première injection (Chen et al., 2016). Cette pratique reste néanmoins difficile à mettre en œuvre en raison de la manipulation délicate des insectes et n'est pas applicable pour des études à grande échelle.

Concernant le mode d'administration, une nouvelle technique a émergé ces dernières années pour délivrer les dsRNA et les siRNA aux insectes. Celle-ci consiste à pulvériser directement les molécules initiateuses du RNA silencing sur les insectes. La première application de ce procédé est parue en 2008 dans une étude visant à inhiber un gène codant pour un inhibiteur de l'apoptose chez le moustique *A. aegypti* (AEIAP1). En appliquant directement sur l'insecte des dsRNA, les auteurs ont observé une forte mortalité des insectes mais l'inhibition de l'expression du gène n'a pas été mesurée (Pridgeon et al., 2008). Chez la mite *Ostrinia furnalis* (lépidoptère) une étude a montré que la pulvérisation de dsRNA sur des larves nouvellement écloses et ciblant des gènes exprimés spécifiquement durant la croissance de ces insectes réduisait l'expression des gènes ciblés et augmentait la mortalité des mites. L'effet sur l'inhibition et sur la survie était encore plus accentué lorsque

les dsRNA étaient supplémentés de milieu nutritif (Wang et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont aussi démontré que des dsRNA marqués avec des molécules fluorescentes étaient retrouvés à l'intérieur du corps des insectes après la pulvérisation. La pulvérisation des dsRNA semble donc être une méthode prometteuse pour l'inhibition des gènes chez les insectes et qui peut avoir de nombreuses applications. De plus, les molécules de dsRNA restent stables jusqu'à 28 jours lorsqu'elles sont vaporisées sur des plantes en serre et ne semblent pas éliminées par la pluie après séchage sur les feuilles. Cette méthode est donc également prometteuse pour le contrôle des insectes nuisibles dans les cultures (San Miguel and Scott, 2016).

Pour augmenter la stabilité des dsRNA et des siRNA et améliorer leur absorption cellulaire, plusieurs types de molécules ont été utilisés en biologie médicale pour l'administration de molécules de RNAi dans le cas de la thérapie génique. Ces molécules incluent notamment l'usage d'assemblages de polymères et de vecteurs lipidiques (Schiffelers et al., 2004; Sioud and Sorensen, 2003; Sorensen et al., 2003; Takahashi et al., 2005; Thomas et al., 2005; Urban-Klein et al., 2005; Yano et al., 2004; Zhou et al., 2013a). L'un des polymères les plus couramment utilisés pour générer des nanoparticules est le chitosane (**Fig. 28**). Le chitosane est un polymère non toxique et biodégradable qui peut être obtenu par désacétylation de la chitine, un biopolymère extrêmement abondant dans la nature (Dass and Choong, 2008). Cette molécule, utilisée pour la première fois en 2006 pour transfecter des cellules humaines (Howard et al., 2006), a ensuite été utilisée sur un insecte en 2010 (Zhang et al., 2010). Les auteurs avaient alors montré que l'utilisation des nanoparticules associées à des siRNA était un moyen efficace pour inhiber les gènes d'insectes par acquisition orale. L'usage des nanoparticules s'est ensuite étendu à différents systèmes, et notamment à l'abeille (hyménoptère) et au le moustique (diptère) (Das et al., 2015; Li-Byarlay et al., 2013; Mysore et al., 2013; Ross et al., 2015).

Il n'existe actuellement qu'un seul exemple d'utilisation de nanoparticules pour l'administration des molécules de RNAi chez le puceron (Thairu et al., 2017). Des siRNA ont été pulvérisés, soit sous forme de nanoparticules, soit libres, sur trois espèces de puceron: *A. pisum*, *A. glycines* et *S. graminum*. Les gènes visés étaient une carotène déshydrogénase (*tor*) impliquée dans la pigmentation chez *A. pisum*, et une amino-acid transaminase (*bcat*) essentielle dans le métabolisme des acides aminés dans les trois espèces de pucerons. Les auteurs ont ainsi pu montrer que l'ajout de nanoparticules de perfluorocarbène aux dsRNA permettait d'augmenter l'efficacité de l'inhibition des gènes dans certaines combinaisons. Encore une fois, l'efficacité du silencing variait en fonction des gènes et des espèces de pucerons testées.

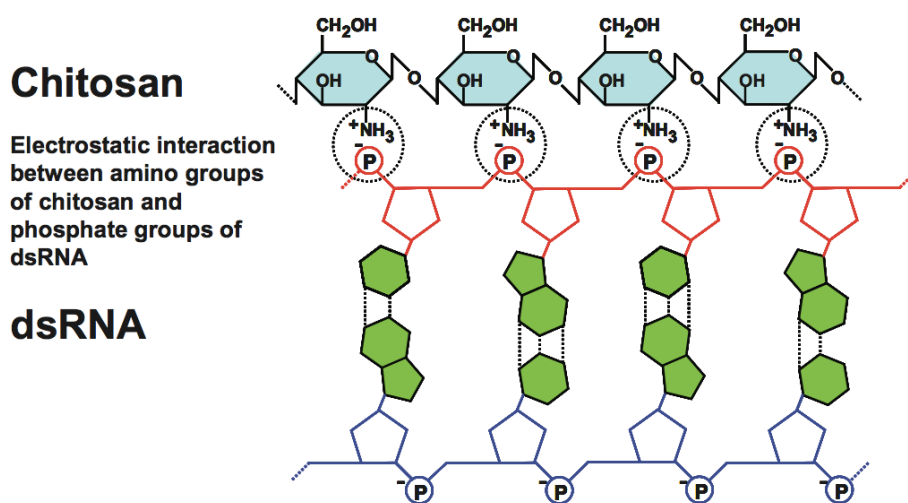


Figure 28 : Représentation schématique des interactions électrostatiques liant les polymères de chitosane et l'ARN double brin. Adapté de (Zhang et al., 2010).

IX. Développement de nouvelles techniques pour la validation fonctionnelle chez le puceron

L'avenir de la validation fonctionnelle chez le puceron réside assurément dans les nouvelles méthodes de modification du génome. Les méthodes utilisant les ZFN (nucléases en doigt de zinc) et les TALEN (nucléases effectrices de type activateur de transcription) ont jusqu'alors été utilisées pour modifier le génome de différents insectes modèles. Ces techniques sont néanmoins complexes et nécessitent beaucoup de main-d'œuvre (Kanchiswamy et al., 2016). Ces deux systèmes d'édition du génome ont récemment été remplacés par le système CRISPR/Cas9, dont la mise en œuvre est plus rapide et efficace que celle des systèmes ZFN et TALEN (Lander, 2016; Mohanraju et al., 2016; Wang et al., 2016a; Westra et al., 2016). La technologie CRISPR/Cas9 permet de générer des changements au niveau génomique qui sont stables et héréditaires, tandis que la technologie du RNAi est un processus transitoire qui n'est pas forcément systémique et qui n'est que rarement transmis à la descendance (Coleman et al., 2015). Dans notre cas, nous avons montré par qRT-PCR que les descendants L1 de pucerons adultes qui ont acquis des dsRNA *Eph* ne présentaient pas de variations de l'expression du gène *Eph* au niveau du corps entier (**Fig. 29**).

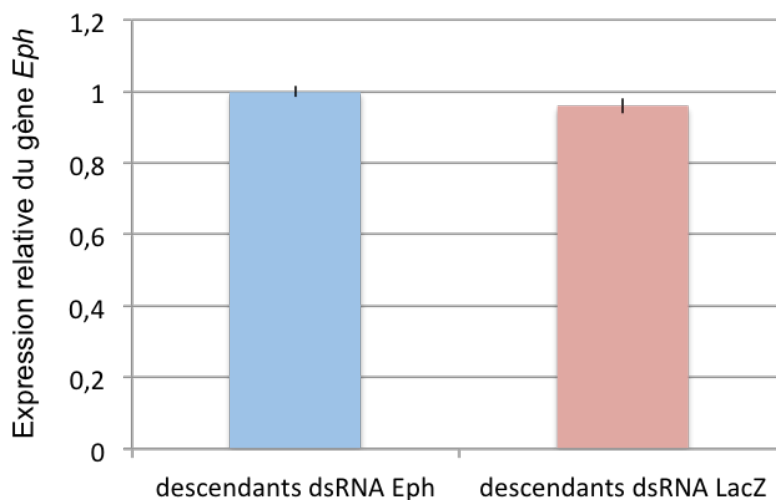


Figure 29 : Expression relative (qRT-PCR) du gène *Eph* dans des larves L1 produites après 1 jour par des adultes ayant acquis les dsRNA *Eph* ou les dsRNA contrôle *LacZ* durant 5 jours (dsRNA synthétisés *in vitro*, corps entiers, lots de 30 pucerons L1). L'expression des gènes est normalisée par rapport aux gènes de ménage RPL7 et L27.

Si les ZFN et les TALEN n'ont pas permis de modifier le génome des pucerons jusqu'à aujourd'hui, tous les espoirs se portent sur le développement du système CRISPR/Cas9. Cette méthode a déjà été efficace pour modifier le génome d'insectes des ordres diptère, lépidoptère, orthoptère, coléoptère, et hyménoptère (Sun et al., 2017). Les preuves de concept de la modification du génome du puceron *A. pisum* ont déjà été obtenues dans l'équipe Écologie et Génétique des Insectes de l'INRA de Rennes (Gaël Le Trionnaire, communication personnelle), et devraient bientôt être publiées. Cette nouvelle étape sera une avancée majeure pour la recherche post-génomique sur le puceron. Cette technique permettra de supprimer complètement l'expression des gènes ciblés (Knock-out) contrairement aux techniques basées sur le RNAi qui réduisent l'expression des gènes ciblés (Knock-down) mais ne les inhibent pas complètement. Cet effet peut cependant ne pas être adapté pour étudier la fonction de gènes essentiels au puceron pour lesquels toute inhibition complète de l'expression conduira à la mort des insectes. La technologie CRISPR/Cas9 présente la potentialité de sur-exprimer des gènes, ou encore de modifier spécifiquement des parties de gènes, ce qui permet de mener des analyses génétiques *in vivo* très précises. Une autre technologie prometteuse pour effectuer la validation fonctionnelle de gènes chez les pucerons est l'utilisation d'un vecteur de gènes dérivé d'un virus du puceron, à l'instar de ce qui a déjà été fait chez le moustique à partir de densovirus (Gu et al., 2011). Le *Myzus persicae densovirus* (MpDENV) est un densovirus (virus à ADN simple brin) naturellement présent chez le puceron *M. persicae* (van Munster et al., 2003a, b). Ce virus dont le génome est de petite taille (environ 3 kb) se présentait comme un bon

vecteur de gènes permettant d'inhiber ou de sur-exprimer des gènes chez le puceron. Des travaux entrepris au laboratoire n'ont pas permis pour l'instant d'obtenir un vecteur viral infectieux chez les pucerons. Le problème réside dans la manipulation des extrémités 5' et 3' du densovirus qui présentent de fortes structures secondaires et qui sont complètement récalcitrantes à toute manipulation génétique (résultats non publiés). La découverte de nouveaux virus infectant les pucerons et facilement manipulables pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans ce champ d'investigation.

**Chapitre 2 : Analyse de l'implication des gènes *Eph* et *ALY*
dans la transmission virale des polérovirus à l'aide de
méthodes basées sur l'ARN interférence**

Afin d'identifier les protéines du puceron intervenant dans la transmission des polérovirus par puceron, Baptiste Monsion a mené un crible double hybride à partir d'une banque de cDNA total de *M. persicae* en utilisant les protéines structurales du CABYV et du TuYV comme appâts protéiques. Les expériences ont ensuite été poursuivies par Sylvaine Boissinot et ont montré qu'en système de levure, les protéines RT*, et dans une moindre mesure, les protéines CP, de ces deux virus sont capables d'interagir avec le récepteur de l'éphrine (Eph). Seules les protéines CP et RT* du TuYV se lient à la protéine ALY.

I. La protéine ALY

ALY (aussi appelé REF et ALY/REF) est une protéine nucléaire impliquée dans l'exportation des mRNA hors du noyau chez les mammifères (Rodrigues et al., 2001). La protéine ALY est impliquée dans l'infection des cellules humaines par le *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV). Le KSHV est un virus oncogène qui provoque le sarcome de Kaposi (KS) chez l'homme, une tumeur d'origine lymphatique. L'interaction entre ALY et les ARN viraux du KSHV permettent aux transcrits viraux de sortir du noyau des cellules hôtes pour pouvoir initier la réplication du virus (Boyne et al., 2008). Ce type d'interaction entre ALY et les mRNA viraux semble être conservée chez les virus de la famille des *Herpesviridae*, et a été observé lors de l'infection par le virus d'Epstein-Barr, et le *Herpes simplex virus type 1* (HSV-1) (Hiriart et al., 2003; Tunnicliffe et al., 2011). Les *Herpesviridae* ont besoin de pénétrer dans le noyau des cellules hôtes pour pouvoir initier la transcription des mRNA viraux l'export des mRNA est nécessaire afin d'initier la traduction des protéines virales ; ceci explique l'importance du facteur ALY dans le cycle de réplication de ces virus. Les polérovirus que nous étudions au laboratoire ne sont pas connus pour se répliquer dans les pucerons, mais au vu des nouvelles découvertes sur l'immunité acquise des drosophiles, il serait intéressant de ré-évaluer la possibilité que ces virus se répliquent et se maintiennent à un niveau basal dans la cellule grâce à ce mécanisme de régulation.

II. Les récepteurs de l'éphrine

Les protéines éphrine (*erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma*) sont les ligands des récepteurs de l'éphrine, abrégé Eph. Ces récepteurs représentent la plus grande famille de récepteurs cellulaires de type tyrosine kinase du règne animal. Les récepteurs de l'éphrine ont été amplement étudiés chez les mammifères, et ont été divisés en deux classes, A et B. Ces récepteurs sont fixés à la membrane par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire qui sépare la partie extracellulaire de la partie cytoplasmique. La partie extracellulaire des récepteurs Eph contient un domaine globulaire de liaison au ligand, une région riche en cystéines et deux domaines fibronectine de type III (FNIII). La partie cytoplasmique intracellulaire se compose d'une courte région proche de la membrane

comportant plusieurs résidus tyrosine, d'un domaine tyrosine kinase, d'un domaine d'interaction protéique de type « motif stérile α » (domaine SAM) et d'un domaine de liaison protéique PDZ en C-terminal (**Fig. 30**). L'abréviation PDZ combine les premières lettres des trois premières protéines découvertes partageant le domaine, *post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1) et *zonula occludens-1* (zo-1). Ce domaine permet de lier d'autres protéines contenant des domaines PDZ. Il est impliqué dans la signalisation « antisens » induit par les récepteurs de l'éphrine (Lu et al., 2001). Le domaine SAM est aussi impliqué dans les interactions protéiques et est capable d'induire la dimérisation des récepteurs de l'éphrine (Singh et al., 2015). La protéine Eph identifiée par double hybride chez le puceron présente des homologies de séquences avec les protéines réceptrices de l'éphrine de type B chez les mammifères. La classe B des récepteurs de l'éphrine des mammifères interagit préférentiellement avec les ligands éphrine de type B, qui sont des ligands ancrés dans la membrane et composés d'un domaine de liaison au récepteur extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire de liaison protéique PDZ (**Fig. 30**). La classe A des récepteurs de l'éphrine des mammifères interagit préférentiellement avec les ligands éphrine de type A. Ces derniers sont ancrés dans la membrane par l'intermédiaire d'un glycolipide, le glycosylphosphatidylinositol (GPI), et ne contiennent pas de domaine intracellulaire contrairement aux ligands éphrine-B.

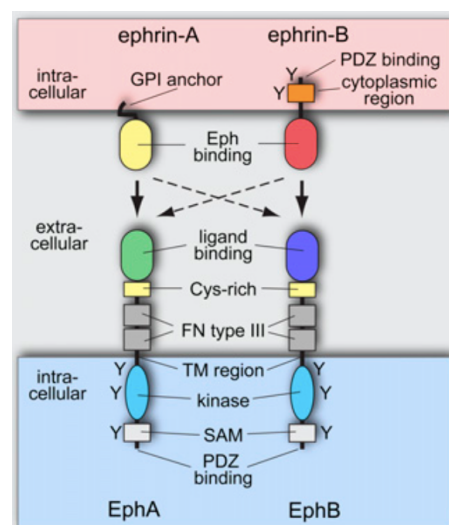


Figure 30 : Représentation schématique des récepteurs de l'éphrine (EphA et EphB) et de leurs ligands (éphrine-A et éphrine-B). Les tyrosines (Y) pouvant être phosphorylées lors de l'interaction récepteur/ligand sont signalées. Les récepteurs interagissent généralement avec les ligands de même classe, mais il existe des cas d'interactions croisées. GPI: glycosylphosphatidylinositol, TM: transmembrane; Cys : Cystéine ; FN : fibronectine. Adapté de (Pitulescu and Adams, 2010).

Il est intéressant de signaler que les récepteurs de l'éphrine et leurs ligands sont tous ancrés dans la membrane cytoplasmique des cellules. L'interaction récepteur/ligand a généralement lieu entre deux cellules et conduit à une transduction du signal bidirectionnelle. La cellule portant le récepteur reçoit un signal « sens », tandis que la cellule contenant le ligand reçoit un signal « antisens ». Ce type de signalisation complexe permet aux récepteurs de l'éphrine de réguler de nombreux processus biologiques chez les mammifères, tels que le positionnement des cellules ou leur différenciation. Ces processus sont particulièrement importants lors du développement des organismes (voir revues : Kania and Klein, 2016; Pitulescu and Adams, 2010).

Un exemple concret de l'importance des récepteurs éphrine lors du développement est celui du rôle de ces récepteurs dans le maintien des pools de cellules souches neurales (NSC) dans le cerveau humain (**Fig. 31**). Lorsque le cerveau humain est adulte, la zone subventriculaire contient des pools de NSC dites quiescentes (qui ne se divisent pas) et des pools de NSC dites activées car exprimant les récepteurs EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Tavazoie et al., 2008). Ces dernières se divisent à un rythme lent de manière asymétrique et donnent à chaque division, une nouvelle NSC et une cellule progénitrice neurale exprimant elles aussi des récepteurs EGFR. Les NSC activées et les cellules progénitrices neurales expriment toutes deux, en plus des EGFR, des récepteurs Eph et des récepteurs Notch. Les EGFR exprimés par les NSC et les cellules progénitrices sont constamment stimulées par des facteurs de croissance (Shen et al., 2004) et cette activation conduit à l'activation de la voie des MAP kinases (MAPK) qui résulte en l'accumulation de la cycline D et finalement à la prolifération cellulaire. Cependant, contrairement aux cellules progénitrices, les NSC sont au contact des capillaires qui cheminent dans la zone subventriculaire (Calvo et al., 2011; Chen et al., 2013; Goldberg and Hirschi, 2009). Les cellules endothéliales vasculaires qui composent ces capillaires expriment à leur surface les protéines transmembranaires Jagged et éphrine-B2, ligands respectifs des récepteurs Notch et Eph (Conover et al., 2000; Imayoshi et al., 2010; Pasquale, 2008; Pierfelice et al., 2011). Ainsi, seules les NSC reçoivent la signalisation Eph « sens » et la signalisation Jagged-Notch. La signalisation Eph « sens » permet d'inhiber la voie des MAPK tandis que la signalisation Jagged-Notch permet d'inhiber la différenciation cellulaire, ce qui permet aux cellules progénitrices de se multiplier et se différencier en neuroblastes, et de maintenir un pool constant de NSC indifférenciées (Ottone et al., 2014) (**Fig. 31**).

Des études ont démontré que les récepteurs éphrine peuvent être impliqués dans des processus d'endocytose. Dans la plupart des cas, le complexe récepteur-ligand et les protéines associées au complexe, ainsi que la membrane plasmique environnante, peuvent être internalisés dans la cellule exprimant le récepteur ou le ligand éphrine. La base mécanistique exacte de ce processus inhabituel, appelé trans-endocytose, reste

partiellement élucidée. Mais l'endocytose des complexes éphrine/Eph peut aussi être bidirectionnelle. Lorsque des cellules exprimant le ligand éphrine-B sont en contact avec de cellules exprimant le récepteur EphB, EphB est endocyté par la cellule exprimant éphrine-B, et éphrine-B est endocyté par la cellule exprimant EphB (Mann et al., 2003; Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003).

A noter que l'endocytose des récepteurs de l'éphrine a aussi été liée dans certains cas aux processus d'endocytose à clathrine (Parker et al., 2004). En effet, des cellules exprimant le récepteur éphrine-B1 fusionné à la GFP ont été traitées avec des ligands solubles. Les protéines fluorescentes ont alors été observées dans des vésicules à clathrine dans la cellule. De plus, l'abaissement de la concentration en potassium, ou l'utilisation de cellules mutées dans la dynamine bloquait l'internalisation du complexe récepteur/ligand. Le potassium et la dynamine étant des éléments indispensables de l'endocytose par clathrine, ces expériences appuyaient le fait que l'endocytose se faisait via des vésicules à clathrine.

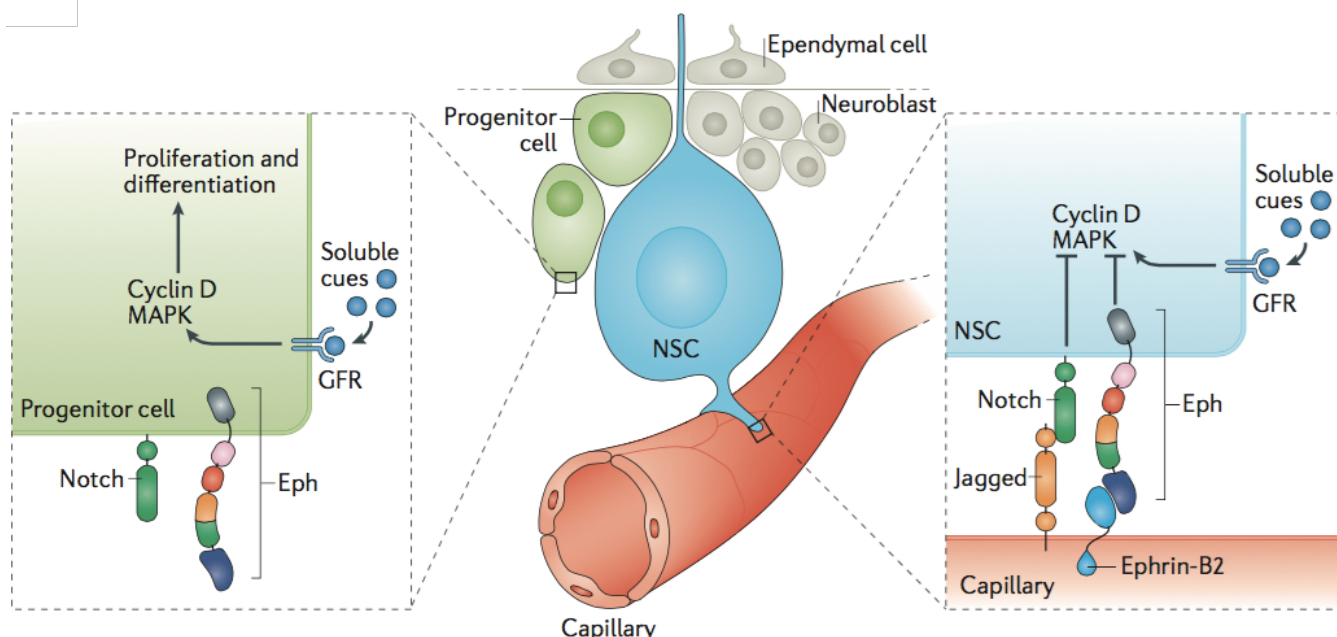


Figure 31 : Régulation de la neurogenèse chez les humains adultes par les cellules endothéliales vasculaires dans la zone subventriculaire du cerveau. La zone subventriculaire du cerveau humain adulte contient un nombre déterminé de NSC et de cellules progénitrices. Ces deux types de cellules expriment des récepteurs EGFR, des récepteurs Eph et des récepteurs Notch. Les EGFR sont constamment stimulées par des facteurs de croissance, ce qui conduit à l'activation de la voie MAPK, l'accumulation de la cycline D et finalement à la prolifération cellulaire. Cependant, contrairement aux cellules progénitrices, les NSC sont au contact de cellules endothéliales vasculaires exprimant des protéines transmembranaires Jagged et éphrine-B2, ligands des récepteurs Notch et Eph. Ainsi, seules les NSC reçoivent la signalisation Eph « sens » et la signalisation Jagged-Notch. La signalisation Eph « sens » inhibe la voie des MAPK tandis que la signalisation Jagged-Notch inhibe la différenciation cellulaire, ce qui permet de maintenir un pool constant de NSC indifférenciées. Adapté de (Kania and Klein, 2016).

III. Activation non conventionnelle des récepteurs de l'éphrine

Les récepteurs et les ligands étant tous deux liés à la membrane, l'hypothèse la plus répandue a longtemps été que les interactions entre les récepteurs et leurs ligands se produisaient uniquement par contact entre des cellules. Cependant, il a été montré qu'il existe des formes solubles de ligands éphrine. Par exemple, la protéine humaine EFNA1 (EPHRIN A1), longtemps identifiée comme un facteur angiogénique appelé B61 (D. Bartley et al., 1994; Easty et al., 1995), est retrouvée sous forme soluble dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses où elle est capable d'activer à distance les récepteurs éphrine EPHA2 (Alford et al., 2010; Wykosky et al., 2008). La forme soluble de EFNA1 est issue du clivage de la protéine par des metalloprotéases matricielles endogènes (Amanda Beauchamp et al., 2012). Un autre exemple est celui du ligand éphrine A5 qui existe sous forme soluble et qui est capable d'activer les récepteurs éphrine à distance (Alford et al., 2007; Janes et al., 2005; Janes et al., 2009). Le fait que des ligands éphrine puissent agir à

distance sur les récepteurs de l'éphrine étend le rôle de ces récepteurs au-delà des seules interactions entre les cellules.

IV. Analyse par RNAi du rôle de la protéine Eph dans la transmission virale

Afin de valider le rôle de la protéine candidate Eph issue du crible double hybride mentionné auparavant dans la transmission du TuYV par pucerons, nous avons appliqué les méthodes d'ARN interférence s'étant avérées les plus efficaces pour inhiber l'expression de ce gène chez le puceron *M. persicae* (voir chapitre I, Méthodes de validation fonctionnelle des gènes de puceron : état de l'art et étude comparative de plusieurs méthode d'ARN interférence chez le puceron *Myzus persicae*). Il s'agit de l'utilisation de plantes transgéniques exprimant les tiges-boucles d'ARN et l'utilisation des dsRNA synthétisés *in vitro*. Nous avons de cette manière pu montrer que les pucerons nourris avec ces deux sources de dsRNA ciblant les mRNA *Eph* transmettent moins efficacement le TuYV. De plus, cette baisse d'efficacité de la transmission coïncidait avec une diminution de l'internalisation des génomes viraux dans ces pucerons. L'ensemble des résultats concernant l'identification de la protéine Eph par crible double hybride et la mise en évidence de son rôle dans la transmission du TuYV ont été consignés dans une publication qui sera soumise à *Frontiers In Microbiology* :

1) Publication n°2 :

Transmission of *Turnip yellows virus* by *Myzus persicae* is reduced by feeding aphids on double-stranded RNA targeting the ephrin receptor protein



Transmission of *Turnip yellows virus* by *Myzus persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein

OPEN ACCESS

Edited by:

John P. Carr,
University of Cambridge,
United Kingdom

Reviewed by:

Trisna Tungadi,
University of Cambridge,
United Kingdom
Simon Cornelis Groen,
New York University, United States

*Correspondence:

Véronique Brault
veronique.brault@inra.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 December 2017

Accepted: 27 February 2018

Published: 13 March 2018

Citation:

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.
doi: 10.3389/fmicb.2018.00457

Michaël Mulot^{1†}, Baptiste Monsion^{1†}, Sylvaine Boissinot¹, Maryam Rastegar^{1,2},
Sophie Meyer¹, Nicole Bochet¹ and Véronique Brault^{1*}

¹SVQV, Université de Strasbourg, Institut National de la Recherche Agronomique, Colmar, France, ²Department of Plant
Protection, Shiraz University, Shiraz, Iran

Aphid-transmitted plant viruses are a threat for major crops causing massive economic loss worldwide. Members in the *Luteoviridae* family are transmitted by aphids in a circulative and non-replicative mode. Virions are acquired by aphids when ingesting sap from infected plants and are transported through the gut and the accessory salivary gland (ASG) cells by a transcytosis mechanism relying on virus-specific receptors largely unknown. Once released into the salivary canal, virions are inoculated to plants, together with saliva, during a subsequent feeding. In this paper, we bring *in vivo* evidence that the membrane-bound Ephrin receptor (Eph) is a novel aphid protein involved in the transmission of the *Turnip yellows virus* (TuYV, *Polerovirus* genus, *Luteoviridae* family) by *Myzus persicae*. The minor capsid protein of TuYV, essential for aphid transmission, was able to bind the external domain of Eph in yeast. Feeding *M. persicae* on *in planta*- or *in vitro*-synthesized dsRNA targeting Eph-mRNA (dsRNA_{Eph}) did not affect aphid feeding behavior but reduced accumulation of TuYV genomes in the aphid's body. Consequently, TuYV transmission efficiency by the dsRNA_{Eph}-treated aphids was reproducibly inhibited and we brought evidence that Eph is likely involved in intestinal uptake of the virion. The inhibition of virus uptake after dsRNA_{Eph} acquisition was also observed for two other poleroviruses transmitted by *M. persicae*, suggesting a broader role of Eph in polerovirus transmission. Finally, dsRNA_{Eph} acquisition by aphids did not affect nymph production. These results pave the way toward an ecologically safe alternative of insecticide treatments that are used to lower aphid populations and reduce polerovirus damages.

Keywords: polerovirus, virus transmission, virus receptor, RNA interference, transmission inhibition, plant viruses, aphid vector

INTRODUCTION

To circumvent plant immobility, and escape before the plant dies, the majority of plant viruses rely on mobile vectors for their dissemination. Among these vectors, phloem-feeding aphids are by far the most prevalent vectors that can transmit almost half of the insect-borne plant viruses (Hogenhout et al., 2008; Dedryver et al., 2010). Different modes of virus transmission have been described. The non-persistent and non-circulative mode of transmission relies on a transient and brief retention of virions at specific sites in the vector's mouthparts, or in close proximity. In contrast, the persistent, circulative and non-propagative mode of transmission requires endocytosis of virions into aphid cells (Ng and Falk, 2006; Hogenhout et al., 2008; Ammar el et al., 2009; Blanc et al., 2014; Gray et al., 2014; Drucker and Then, 2015; Whitfield et al., 2015). In the latter mode of transmission, viruses may persist in the aphid's body during the whole insect life with (propagative mode) or without (non-propagative mode) replication.

Members of the *Luteoviridae* family (referred to as luteovirids) are single-stranded RNA positive strand viruses, phloem-limited and strictly transmitted by aphids in a circulative, persistent, and non-propagative mode (Gildow, 1999; Gray and Gildow, 2003; Brault et al., 2007). Luteovirid transmission is highly specific because each virus species is usually transmitted efficiently by only one or a few aphid species (Herrbach, 1999). Luteovirid particles are acquired during the prolonged sap ingestion by aphids while feeding on infected plants. Virions are then transported through the gut cells via a transcytosis mechanism that is thought to be initiated by clathrin-mediated endocytosis (Gildow, 1999; Brault et al., 2007). Virus uptake into intestinal cells occurs either at the posterior midgut, the hindgut or both, depending on the virus species (Brault et al., 2007). Once released into the hemocoel, virions may be protected from degradation by binding to symbionin, an endosymbiotic protein, but this interaction, as well as its implication in luteovirid transmission, remains controversial (van den Heuvel et al., 1994, 1997; Filichkin et al., 1997; Liu et al., 2009; Bouvaine et al., 2011; Cilia et al., 2011). From there, luteovirid particles reach the accessory salivary glands (ASG) and are transported through the ASG cells by a transcytosis mechanism before being released into the salivary canal (Brault et al., 2007). These transcytosis events are suspected to rely on the presence of membrane virus-specific receptors at the gut and ASG levels. The apical plasmalemma of the intestinal cells together with the basal lamina and the basal plasmalemma of the ASG cells have been identified as luteovirid transmission barriers in aphids suggesting that specific interactions between virus structural proteins and cellular partners must exist at these locations to allow virus transmission (Gildow, 1999).

Luteovirid capsids are composed of two structural viral proteins namely the major coat protein (CP of about 22 kDa) and the minor capsid protein (readthrough protein or RT* of about 55 kDa) which is not required for virus particle assembly. Both proteins are involved in aphid transmission. Some mutations in the CP sequence of luteovirids affected aphid transmission without impacting virion formation (Torrance, 1992; Brault

et al., 2003; Kaplan et al., 2007; Doumayrou et al., 2016). Point mutations or deletions in the RT* are deleterious for efficient transport of virions through the gut cells (Gildow et al., 2000; Reinbold et al., 2001) and for virus uptake into the ASG cells (Brault et al., 1995, 2000; Chay et al., 1996; Bruyère et al., 1997; Peter et al., 2008). Moreover, RT* is responsible for luteovirid vector specificity (Brault et al., 2005).

Identifying luteovirid cellular partners, and in particular virus receptors in aphids, is a major challenge that could ultimately result in the development of innovative technologies aimed at inhibiting virus transmission. Up to now only insecticide treatments and aphid- or virus-tolerant or -resistant plants can be deployed to control luteovirid diseases (Walkey and Pink, 1990; Dogimont et al., 1996; Barker and Waterhouse, 1999; Dreyer et al., 2001). The gut membrane protein alanyl aminopeptidase N (APN), was identified previously as a potential receptor of pea enation mosaic virus (PEMV, *Enamovirus* genus, *Luteoviridae* family) in the aphid species *A. pisum* using an array of *in vitro*-based techniques and insect cells experiments (Linz et al., 2015). APN was isolated from a phage display peptide screen and evidence of its role in PEMV transmission by *A. pisum* was provided by competition experiments between the virus and a peptide potentially mimicking the viral determinant binding to the aphid receptor (Liu et al., 2010). Other aphid proteins exhibiting the ability to bind purified luteovirids *in vitro* have been reported but their precise role in virus transmission has not been identified. This includes several proteins extracted from *Myzus persicae* or heads of *Sitobion avenae* which exhibited the capacity to bind to virions of Turnip yellows virus (TuYV), previously designated Beet western yellows virus (Seddas et al., 2004), or of Barley yellow dwarf virus (BYDV) (Li et al., 2001). Another uncharacterized protein located in the ASG cells of *S. avenae* and *Schizaphis graminum* has also been suspected to be involved in luteovirid transmission, as acquisition of antibodies directed against this protein together with BYDV greatly reduced virus transmissibility (Wang and Zhou, 2003). Finally, by coupling quantitative proteomics with aphid genetics, several proteins from *S. graminum*, including a luciferase and a cyclophilin-like protein, were associated with the ability to transmit Cereal yellow dwarf virus (CYDV) (Yang et al., 2008). Subsequently, differential gel electrophoresis (DIGE) coupled to mass spectrometry on an F2 population originating from a cross between vector and non-vector biotypes of *S. graminum* exhibiting different barriers to transmission of CYDV-RPV (gut or ASG) revealed eight proteins under-represented in genotypes with a strong gut barrier (Cilia et al., 2011). Genetics studies of BYDV and CYDV transmission by aphids inferred that transmission capacity is a multigenic trait with some of the aphid genes being shared by the two viruses and some others being specific for one virus species (Papura et al., 2002; Dedryver et al., 2005; Burrows et al., 2006, 2007). Importantly, the aphid proteins predicted to function at specific transmission barriers were expressed as two isoforms with distinct charges (Papura et al., 2002; Cilia et al., 2011). Although the aforementioned studies have identified potential luteovirid partners in aphids, they did not link these proteins to the virus aphid-transmission phenotype.

We performed a yeast two-hybrid screen of a total *M. persicae* cDNA library to identify interactions between aphid cellular components and the structural proteins of the *Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV) (*Polerovirus* genus, *Luteoviridae* family), which is transmitted efficiently by *M. persicae*. The membrane ephrin receptor (Eph) was identified as a potential binding partner of the RT*s of CABYV and TuYV, another polerovirus efficiently transmitted by this aphid species. Functional validation tests were conducted with TuYV in *M. persicae* using techniques based on RNA interference. Feeding aphids on various sources of dsRNA targeting *Eph*-mRNA resulted in reduced internalization of TuYV genomes into the aphid's body and reduced transmission of TuYV, without affecting aphid's fitness. Taken together, these results implicate Eph in the transmission process of TuYV and suggest involvement of this protein in transmission of other poleroviruses by *M. persicae*.

MATERIALS AND METHODS

Aphid Library Construction

Total RNA was isolated from 35 mg of all instars of *M. persicae* using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit protocol. The purification of poly A⁺ RNA from total RNA was performed with the OligotexTM mRNA Mini Kit (Qiagen) following the Batch protocol. The reverse transcription was performed starting from 1 µg of mRNA using an Oligo(dT)₂₀ primer with an adaptor extension and following the MMLV High Performance Reverse Transcriptase procedure (EPICENTRE[®] BIOTECHNOLOGIES). The protocol was modified by the addition of a template switching primer (adaptor) after 30 min of incubation for a 3' cDNA extension (Table S1). The cDNA molecules were amplified using a single adaptor primer with the GoldStar[®] DNA polymerase (Eurogentec). The cycles were as follows: 95°C 1 min, 95°C 15 s, 65°C 20 s, 72°C 3 min (23 cycles), and 65°C 20 s, 72°C 6 min. The cDNA fragments were further purified with QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) and subjected to an over-night digestion at 50°C with the restriction enzyme SfiI. Alongside, the pGADT7 vector (Clontech) was modified by the introduction of SfiI sites using a specific pair of complementary oligonucleotides with NcoI and EcoRI sites (Table S1) leading to pGADT7-SfiI. This plasmid was digested with SfiI before being dephosphorylated using the Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Promega). A short run electrophoresis of SfiI-cDNA digestion products was performed on low melting point agarose gel to collect the DNA fragments above 400 bp. DNA fragments were recovered after hot-phenol extraction and DNA precipitation. Insert ligation into pGADT7-SfiI was performed at 16°C for 8 h with a molar ratio vector:insert of 1:30. The ligation mixture was further introduced by electroporation into *Escherichia coli* XL10-Gold Ultracompetent Cells (Stratagene, Agilent Technologies). After streaking the bacteria on LB agar containing ampicillin for 19 h at 37°C, colonies were collected in liquid LB medium complemented with glycerol solution (25% final) and stored at -80°C. The cDNA library was then amplified by inoculating

100 ml of LB containing ampicillin with an aliquot of the glycerol stock and cultivating the bacteria for 3 h at 37°C. Plasmids were then purified using QIAfilter Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) and used in the yeast two hybrid screen.

Viral Constructs for the Yeast Two Hybrid Screen

The major (CP) and the minor (RT*) capsid proteins of TuYV (NC_003743) and CABYV (NC_003688) were used in the yeast two hybrid experiments. The CP sequences of TuYV and CABYV were amplified by PCR (Expand High Fidelity PCR System, Roche Applied Science) using appropriate primers (Table S1) from the full-length viral sequences described in Veidt et al. (1992) and Guilley et al. (1994). To clone the RT* sequence of TuYV and CABYV, two overlapping mutagenic oligonucleotides were used in the PCR reaction together with external primers (Table S1) to replace the CP-stop codon by a tyrosine codon in the TuYV and CABYV sequences. The 5'-terminal nucleotide of TuYV- and CABYV-RT* sequence was positioned, respectively, at nt 4793 and nt 4896 on the viral genomes. After digestion with the appropriate restriction enzymes (Promega), CP and RT* from CABYV were purified on column (MSB[®] Spin PCRapace, Invitex GmbH) and cloned downstream the GAL4 DNA binding domain (BD) into the pGBKT7 vector (Clontech). The CP sequence from CABYV was also introduced downstream the GAL4 activation domain (AD) into the pGADT7 vector (Clontech). In addition, CP, RT* from CABYV together with CP and RT* from TuYV were introduced into pLexA-N vector downstream the LexA binding domain (Dualsystems Biotech). Ligations were performed overnight at 16°C in a 10 µL final volume using a molar ratio vector:insert of 1:5 with the T4 DNA Ligase from Promega. Ligation products were introduced by heat-shock into *E. coli* XL10-Gold competent cells.

The recombinant constructs were referred to as pGBKT7-CP_{CA}, pGADT7-CP_{CA}, pGBKT7-RT*_{CA}, pLexAN-CP_{CA}, pLexAN-RT*_{CA}, pLexAN-CP_{Tu}, and pLexAN-RT*_{Tu}. The pGBKT7-derived plasmids were introduced into the Y2HGold yeast strain and the pLexAN-derived plasmids were introduced into the NMY51 yeast strain. Y2HGold and NMY51 yeast strains contain the reporter genes *HIS3* and *ADE2*.

Yeast Two Hybrid Assays

The *M. persicae* cDNA library was screened against the baits following the procedures described in the DUALhunter kit user manual (Dualsystems Biotech). The colonies were plated onto a stringent medium lacking leucine, tryptophan, histidine, and adenine [-LWHA] and cultivated at 28°C for 3–14 days. The colonies developing on the [-LWHA] medium were selected and the recombinant pGADT7 plasmid containing the aphid cDNA was recovered following a yeast DNA extraction method. Briefly, yeast cells from a 2 ml overnight culture were suspended in 100 µl of a buffer (67 mM Potassium Phosphate, pH 7.5) containing 50 units of Lyticase (L2524, Sigma-Aldrich) and incubated 1 h at 37°C before proceeding with the common alkaline lysis *E. coli* plasmid purification. Recombinant plasmids were introduced into *E. coli* to obtain a sufficient amount of plasmids for sequencing.

Aphid Acquisition of dsRNA From Transgenic *A. thaliana* and From *in Vitro*-Synthesized dsRNA

Arabidopsis thaliana expressing a hairpin RNA targeting *Eph* or *LacZ* as a control (Ara:Hp-Eph and Ara:Hp-LacZ) were described in Mulot et al. (2016) and were grown in an environment-controlled chamber at 23°C day and 20°C night with a 10 h photoperiod as well as Col-0 non-transformed plants. *In vitro*-synthesized dsRNA targeting *Eph* or *LacZ* (dsRNA_{Eph} and dsRNA_{LacZ}) were obtained as described previously in Mulot et al. (2016).

M. persicae (Sulzer) colonies were reared on pepper (*Capsicum annuum*) at 20°C with a 16 h photoperiod. Aphids were fed on transgenic *A. thaliana* or artificially on *in vitro*-synthesized dsRNA as described in Mulot et al. (2016) except that the acquisition time on the artificial medium containing the dsRNA was extended to 5 days in some experiments and the final dsRNA concentration in the feeding medium was set up to 400 ng/μl in all experiments. When a 5-day acquisition period was performed, the dsRNA-containing medium was replaced after 3 days by a fresh medium containing the dsRNA.

Virus Transmission by *M. persicae*

In the virus transmission experiments, aphids previously fed for 10 days on transgenic *A. thaliana* (Ara:Hp-Eph or Ara:Hp-LacZ) were transferred for 24 h on purified TuYV prepared as described in Van den Heuvel et al. (1991). The viral concentration was set up at 25 μg/ml in the artificial diet (Bruyère et al., 1997). Aphids fed artificially on dsRNA were either transferred onto purified virus (same set-up as described above) or on TuYV-infected *M. perfoliata* inoculated by agroinfiltration as described in Hipper et al. (2014). After a 24 h acquisition access period of the virus, two potentially viruliferous aphids were transferred on Col-0 test plants for 72 h. After this inoculation access period, some aphids were collected for further analysis (see below) while the remaining aphids were eliminated by an insecticide treatment. The plants were tested by DAS-ELISA 3 weeks later using virus-specific antibodies as described in Bruyère et al. (1997). In this assay, samples from several young leaves were collected on each plant and pooled before grinding.

Eph-mRNA and Viral RNA Accumulation Analysis in Aphids by Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from whole *M. persicae* (20 aphids per sample) as described in Mulot et al. (2016). Total RNA was also extracted from 100 dissected guts using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) as described in Mulot et al. (2016) or alternatively from 35 dissected guts using NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel). To evaluate *Eph*-mRNA accumulation, qRT-PCR was performed as in Mulot et al. (2016). As mentioned in Mulot et al. (2016), the relative expression levels were normalized to *Rpl7* and *L27*. To determine the copy number of TuYV genomes internalized into *M. persicae*, total RNA was extracted from whole aphids after transferring them for 3 days on non-infected Col-0

(inoculation access period or IAP) to clear the gut lumen. The viral RNA was converted into cDNA using the reverse primer BPqtR1 and the M-MLV reverse transcriptase kit (Promega). The forward primer BPqtF0 and the reverse primer BPqtR1 (Table S1) were used to amplify by real-time PCR (qRT-PCR) the cDNA corresponding to nts 3694–3830 on TuYV genomic sequence (accession number NC_003743) using the same set-up as described in Mulot et al. (2016). Alongside, viral RNA genomes were extracted from purified virions using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). After quantification at 260 nm (Nanodrop 2000; Thermo Fischer Scientific), the viral RNA was converted to cDNA as described above. Dilution series of 10⁹ to 10⁴ viral cDNA copies obtained from RNA extracted from purified virions were used to calibrate the CFX cyclor and comparison between calibrate standard Ct values and samples Ct values provided an absolute quantification of TuYV genomes.

Aphid Fecundity and Feeding Behavior Tests

Aphid fecundity after feeding on transgenic *A. thaliana* (Ara:Hp-Eph or Ara:Hp-LacZ) was assessed by depositing individual fourth instars or adults onto these plants for 2 days. After this period, only one nymph was kept on the plant for 10 days to reach the adult stage before being transferred individually onto non-transformed Col-0 plants. Nymph production was recorded after 5 days. Aphid fecundity was also recorded after feeding fourth instars or adults for 5 days on *in vitro*-synthesized dsRNA. Four aphids were then transferred onto each non-transformed Col-0. Nymph production was monitored during 5 days. A Student *t*-test was applied to the values after controlling that the data followed a linear model.

To evaluate the feeding activity of aphids, fourth instars or adults *M. persicae* fed for 5 days on *in vitro*-synthesized dsRNA, were transferred to an artificial feeding medium (MP148, Harrewijn, 1983) for 48 h. Pools of 9–10 aphids were enclosed in individual boxes (10 or 11 boxes per condition) that were internally covered with a pH-indicator paper prepared in 0.2% bromocresol green dissolved in ethanol. The number of honeydew droplets produced by the aphids and which appear as purple dots on the indicator paper was counted manually or evaluated by image analysis (ImageJ). After determining that the data followed a linear model and variance was equal between samples, a Student *t*-test was applied to the values.

RESULTS

The Ephrin Receptor Protein From *M. persicae* Is a Potential Partner of Prolerovirus Structural Proteins

In order to identify partners of polerovirus particles in the aphid *M. persicae*, we looked for cellular partners of the structural proteins of CABYV which is efficiently transmitted by this aphid species (Lecoq et al., 1992). An aphid cDNA library was obtained from mRNA extracted from whole aphids. The cDNA library was cloned into the pGADT7 vector and the average insert size was about 400 bp. The major and the minor capsid protein

sequences of CABYV (CP_{CA} and RT_{CA}^{*}) were introduced into the pGBKT7 vector and expressed as fusion proteins with the GAL4 DNA binding domain (BD) in the Y2HGold yeast strain in which the *HIS3* and *ADE2* reporter genes are under the control of the GAL4 promoter. Screening the *M. persicae* cDNA library with the baits was performed by introducing the cDNA library into the yeast cells previously transformed with each bait. 6.2×10^6 and 4.6×10^6 double transformed yeast cells were obtained for the CP_{CA} and RT_{CA}^{*} screens, respectively. When plated onto the [-LWHA] medium to select yeast cells in which *in vivo* interactions occurred, 171 and 5 colonies developed for the CP_{CA} and RT_{CA}^{*} screens, respectively. A similar cDNA prey sequence, encoding a 244 amino acid peptide, was found in 4 of 13 colonies analyzed for the CP_{CA} screen and in 3 of the 5 colonies which emerged from the RT_{CA}^{*} screen. When blasted on the *M. persicae* genome (*M. persicae* clone G006 assembly v2, blast server, Aphidbase.com), one scaffold (MYZPE13164 G006 v1.0 000015980) contained the identified sequence which is annotated as ephrin type-B receptor 1-B (LOC111037473) and referred thereafter in the document as Eph (Figure S1).

Ephrin receptors are activated upon binding to their membrane-associated ephrin ligands and plays important roles in developmental processes in mammalian and in pathological diseases like brain and lungs cancers (for review see Pasquale, 2005; Himanen et al., 2007; Genander and Frisen, 2010; Pitulescu and Adams, 2010; Perez White and Getsios, 2014; Kania and Klein, 2016). Interaction of Ephs with ephrin ligands on the surface of neighboring cells triggers Eph kinase-dependent signaling in a bidirectional process. Ephrin receptor family is divided into two subclasses, EphA and EphB, based on amino acid sequence homology and binding affinities to glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked ephrin-A or transmembrane ephrin-B ligands. Interestingly, Eph or ephrin ligand have been shown to display receptor functions for mammalian viruses, bacteria and protozoan parasites (Bonaparte et al., 2005; Lupberger et al., 2011; Kaushansky et al., 2015; Subbarayal et al., 2015).

The extracellular domain of Ephs contains a globular ligand-binding domain and two fibronectin type III repeats (Figure 1). A short transmembrane domain separates the extracellular part from the intracellular cytoplasmic part consisting of the protein kinase domain and a sterile alpha motif domain responsible for Eph clustering (Stapleton et al., 1999) (Figure 1). The identified candidate peptide from the *M. persicae* cDNA library covers the two fibronectin type III repeats (Figure 1).

To address the ability of the plasmid bearing the partial Eph cDNA sequence (referred to hereafter as pGAD-Eph) to activate by itself the transcription of the reporter genes (*HIS3* and *ADE2*), the pGAD-Eph plasmid was introduced together with the empty pGBKT7 vector into Y2HGold yeast strain in which the reporter genes were controlled by the GAL4-responsive promoter. The yeast double-transformed colonies were plated onto medium lacking histidine [-LWH] or histidine and adenine [-LWHA]. Yeast growth was observed on both medium showing the capacity of the Eph partial domain to activate transcription of the reporter genes in the absence of luteovirid CP or RT^{*}

(Figure S2). Interaction of the Eph domain with the GAL4-promoter can be considered as a false positive reaction, but could also mask a true interaction with the viral baits. Considering the function of Eph as human virus receptors, we pursued the yeast two hybrid binding assays and addressed whether the Eph domain was able to interact with another promoter, the LexA promoter. Interestingly, no autoactivation of the transcription of the reporter genes *HIS3* and *ADE2* was observed when the pGAD-Eph and the empty pLexAN plasmids were introduced into the NMY51 yeast strain in which the reporter genes are under the control of the LexA promoter and when the doubled-transformed cells were plated onto [-LWHA] medium for 7 days (Figure S3). A low yeast growth was however observed, in one out of the three colonies, when the growth was extended to 14 days (Figure 2), implying that a low yeast development should not be considered as a true interaction between the prey and baits.

Therefore, the interactions between CABYV baits and the Eph partial domain were confirmed using the NMY51 yeast strain. The viral structural protein sequences were cloned into the pLexAN yeast vector as fusion proteins with the LexA DNA binding domain (BD). The resulting plasmids referred to as pLexAN-CP_{CA} and pLexAN-RT_{CA}^{*} were introduced into the NMY51 yeast strain together with the pGAD-Eph. Three colonies of the double-transformed yeast cells were plated onto the [-LW] to control yeast growth and on the [-LWHA] stringent medium to select yeast cells in which *in vivo* interaction occurred. We observed that RT_{CA}^{*} was able to interact with the partial domain of Eph since 2 out of 3 colonies developed on the [-LWHA] medium after 14 days of growth. Interaction between the Eph domain and CP_{CA} was less clear as only one out of the 3 colonies grew well on the [-LWHA] medium after 14 days (Figure 2). To control whether Eph could be a potential partner of other poliovirus structural proteins, we tested TuYV, which is also transmitted efficiently by *M. persicae* (Leiser et al., 1992). The TuYV CP and RT^{*} sequences were introduced into the pLexAN vector leading to the pLexAN-CP_{Tu} and pLexAN-RT_{Tu}^{*}. Similarly as described above, the pLexAN recombinant plasmids were introduced into NMY51 yeast cells together with pGAD-Eph and plated onto the [-LWHA] medium. Interestingly, interaction of the Eph domain with the RT_{Tu}^{*} was clearly observed (all the three colonies developed well on the [-LWHA] medium after 14 days of growth) and an interaction with the CP_{Tu} was also suggested since two out of the three colonies grew on the selective medium (Figure 2). The reason for the uneven growth of the three double-transformed colonies on the stringent medium is unknown but is likely due to a tendency of the CP-fusion proteins to self-assemble in yeast (Figure S4) rather than to interact with the prey. No yeast growth was observed on the [-LWHA] medium when the viral pLexAN-derived plasmids were co-transformed with the empty pGAD vector (Figure 2). Binding of Eph domain to the TuYV baits were controlled in an additional experiment (Figure S3). No yeast growth was observed for the control combinations.

In conclusion, we observed an unambiguous interaction between the Eph domain isolated from the *M. persicae* cDNA library and the RT^{*} from TuYV (RT_{Tu}^{*}). In contrast, interaction of Eph domain with the RT^{*} (RT_{CA}^{*}) and the CP from CABYV (CP_{CA}) and from TuYV (CP_{Tu}) was less clear due to uneven or

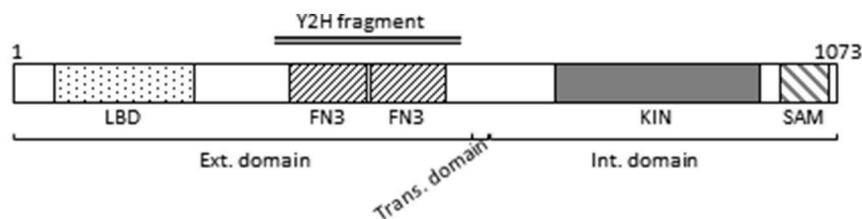


FIGURE 1 | Ephrin receptor schematic representation. The different boxes represent the following domains: LBD: Ephrin receptor Ligand-Binding Domain; FN3: Fibronectin type-III domain; KIN: Protein kinase domain; SAM: Sterile alpha motif domain. The external (Ext.), transmembrane (Trans.), and internal (Int.) domains are indicated. Numbers above the representation stand for amino acids. The double line represents the amino acid sequence encoded by the cDNA clone identified by the yeast two hybrid (Y2H) screen.

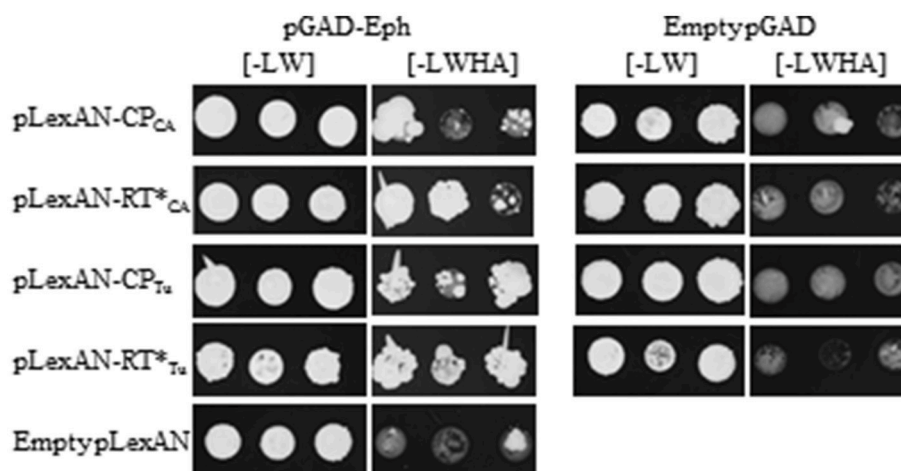


FIGURE 2 | Interaction between CABYV and TuYV structural proteins and Eph partial domain. The yeast strain NMY51 was co-transformed with pGAD-Eph and one of the following constructs: pLexAN-CP_{CA}, pLexAN-RT*_{CA}, pLexAN-CP_{Tu}, pLexAN-RT*_{Tu}, or the empty pLexAN. In parallel, yeast cells were co-transformed with the empty pGAD and one of the viral pLexAN-derived plasmids mentioned above. Three colonies were allowed to grow on a medium lacking leucine and tryptophan [-LW] before being transferred onto a selective medium deprived of leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA]. Yeast cells were grown at 28°C for 3 days on [-LW] and for 14 days on [-LWHA] media.

low growth of the double transformed yeast cells on the selective medium.

Feeding *M. persicae* on Transgenic *A. thaliana* Expressing dsRNA_{Eph} or on *in Vitro*-Synthesized dsRNA_{Eph} Reduces Aphid's Ability to Transmit TuYV

We first analyzed the function of Eph in TuYV transmission by *M. persicae* since a clear interaction was observed in yeast between the Eph domain picked up from the yeast two hybrid screen and RT*_{Tu}. A way to address whether Eph could be involved in TuYV transmission by *M. persicae* is to silence Eph expression in aphids and evaluate the ability of the modified aphids to transmit the virus. We previously compared five different techniques based on the ingestion by aphids of dsRNA molecules targeting *Eph* (Mulot et al., 2016). We selected the two most efficient techniques i.e., feeding aphids (i) on transgenic plants expressing an RNA hairpin of 249 bp corresponding to a central sequence of *Eph* (Hp-Eph) or (ii) on *in vitro*-synthesized

dsRNA of similar sequence. This sequence did not share any sequence identity more than 16 bp with other *M. persicae* expressed genes.

M. persicae were first fed for 10 days on T1 lines of transgenic *A. thaliana* expressing the Hp-Eph. Acquisition of dsRNA_{Eph} and/or siRNA_{Eph} from transgenic plants reproducibly inhibited accumulation of *Eph*-mRNA in whole aphids (53–61% reduction of *Eph*-mRNA accumulation in two independent experiments) when compared with aphids fed on control plants (transgenic *A. thaliana* expressing a 276 bp hairpin RNA targeting the bacterial gene *LacZ*, Hp-LacZ) (Table 1). Depending on the dsRNA sources (Hp-Eph or Hp-LacZ), the aphids were thereafter referred to as dsRNA_{Eph}-treated aphids or dsRNA_{LacZ}-treated aphids. After the dsRNA acquisition from plants, aphids were transferred onto an artificial medium containing purified virus for 24 h. After feeding on virus, the potentially viruliferous dsRNA-treated aphids were then deposited onto Col-0 test plants for virus inoculation and infection of the test plants was assessed by DAS-ELISA 3 weeks later. Interestingly, viruliferous dsRNA_{Eph}-treated aphids

TABLE 1 | Effect of dsRNA_{Eph} acquisition from transgenic *A. thaliana* on TuYV transmission by *M. persicae* and genome internalization in aphids.

Exp.	Aphid feeding source ^a	AAP ^b	Relative fold change Eph-mRNA in whole <i>M. persicae</i> ^c	Source for virus acquisition ^d	nb inf/inoc plants ^e	% of transmission inhibition ^f	Virus genome copies/ μ g RNA internalized into aphids ^g
1	Ara:Hp-Eph (T1) line 1	10 d	0.40 $\pm$ 0.11* (–60%) 1.7E-02 0.45 $\pm$ 0.04* (–55%) 2.6E-02 0.39 $\pm$ 0.16* (–61%) 1.4E-02	TuYV 50 ng/ μ l	6/31* (19%) 9.0E-06	77	3.72 $\times$ 10⁶ $\pm$ 7.33 $\times$ 10⁴* 2.8E-06
2	Ara:Hp-LacZ (T1) line 1 Ara:Hp-Eph (T1) line 1 Ara:Hp-Eph (T1) line 2 Ara:Hp-LacZ (T1) line 1	10 d	1.00 $\pm$ 0.19 0.47 $\pm$ 0.04* (–53%) 2.5E-02 0.42 $\pm$ 0.03* (–58%) 8.6E-04 1.00 $\pm$ 0.02	TuYV 50 ng/ μ l	16/19 (84%) 7/19* (37%) 1.4E-04 7/13* (54%) 8.4E-03 19/20 (95%)	61 43	2.22 $\times$ 10 ⁷ $\pm$ 8.35 $\times$ 10 ⁵ 1.76 $\times$ 10⁷ $\pm$ 1.14 $\times$ 10⁶* 1.5E-06 1.39 $\times$ 10⁷ $\pm$ 6.69 $\times$ 10⁵* 1.3E-06 1.55 $\times$ 10 ⁸ $\pm$ 5.21 $\times$ 10 ⁶

^aTransgenic *A. thaliana* expressing an hairpin RNA targeting Eph (Hp-Eph) or LacZ (Hp-LacZ).^bAcquisition Access Period for dsRNA acquisition; d = days.^cRelative fold change of Eph-mRNA accumulation $\pm$ standard deviation of triplicates. In brackets the level of expression compared to aphids fed on control conditions (*A. thaliana* expressing dsRNA targeting LacZ). Each result corresponds to one pool of 20 aphids. * and bold characters indicate significant differences in accumulation of Eph-mRNA (Student t-test, $p < 0.05$; p-values are indicated in italics).^dVirus acquisition was 24 h and virus inoculation 7 days on Col-0 test plants. Five viruliferous aphids were deposited per test plant.^eNumber of plants positive by DAS-ELISA/total number of plants inoculated with aphids. * and bold characters indicate significant differences in the number of plants infected between both conditions (Fisher's exact test, $p < 0.05$; p-values are indicated in italics).^fPercentage of TuYV transmission inhibition when using dsRNA_{Eph}-treated aphids when compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids. The percentage of infected plants for the LacZ control condition was considered as 100%.^gTuYV genome copies analyzed by qRT-PCR in whole aphids (pool of 20 aphids) collected after the 4 days of the inoculation access period on the test plants. * and bold characters indicate significant difference in the amount of viral genomes between the two conditions (Student t-test, $p < 0.05$; p-values are indicated in italics).

transmitted TuYV with a significantly lower efficiency than dsRNA_{LacZ}-treated aphids (**Table 1**). Moreover, the lower ability of the viruliferous dsRNA_{Eph}-treated aphids to transmit TuYV was correlated with a statistically reduced accumulation of the viral genomes (6–11 times less) in the dsRNA_{Eph}-treated aphids when compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids (**Table 1**).

To confirm these results, *M. persicae* were fed artificially on *in vitro*-synthesized dsRNA targeting *Eph*, since this technique reduces *Eph*-mRNA accumulation in the aphid gut (Mulot et al., 2016). In the first two experiments, using an experimental setup (72 h AAP on dsRNA-Eph at 200 or 400 ng/ μ l) described in Mulot et al. (2016), we observed a reduction in the accumulation of *Eph*-mRNA in the aphid gut (53 and 20% inhibition of *Eph*-mRNA accumulation in guts) (**Table 2**, Exp. 1 & 2). However, no reduction in TuYV transmission efficiency was observed after feeding the dsRNA_{Eph}-treated aphids on purified virus (**Table 2**, Exp. 1 and 2). While maintaining the dsRNA concentration in the artificial feeding medium at 400 ng/ μ l, the acquisition time was then extended to 5 days and the virus transmission assay was performed as before. In three independent experiments (**Table 2**, Exp. 3–5), a significant reduction in TuYV transmission efficiency (from 38 to 81% of reduction) by the dsRNA_{Eph}-treated aphids was observed. Again, the reduction in the virus transmission efficiency was correlated with a significant lower TuYV genome accumulation in the dsRNA_{Eph}-treated aphids after gut clearing (**Table 2**, Exp. 4 & 5). In these two experiments, TuYV accumulated about 4 times less in the dsRNA_{Eph}-treated aphids compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids. In order to see whether the nature of the virus source could impact the virus transmission efficiency of the dsRNA_{Eph}-treated aphids, virus acquisition was performed on TuYV-infected *Montia perfoliata*. Again, TuYV transmission rate was reduced by 50 and 47% when using the dsRNA_{Eph}-treated aphids (**Table 2**, Exp. 5 & 6) although the difference in virus transmission was not statistically significant compared with dsRNA_{LacZ}-treated aphids. Nevertheless, this reduction in the TuYV transmission efficiency by the dsRNA_{Eph}-treated aphids correlated with a statistically significant decrease of viral genomes internalized (1.3- and 2.3-fold fewer viral genomes in dsRNA_{Eph}-treated aphids than in dsRNA_{LacZ}-treated aphids) (**Table 2**, Exp. 5 & 6).

Surprisingly, the virus transmission reduction observed in the five experiments (**Table 2**, Exp. 3–6) was not always correlated with a reduction of *Eph*-mRNA accumulation in the gut cells and, in two experiments, a higher accumulation of *Eph*-mRNA was observed in the dsRNA_{Eph}-treated aphids compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids (**Table 2**, Exp. 3 & 5). To evaluate whether the artificial feeding step of aphids on an artificial medium for 5 days could affect *Eph* expression stability, we compared *Eph*-mRNA accumulation in the digestive tubes of aphids fed for 5 days on artificial medium with those of aphids fed on *C. annuum* (plant species used to rear *M. persicae*). Unexpectedly, accumulation of *Eph*-mRNA (normalized to the expression of the two housekeeping genes *L27* and *Rpl7*) in gut cells varied significantly when the aphids were fed on artificial medium (**Figures 3A**, S5). Expression of *L27* and *Rpl7* was however stable in similar conditions (**Figure 3B**). In contrast,

TABLE 2 | Effect of *in vitro*-synthesized dsRNA_{Eph} acquisition on TuYV transmission by *M. persicae* and genome internalization in aphids.

Exp.	Aphid feeding source ^a	AAP ^b	Relative fold change Eph-mRNA in <i>M. persicae</i> guts ^c	Source for virus acquisition ^e	nb inf/inoc plants ^f	% of transmission inhibition ^g	Virus genome copies/ μ g RNA internalized into aphids ^h
1	dsRNA _{Eph}	72 h	0.47 $\pm$ 0.02* (–53%) ^d 1.0E–05	TuYV 25 ng/ μ l	18/20 (90%) 6.6E–01	no	nd
2	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.03		16/20 (80%)		
	dsRNA _{Eph}	72 h	0.80 $\pm$ 0.03* (–20%) 1.5E–02	TuYV 25 ng/ μ l	44/69 (64%) 3.2E–01	no	nd
3	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.05		43/79 (54%)		
	dsRNA _{Eph}	5 d	2.78 $\pm$ 0.10* (+178%) 4.2E–03	TuYV 25 ng/ μ l	15/30* (50%) 1.8E–02	38%	nd
4	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.06		24/30 (80%)		
	dsRNA _{Eph}	5 d	0.20 $\pm$ 0.00* (–80%) 2.8E–06	TuYV 25 ng/ μ l	10/39* (26%) 1.9E–05	67%	3.65 $\times$ 10⁶ $\pm$ 1.25 $\times$ 10⁵ 3.1E–06
5 ^j	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.05		27/35 (77%)		
	dsRNA _{Eph}	5 d	1.44 $\pm$ 0.04* (+44%) 2.3E–04	TuYV 25 ng/ μ l	3/30* (10%) 5.0E–04	81%	1.48 $\times$ 10 ⁷ $\pm$ 5.03 $\times$ 10 ⁵ 1.90 $\times$ 10⁶ $\pm$ 1.52 $\times$ 10⁴* 9.4E–06
	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.02		15/28 (54%)		
	dsRNA _{Eph}		1.44 $\pm$ 0.04* (+44%) 2.3E–04	Inf. TuYV <i>M. persiciolata</i>	5/30 (17%) 2.3E–01	50%	8.90 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 4.30 $\times$ 10 ⁵ 1.76 $\times$ 10⁶ $\pm$ 4.68 $\times$ 10⁴* 3.1E–05
6	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.02		10/30 (33%)		
	dsRNA _{Eph}	5 d	0.91 $\pm$ 0.02 (–9%) 1.6E–01	Inf. TuYV <i>M. persiciolata</i>	9/33 (27%) 7.7E–01	47%	2.36 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 1.69 $\times$ 10 ⁵ 1.81 $\times$ 10⁶ $\pm$ 4.38 $\times$ 10⁴* 4.0E–05
	dsRNA _{LacZ}		1.00 $\pm$ 0.05		17/33 (52%)		4.22 $\times$ 10 ⁶ $\pm$ 2.08 $\times$ 10 ⁵

^aThe aphid feeding source were *in vitro* dsRNA targeting Eph (dsRNA_{Eph}) or LacZ (dsRNA_{LacZ}) at a concentration of 400 ng/ μ l in the artificial medium except in Exp. 1 where the concentration was 200 ng/ μ l.

^bAcquisition Access Period for dsRNA acquisition; h = hours; d = days.

^cRelative fold change of Eph-mRNA accumulation $\pm$ standard deviation of triplicates. In brackets the level of expression compared to aphids fed on control conditions (dsRNA_{LacZ}). Each result corresponds to one pool of 100 aphid guts. * and bold characters indicate significant differences between aphids fed on dsRNA_{LacZ} and aphids fed on dsRNA_{Eph} (Student t-test, $p < 0.05$; p-values are indicated in italics).

^dEph-mRNA accumulation from Mulot et al. (2016) (Table 2E, Exp. 1).

^eAfter feeding on dsRNA, aphids were first transferred onto purified virus or infected *M. persiciolata* for 24 h before being transferred onto Col-0 test plants for 72 h.

^fNumber of plants positive by DAS-ELISA/total number of plants inoculated with aphids. * and bold characters indicate significant differences in the number of plants infected between both conditions (Fisher's exact test, $p < 0.05$; p-values are indicated in italics). In brackets, the percentage of infected plants.

^gPercentage of TuYV transmission inhibition when using dsRNA_{Eph}-treated aphids when compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids. no = no reduction of the virus transmission efficiency. The percentage of infected plants for the LacZ control condition was considered as 100%.

^hTuYV genome copies analyzed by qRT-PCR in whole aphids (pool of 20 aphids) collected after the 4 days of the inoculation access period on the test plants.

ⁱIn Exp. 5, after dsRNA acquisition, the aphids were split into two batches; one acquired TuYV from purified virus and the other from TuYV-infected plants.

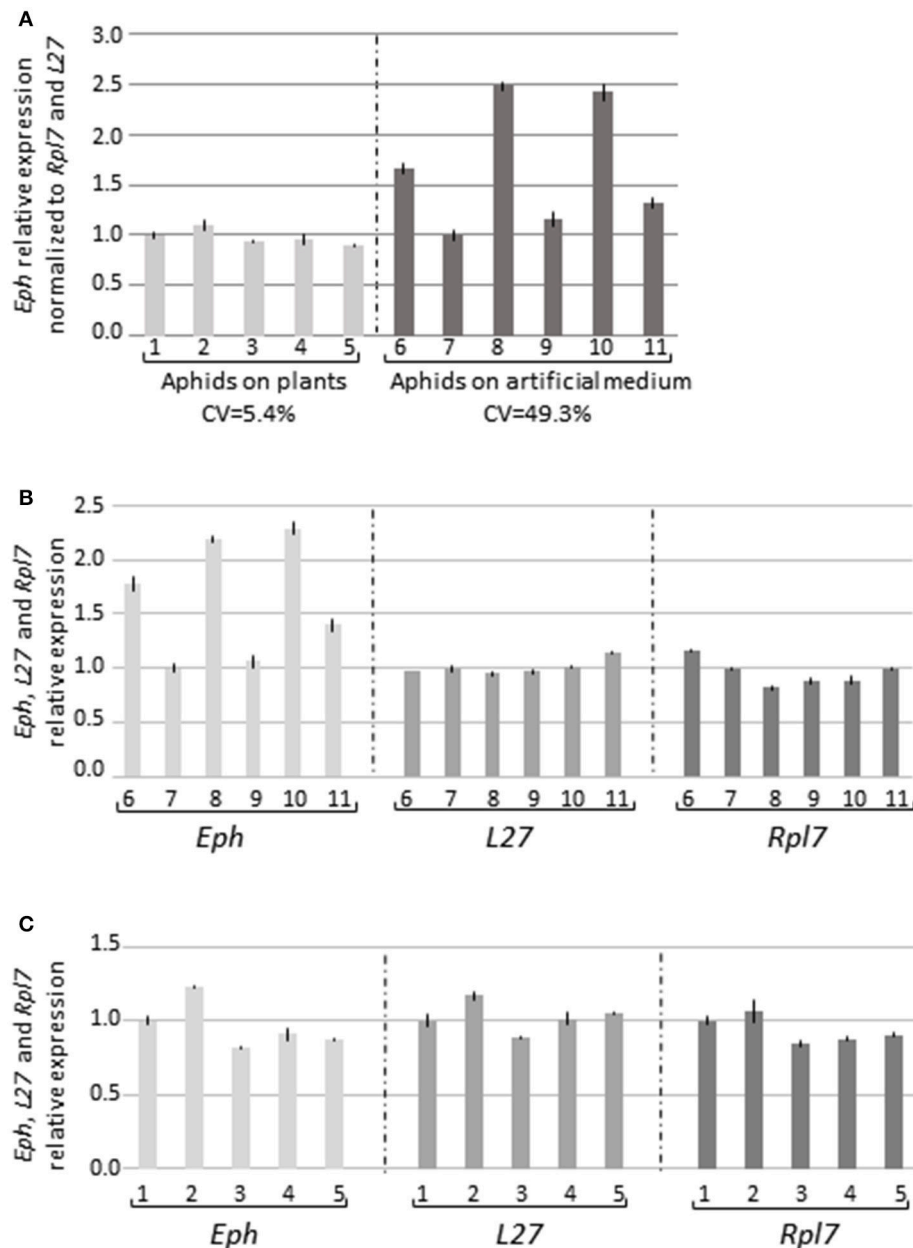


FIGURE 3 | *Eph*-mRNA accumulation in guts from aphids fed on plants or on artificial medium. **(A)** Guts (35 per sample) were dissected from *M. persicae* reared on pepper plants (five samples) or fed during 5 days on the artificial medium MP148 (Harrewijn, 1983) (six samples). The data represent the relative expression of *Eph* in each sample normalized to the accumulation of the two reference genes *L27* and *Rpl7* $\pm$ standard deviation of triplicates. The first sample for each condition was arbitrarily fixed to 1. CV: coefficient of variation. *Eph*, *L27*, and *Rpl7* expression without normalization in aphids fed on an artificial medium **(B)** or on plants **(C)**. Similar numbers referred to the same biological samples.

expression of *Eph* as well as *L27* and *Rpl7* was stable in gut samples collected from aphids fed on plants (Figures 3A,C, S5). The high variation of *Eph*-mRNA accumulation in aphids fed on artificial medium may account for our inability to reproducibly observe a reduction of *Eph*-mRNA accumulation in aphids fed during 5 days on an artificial diet containing the dsRNA_{Eph}.

Feeding *M. persicae* on *in Vitro*-synthesized dsRNA_{Eph} Impacts Internalization of Other Poleroviruses Into the Aphid's Body

The specific reduction of virus transmission after acquisition of dsRNA_{Eph} was evaluated with two other poleroviruses transmitted by *M. persicae* (Lecoq et al., 1992; Stevens et al.,

TABLE 3 | Effect of *in vitro*-synthesized dsRNA_{Eph} acquisition on BMVY and CABYV transmission by *M. persicae* and genome internalization in aphids.

Exp.	Aphid feeding source ^a	Source for virus acquisition ^b	nb inf/inoc plants ^c	% of transmission inhibition ^d	Virus genome copies/ μ g RNA internalized into aphids ^e
1	dsRNA _{Eph}	BMVY 50 ng/ μ l	10/32 (31%) <i>1.0E-01</i>	38%	$1.28 \times 10^6 \pm 1.25 \times 10^5$ <i>2.9E-03</i>
	dsRNA _{LacZ}		16/32 (50%)		$2.30 \times 10^6 \pm 2.41 \times 10^5$
2	dsRNA _{Eph}	BMVY 50 ng/ μ l	11/28 (39%) <i>1.4E-01</i>	31%	$3.02 \times 10^6 \pm 0.52 \times 10^5$ <i>7.8E-05</i>
	dsRNA _{LacZ}		16/28 (57%)		$4.15 \times 10^6 \pm 1.06 \times 10^5$
3	dsRNA _{Eph}	CABYV 100 ng/ μ l	1/11 (9%) ^f <i>2.9E-01</i>	67%	$6.02 \times 10^6 \pm 4.46 \times 10^5$ <i>2.7E-03</i>
	dsRNA _{LacZ}		3/11 (27%)		$8.11 \times 10^6 \pm 3.14 \times 10^5$

^a The aphid feeding source were *in vitro* dsRNA targeting Eph (dsRNA_{Eph}) or LacZ (dsRNA_{LacZ}) at a concentration of 400 ng/ μ l in the artificial medium and the AAP was fixed to 5 days.

^b After feeding on dsRNA, aphids were first transferred onto purified virus for 24 h before being transferred onto Col-0 test plants for 72 h.

^c Number of plants positive by DAS-ELISA/total number of plants inoculated with aphids. In brackets, the percentage of infected plants. *p*-values from the Fisher's exact test are indicated in italics.

^d Percentage of TuYV transmission inhibition when using dsRNA_{Eph}-treated aphids when compared to dsRNA_{LacZ}-treated aphids. The percentage of infected plants for the LacZ control condition was considered as 100%.

^e BMVY or CABYV genome copies analyzed by qRT-PCR in whole aphids (6 pools of 20 aphids in Exp. 1, 3 pools of 20 aphids in Exp. 2 & 3) collected after the 4 days of inoculation access period on test plants. * and bold characters indicate significant difference in the amount of viral genomes between the two conditions (Student *t*-test, *p* < 0.05; *p*-values are indicated in italics).

^f In this experiment, four viruliferous aphids (instead of two in the other experiments) were transferred on each test plant for virus inoculation.

2005), *Beet mild yellowing virus* (BMVY) and CABYV. After *in vitro* acquisition of dsRNA, dsRNA_{Eph}-treated aphids transmitted less efficiently BMVY in two independent experiments (38 and 31% transmission inhibition in Exp. 1 and 2, respectively, **Table 3**), but the transmission inhibition was not statistically significant when compared to the control condition using dsRNA_{LacZ}-treated aphids. However, a statistically significant decrease of BMVY genomes internalized into the dsRNA_{Eph}-treated aphids was measured (1.8 and 1.4 times less viral genomes in dsRNA_{Eph}-treated aphids than in dsRNA_{LacZ}-treated aphids; Exp. 1 and 2, respectively, **Table 3**). When CABYV was used as a virus source, the number of infected plants was particularly low, which makes it difficult to draw a clear conclusion on the effect of dsRNA_{Eph} acquisition on the CABYV transmission efficiency (**Table 3**, Exp. 3). Such low transmission efficiency of CABYV from purified virus has previously been observed in our laboratory even with high concentrations of virus in the artificial medium (V. Brault, unpublished), and could be explained by instability of the particles after the purification procedure. Nevertheless, a moderate, but still significant, reduction of the number of CABYV genomes internalized was observed in the dsRNA_{Eph}-treated aphids (**Table 3**, Exp. 3). These results suggest that Eph could have a broader role in poleroviruses transmission by *M. persicae*.

The Inhibition of TuYV Transmission by dsRNA_{Eph}-Treated Aphids Is Not Due to a Reduction in Feeding Activity

The lower virus transmission efficiency of dsRNA_{Eph}-treated aphids could be due to a reduced feeding activity on the virus source. Since the majority of the virus transmission

experiments presented in this manuscript (9 out of 11 in total) were performed using purified virus as the virus source, we measured the feeding activity of the dsRNA-treated aphids when placed onto the artificial diet. Electropenetrography could not be developed to measure the feeding phases of aphids because this technique is not adapted to evaluate sustained ingestion activity of aphids from an artificial medium (Tjallingii, 1985). Therefore, we measured honeydew excretion of the dsRNA_{Eph}-treated aphids after transferring them onto a fresh artificial medium for 48 h. The aphid feeding activity on plants infected with luteovirids has been previously correlated with the efficiency of virus transmission (Sylvester, 1967; Van den Heuvel and Peters, 1990). The surface area covered by honeydew droplets produced by dsRNA_{Eph}-treated aphids was slightly higher, than the one secreted by dsRNA_{LacZ}-treated aphids (**Figures 4A, S6**). In another experiment, no difference in honeydew excretion was observed between dsRNA_{Eph}- and dsRNA_{LacZ}-treated aphids (**Figure S7**). These results show that the reduction of TuYV transmission by dsRNA_{Eph}-treated aphids is not correlated with a lower feeding activity of these aphids on the artificial medium and therefore not linked to a reduced ingestion of virus particles.

Fecundity of dsRNA_{Eph}-Treated Aphids Is Not Affected by Ingestion of dsRNA and/or siRNA From Transgenic *A. thaliana*:Hp-Eph or From *in Vitro*-synthesized dsRNA_{Eph}

In order to investigate the impact of dsRNA and/or siRNA acquisition from transgenic plants or from *in vitro*-synthesized dsRNA on aphid's fecundity, nymph production by the dsRNA-treated aphids was analyzed. Feeding aphids during 10 days on the transgenic plants (Ara:Hp-Eph or Ara:Hp-LacZ) (**Figure 4B**)

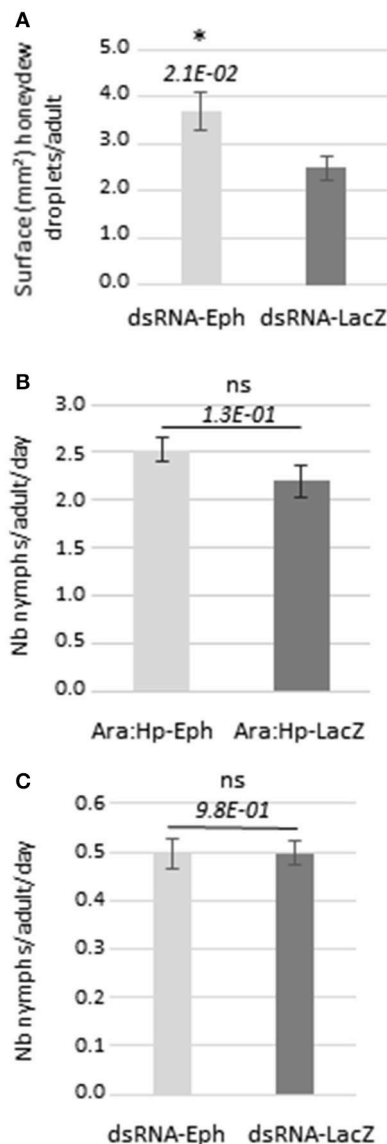


FIGURE 4 | Feeding activity and fecundity of dsRNA-treated aphids. **(A)** Honeydew excretion from dsRNA-treated aphids (after 5 days of acquisition) placed onto feeding artificial medium for 48 h; the bars represent the average of the surface of droplets (surface in mm²) produced per adult or nymph during 48 h. $n = 99$ for each condition **(B)** *M. persicae* fecundity after feeding first instars on Ara:Hp-Eph or Ara:Hp-LacZ for 10 days. After this period, individual adults were transferred to non-transformed Col-0 ($n = 18$ for Ara:Hp-Eph and $n = 10$ for Ara:Hp-LacZ) and nymph production was recorded after 5 days. **(C)** *M. persicae* fecundity after feeding fourth instars or adults on *in vitro*-synthesized dsRNA_{Eph} or dsRNA_{LacZ} for 5 days before transferring 4 adults on individual Col-0 ($n = 28$). Nymph production was recorded after 5 days. $n = 12$ for each condition. Data from **(B)** and **(C)** are from one experiment and represent the mean value of nymphs produced daily per adult $\pm$ standard deviation; ns: non-significant after Student *t*-test (p -value > 0.05); *: p -value < 0.05 after Student *t*-test. p -values are indicated.

or during 5 days on the dsRNA targeting *Eph*-mRNA or *LacZ*-mRNA (Figure 4C) did not affect aphid's fecundity. These results suggest that acquisition of dsRNA or siRNA from either source did not significantly impact aphid physiology. A low fecundity

of aphids fed during 5 days on the artificial medium containing the dsRNA can be observed (Figure 4C). The artificial medium composition may affect aphid fecundity but the amount of dsRNA ingested by aphids from the artificial diet may also have an impact on the aphid physiology.

DISCUSSION

To be transmitted by aphids luteovirids acquired in the phloem of infected plants must cross several epithelia at the gut and salivary gland levels in the vector before being inoculated into a plant during feeding. Virion transport through the epithelia requires virus particle recognition by specific receptors (Mercer et al., 2010). In the present study, we identified Eph as a potential receptor of TuYV in *M. persicae*. Part of the external domain of Eph, corresponding to the fibronectin type III repeats, was able to bind in yeast to the minor capsid protein (RT*) of TuYV, which is strictly required for aphid transmission (Brault et al., 1995). RT* protein is involved in the transcytosis of TuYV through the posterior midgut cells and strictly required for virus internalization into the ASG cells (Brault et al., 1995; Reinbold et al., 2001). We showed that feeding *M. persicae* with siRNA/dsRNA targeting *Eph*-mRNA, produced *in planta* or *in vitro*, prior to TuYV acquisition, consistently reduced TuYV accumulation in aphids and subsequently virus transmission to plants. Since siRNA/dsRNA ingestion by aphids did not affect aphid feeding behavior, we concluded that ingestion of siRNA/dsRNA targeting *Eph*-mRNA likely affected TuYV acquisition by *M. persicae*. A lower accumulation of two other poleroviruses, BMYV and CABYV, in similarly treated aphids, was also observed, suggesting a broader implication of Eph in the internalization of poleroviruses into *M. persicae*.

Virus transmission reduction was sometimes correlated with a reduction in the accumulation of *Eph*-mRNA in aphids, in particular after feeding aphids on transgenic plants expressing the dsRNA_{Eph} during 10 days. However, we observed *Eph*-mRNA instability in aphids fed on an artificial medium. This instability could be potentially intensified, in these non-natural conditions, by fluctuations in dsRNA ingestion along the acquisition period, or alternatively, by dsRNA stability that could be altered during this 5-day period. Nevertheless, it is important to mention that virus transmission inhibition was always linked to a reduction of virus accumulation in aphids. Although we show that Eph is involved in polerovirus transmission by *M. persicae*, we cannot conclude from our experiments whether Eph is acting at the gut, at the ASG, or at both levels in *M. persicae*. Nevertheless, considering that oral acquisition of dsRNA targeting Eph preferentially affects gene expression in the gut level (Mulot et al., 2016), and reduces virus accumulation into the aphid's body, it is likely that Eph, at least, is acting at the gut level.

Ephrin receptors are good candidates to be involved in polerovirus transmission by *M. persicae*. In most of the cases, Ephs and their ephrin ligands control a wide array of cell-to-cell interactions in mammals without involving internalization of both proteins. In contrast, in some instances the interaction between Ephs and ligands results in the endocytosis of the

complex (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003; Pitulescu and Adams, 2010), a phenomenon that clearly resembles poliovirus internalization into aphid cells. Moreover, there is evidence that Eph receptors can also be activated by soluble ephrin ligands present in the environment (Alford et al., 2010). In this regard, it is interesting to point out that Eph receptors are involved in human and simian virus uptake. Eph A2 was identified as a host co-factor for Hepatitis C virus entry in liver cells (Lupberger et al., 2011). Internalization of this enveloped virus by clathrin-dependent endocytosis requires several cell-surface molecules, some thought to be essential receptors while others facilitating virus uptake (von Hahn and Rice, 2008). Another human virus, the *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV) also relies on the presence of Eph A2 to enter epithelial cells, but by micropinocytosis rather than endocytosis (Chakraborty et al., 2012; Hahn et al., 2012). Finally, the *Rhesus monkey rhadinovirus*, a closely relative to KSHV, use a wide array of Ephs to be endocytosed into monkey endothelial cells (Hahn and Desrosiers, 2013).

It is also interesting to mention that several Eph receptors are known to bind to caveolin-1, a protein involved in endocytosis of non-enveloped viruses like simian virus 40 (Pelkmans et al., 2001), echovirus 1 (Marjomaki et al., 2002), and *Junonia coenia* densovirus (Wang et al., 2013). Although luteovirids are thought to be internalized into aphid cells by clathrin-mediated endocytosis, an alternative route for virus uptake based on caveolae is still conceivable (Gildow, 1999; Brault et al., 2007). Indeed, compared to clathrin-mediated endocytosis, caveolae entry results in the formation of vesicles that do not enter the traditional acidic endosome/lysosome system (Thomsen et al., 2002). By avoiding acidification, virus internalization into caveolae might be beneficial for non-replicating viruses, like polioviruses. In the light of these results, it could be interesting to reassess the mechanism of poliovirus internalization into aphid cells by targeting Cav-1 expression in aphids by RNA interference or by using caveolin-specific inhibitors (Rejman et al., 2005).

The ephrin type-B receptor 1-B could be the second aphid protein identified as a potential luteovirid receptor. APN was previously shown to be involved in PEMV (*Enamovirus* genus) internalization into *A. pisum* (Liu et al., 2010; Linz et al., 2015). Here, we bring evidence that Eph is another aphid protein involved in poliovirus acquisition and transmission by *M. persicae*. Determining whether these two proteins act in concert in both aphid species, or are specific for one aphid species, will be a challenge for future studies. As already mentioned, implication of several proteins in the internalization process of mammalian viruses into cells is more likely a general mechanism: viral surface components must first bind to attachment factors on the cell surface before interacting with receptors that drive reactions leading to entry (Mercer et al., 2010; Grove and Marsh, 2011; Cossart and Helenius, 2014). One extreme example is HCV which has been shown to require about ten different molecules for cell entry (Grove and Marsh, 2011). Interestingly, some of them are responsible for virus non-specific attachment on the cell surface while interaction with the liver specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (L-SIGN) is thought to confer tissue tropism *in vivo* (Gardner et al., 2003). Analyzing

Eph-mRNA distribution along the digestive tube of *M. persicae* will show whether this protein is responsible for TuYV gut tropism at the posterior midgut.

In this study, we showed that acquisition by aphids of dsRNA molecules targeting *Eph* can reduce TuYV transmission. Aphid survival and fecundity were not affected by *Eph*-mRNA targeting. Eph may therefore be an ecologically safe target to reduce luteovirids impacts by inhibiting their dispersion by aphids. The dsRNA_{Eph} molecules could be expressed in transgenic plants (as in this study), but could also alternately be sprayed on cultures. This innovative delivery system has been assayed on different aphid species by aerosolizing siRNA targeting a carotene dehydrogenase and a branched chain-amino acid transaminase (Thairu et al., 2017). A moderate inhibition of gene expression was observed but the effect varied upon the targeted gene and the aphid species. Before applying this technology to inhibit expression of *Eph* in aphids, additional experiments are required to address dsRNA_{Eph} stability in the environment and efficacy when aerosolized on aphids. However, at this point, it is tempting to make a parallel with the new strategies that are developed to curtail viral human diseases, and in particular Human immunodeficiency virus infection. Indeed, among the therapies to inhibit Human immunodeficiency virus cell entry, a simultaneous knock down of the CCR5 co-receptor by small RNA hairpins together with the expression of an antiviral fusion inhibitor peptide is under a clinical trial (Wolstein et al., 2014; Hutter et al., 2015).

The results presented in this paper pave the way toward a better comprehension of the molecular mechanisms governing polioviruses transmission by aphids. Expression and localization of the Eph in aphid species differing in their ability to transmit polioviruses together with the identification of Eph viral ligands and cellular partners need to be addressed in the future.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VB, BM, MM, and SB: designed the experiments; MM, BM, SB, MR, SM, and NB: performed the experiments; VB, BM, MM, and SB wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the members of the experimental unit of INRA-Colmar for their valuable technical assistance with plant production. BM was financed by the French National Agency for Research (ANR) in the frame of the project (Virus-vection ANR-07-BLANC-0230). MM was financed by the SPE division of INRA and the Alsace Region. We greatly thank Véronique Ziegler-Graff (IBMP, Strasbourg, France) and W. Allen Miller for critical review of the manuscript and English proofreading.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00457/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alford, S., Watson-Hurthig, A., Scott, N., Carette, A., Lorimer, H., Bazowski, J., et al. (2010). Soluble ephrin a1 is necessary for the growth of HeLa and SK-BR3 cells. *Cancer Cell Int.* 10:41. doi: 10.1186/1475-2867-10-41
- Ammar el, D., Tsai, C. W., Whitfield, A. E., Redinbaugh, M. G., and Hogenhout, S. A. (2009). Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 447–468. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090454
- Barker, H., and Waterhouse, P. M. (1999). “The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes,” in *The Luteoviridae*, eds H. G. Smith and H. Barker (Wallingford, CT: CAB International), 169–210.
- Blanc, S., Drucker, M., and Uzest, M. (2014). Localizing viruses in their insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 403–425. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045920
- Bonaparte, M. I., Dimitrov, A. S., Bossart, K. N., Crameri, G., Mungall, B. A., Bishop, K. A., et al. (2005). Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 10652–10657. doi: 10.1073/pnas.0504887102
- 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(Pt. 6), 1467–1474. doi: 10.1099/vir.0.029355-0
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., et al. (2003). Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J. Virol.* 77, 3247–3256. doi: 10.1128/JVI.77.5.3247-3256.2003
- Brault, V., Herrbach, E., and Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38, 302–312. doi: 10.1016/j.micron.2006.04.005
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K., et al. (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J. Virol.* 74, 1140–1148. doi: 10.1128/JVI.74.3.1140-1148.2000
- Brault, V., Perigon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., et al. (2005). The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J. Virol.* 79, 9685–9693. doi: 10.1128/JVI.79.15.9685-9693.2005
- Brault, V., van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., et al. (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.* 14, 650–659.
- Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., Van den Heuvel, J. F., Richards, K., et al. (1997). Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 230, 323–334. doi: 10.1006/viro.1997.8476
- Burrows, M. E., Caillaud, M. C., Smith, D. M., Benson, E. C., Gildow, F. E., and Gray, S. M. (2006). Genetic regulation of polerovirus and luteovirus transmission in the Aphid *Schizaphis graminum*. *Phytopathology* 96, 828–837. doi: 10.1094/PHYTO-96-0828
- Burrows, M. E., Caillaud, M. C., Smith, D. M., and Gray, S. M. (2007). Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* 98, 106–113. doi: 10.1038/sj.hdy.6800909
- Chakraborty, S., Veetil, M. V., Bottero, V., and Chandran, B. (2012). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with EphrinA2 receptor to amplify signaling essential for productive infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E1163–E1172. doi: 10.1073/pnas.1119592109
- Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A., and Gray, S. M. (1996). Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* 219, 57–65. doi: 10.1006/viro.1996.0222
- Cilia, M., Tamborindeguy, C., Fish, T., Howe, K., Thannhauser, T. W., and 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. doi: 10.1128/JVI.01504-10
- Cossart, P., and Helenius, A. (2014). Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6:a016972. doi: 10.1101/cshperspect.a016972
- 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. doi: 10.1016/j.crvi.2010.03.009
- Dedryver, C. A., Riault, G., Tanguy, S., Le Gallic, J. F., Trottet, M., and Jacquot, E. (2005). Intra-specific variation and inheritance of BYDV-PAV transmission in the aphid *Sitobion avenae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 341–354. doi: 10.1007/s10658-004-4890-1
- Dogimont, C., Slama, S., Martin, J., Lecoq, H., and Pitrat, M. (1996). Sources of resistance to cucurbit aphid-borne yellows luteovirus in a melon germ plasm collection. *Plant Dis.* 80, 1379–1382. doi: 10.1094/PD-80-1379
- Doumayrou, J., Sheber, M., Bonning, B. C., and Miller, W. A. (2016). Role of pea enation mosaic virus coat protein in the host plant and aphid vector. *Viruses* 8:312. doi: 10.3390/v8110312
- Dreyer, F., Graichen, F., and Jung, C. (2001). A major quantitative trait locus for resistance to Turnip yellows virus (TuYV, syn. beet western yellows virus, BWYV) in rapeseed. *Plant Breed.* 120, 457–462. doi: 10.1046/j.1439-0523.2001.00646.x
- Drucker, M., and Then, C. (2015). Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Curr. Opin. Virol.* 15, 63–68. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.006
- Filichkin, S. A., Brumfield, S., Filichkin, T. P., and Young, M. J. (1997). *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J. Virol.* 71, 569–577.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., et al. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4498–4503. doi: 10.1073/pnas.0831128100
- Genander, M., and Frisen, J. (2010). Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 611–616. doi: 10.1016/j.ccb.2010.08.005
- Gildow, F. (1999). “Luteovirus transmission mechanisms regulating vector specificity,” in *The Luteoviridae*, eds H. G. Smith and H. Barker. (Oxon: CAB International), 88–111.
- Gildow, F. E., Reavy, B., Mayo, M. A., Duncan, G. H., Woodford, J. A., Lamb, J. W., et al. (2000). Aphid acquisition and cellular transport of potato leafroll virus-like particles lacking P5 readthrough protein. *Phytopathology* 90, 1153–1161. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.10.1153
- Gray, S., Cilia, M., and Ghanim, M. (2014). Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv. Virus Res.* 89, 141–199. doi: 10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5
- Gray, S., and Gildow, F. E. (2003). Luteovirus-aphid interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 539–566. doi: 10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815
- Grove, J., and Marsh, M. (2011). The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J. Cell Biol.* 195, 1071–1082. doi: 10.1083/jcb.201108131
- Guilley, H., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Lecoq, H., and Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology* 202, 1012–1017. doi: 10.1006/viro.1994.1429
- Hahn, A. S., and Desrosiers, R. C. (2013). Rhesus monkey rhadinovirus uses eph family receptors for entry into B cells and endothelial cells but not fibroblasts. *PLoS Pathog.* 9:e1003360. doi: 10.1371/journal.ppat.1003360
- Hahn, A. S., Kaufmann, J. K., Wies, E., Naschberger, E., Panteleev-Ivlev, J., Schmidt, K., et al. (2012). The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Med.* 18, 961–966. doi: 10.1038/nm.2805
- Harrewijn, P. (1983). The effect of cultural measures on behaviour and population development of potato aphids and transmission of viruses. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 48, 791–798.
- Herrbach, E. (1999). “Effect of luteovirus infection on vector,” in *The Luteoviridae*, eds H. G. Smith and H. Barker. (Wallingford: CABI), 123–125.
- Himanen, J. P., Saha, N., and Nikolov, D. B. (2007). Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 534–542. doi: 10.1016/j.ccb.2007.08.004
- Hipper, C., Monsion, B., Bortolamiol-Becet, D., Ziegler-Graff, V., and Brault, V. (2014). Formation of virions is strictly required for turnip yellows

- virus long-distance movement in plants. *J. Gen. Virol.* 95(Pt. 2), 496–505. doi: 10.1099/vir.0.058867-0
- Hogenhout, S. A., Ammar el, D., Whitfield, A. E., and Redinbaugh, M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359. doi: 10.1146/annurev.phyto.022508.092135
- Hutter, G., Bodor, J., Ledger, S., Boyd, M., Millington, M., Tsie, M., et al. (2015). CCR5 targeted cell therapy for HIV and prevention of viral escape. *Viruses* 7, 4186–4203. doi: 10.3390/v7082816
- Kania, A., and Klein, R. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 240–256. doi: 10.1038/nrm.2015.16
- Kaplan, I. B., Lee, L., Ripoll, D. R., Palukaitis, P., Gildow, F., and Gray, S. M. (2007). Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *J. Gen. Virol.* 88(Pt. 6), 1821–1830. doi: 10.1099/vir.0.82837-0
- Kaushansky, A., Douglass, A. N., Arang, N., Vigdorovich, V., Dambrasukas, N., Kain, H. S., et al. (2015). Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science* 350, 1089–1092. doi: 10.1126/science.aad3318
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., et al. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathol.* 41, 749–761. doi: 10.1111/j.1365-3059.1992.tb02559.x
- Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guillely, H., et al. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 9136–9140. doi: 10.1073/pnas.89.19.9136
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S. M., and Gildow, F. (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. doi: 10.1006/viro.2001.0929
- Linz, L. B., Liu, S., Chougule, N. P., and Bonning, B. C. (2015). *In vitro* evidence supports membrane ananyl aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector. *J. Virol.* 89, 11203–11212. doi: 10.1128/JVI.01479-15
- 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. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.009
- Liu, S., Sivakumar, S., Wang, Z., Bonning, B. C., and Miller, W. A. (2009). The readthrough domain of pea enation mosaic virus coat protein is not essential for virus stability in the hemolymph of the pea aphid. *Arch. Virol.* 154, 469–479. doi: 10.1007/s00705-009-0327-7
- Lupberger, J., Zeisel, M. B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., et al. (2011). EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* 17, 589–595. doi: 10.1038/nm.2341
- Marjomaki, V., Pietiainen, V., Matilainen, H., Upla, P., Ivaska, J., Nissinen, L., et al. (2002). Internalization of echovirus 1 in caveolae. *J. Virol.* 76, 1856–1865. doi: 10.1128/JVI.76.4.1856-1865.2002
- Marston, D. J., Dickinson, S., and Nobes, C. D. (2003). Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5, 879–888. doi: 10.1038/ncb1044
- Mercer, J., Schelhaas, M., and Helenius, A. (2010). Virus entry by endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 803–833. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626
- Mulot, M., Boissinot, S., Monsion, B., Rastegar, M., Clavijo, G., Halter, D., et al. (2016). Comparative analysis of RNAi-based methods to down-regulate expression of two genes expressed at different levels in *Myzus persicae*. *Viruses* 8:316. doi: 10.3390/v8110316
- Ng, J. C., and Falk, B. W. (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 183–212. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325
- Papura, D., Jacquot, E., Dedryver, C. A., Luche, S., Riault, G., Bossis, M., et al. (2002). Two-dimensional electrophoresis of proteins discriminates aphid clones of *Sitobion avenae* differing in BYDV-PAV transmission. *Arch. Virol.* 147, 1881–1898. doi: 10.1007/s00705-002-0859-6
- Pasquale, E. B. (2005). Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 462–475. doi: 10.1038/nrm1662
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3, 473–483. doi: 10.1038/35074539
- Perez White, B. E., and Getsios, S. (2014). Eph receptor and ephrin function in breast, gut, and skin epithelia. *Cell Adh. Migr.* 8, 327–338. doi: 10.4161/19336918.2014.970012
- Peter, K. A., Liang, D., Palukaitis, P., and Gray, S. M. (2008). Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J. Gen. Virol.* 89(Pt. 8), 2037–2045. doi: 10.1099/vir.0.83625-0
- Pitulescu, M. E., and Adams, R. H. (2010). Eph/ephrin molecules—a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev.* 24, 2480–2492. doi: 10.1101/gad.1973910
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M. C., van Den Heuvel, J. F., et al. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* 82(Pt. 8), 1995–2007. doi: 10.1099/0022-1317-82-8-1995
- Rejman, J., Bragonzi, A., and Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol. Ther.* 12, 468–474. doi: 10.1016/j.yymthe.2005.03.038
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M. H., 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. doi: 10.1016/j.virol.2004.05.014
- Stapleton, D., Balan, I., Pawson, T., and Sicheri, F. (1999). The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization. *Nat. Struct. Biol.* 6, 44–49. doi: 10.1038/4917
- Stevens, M., Freeman, B., Liu, H. Y., Herrbach, E., and Lemaire, O. (2005). Beet poleroviruses: close friends or distant relatives? *Mol. Plant Pathol.* 6, 1–9. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00258.x
- Subbarayal, P., Karunakaran, K., Winkler, A. C., Rother, M., Gonzalez, E., Meyer, T. F., et al. (2015). EphrinA2 receptor (EphA2) is an invasion and intracellular signaling receptor for *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Pathog.* 11:e1004846. doi: 10.1371/journal.ppat.1004846
- Sylvester, E. S. (1967). Retention of inoculativity in the transmission of *Pea enation mosaic virus* by pea aphids as associated with virus isolates, aphid reproduction and excretion. *Virology* 32, 524–531. doi: 10.1016/0042-6822(67)90304-2
- Thairu, M. W., Skidmore, I. H., Bansal, R., Novakova, E., Hansen, T. E., Li-Byarlay, H., et al. (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. doi: 10.1111/imb.12301
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002). Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol. Biol. Cell* 13, 238–250. doi: 10.1091/mbc.01-06-0317
- Tjallingii, W. F. (1985). Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol. Exp. Appl.* 38, 187–193. doi: 10.1111/j.1570-7458.1985.tb03517.x
- Torrance, L. (1992). Analysis of epitopes on potato leafroll virus capsid protein. *Virology* 191, 485–489. doi: 10.1016/0042-6822(92)90216-C
- Van den Heuvel, F., and Peters, D. (1990). Transmission of potato leafroll virus in relation to the honeydew excretion of *Myzus persicae*. *Ann. Appl. Biol.* 116, 493–502. doi: 10.1111/j.1744-7348.1990.tb06632.x
- Van den Heuvel, J. F., Boerma, T. M., and Peters, D. (1991). Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* 81, 150–154. doi: 10.1094/Phyto-81-150
- van den Heuvel, J. F., Bruyere, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., et al. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* 71, 7258–7265.
- van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., and Van der Wilk, F. (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* 75(Pt. 10), 2559–2565. doi: 10.1099/0022-1317-75-10-2559

- Veidt, I., Bouzoubaa, S. E., Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Guillely, H., Richards, K., et al. (1992). Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* 186, 192–200. doi: 10.1016/0042-6822(92)90073-X
- von Hahn, T., and Rice, C. M. (2008). Hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* 283, 3689–3693. doi: 10.1074/jbc.R700024200
- Walkey, D. G. A., and Pink, D. A. C. (1990). Studies on resistance to beet western yellows virus in lettuce (*Lactuca sativa*) and the occurrence of field sources of the virus. *Plant Pathol.* 39, 141–155. doi: 10.1111/j.1365-3059.1990.tb02485.x
- Wang, X., and Zhou, G. (2003). Identification of a protein associated with circulative transmission of barley yellow dwarf virus from cereal aphids, *Schizaphis graminum* and *Sitobion avenae*. *Chin. Sci. Bull.* 48, 2083–2087. doi: 10.1360/03wc0153
- Wang, Y., Gosselin Grenet, A. S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L., et al. (2013). Dengue virus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *J. Virol.* 87, 12380–12391. doi: 10.1128/JVI.01396-13
- Whitfield, A. E., Falk, B. W., and Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479–480, 278–289. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.026
- Wolstein, O., Boyd, M., Millington, M., Impey, H., Boyer, J., Howe, A., et al. (2014). Preclinical safety and efficacy of an anti-HIV-1 lentiviral vector containing a short hairpin RNA to CCR5 and the C46 fusion inhibitor. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 1:11. doi: 10.1038/mtm.2013.11
- 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. doi: 10.1128/JVI.01736-07
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., and Klein, R. (2003). EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat. Cell Biol.* 5, 869–878. doi: 10.1038/ncb1045

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer TT and handling Editor declared their shared affiliation.

Copyright © 2018 Mulot, Monsion, Boissinot, Rastegar, Meyer, Bochet and Brault. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental data

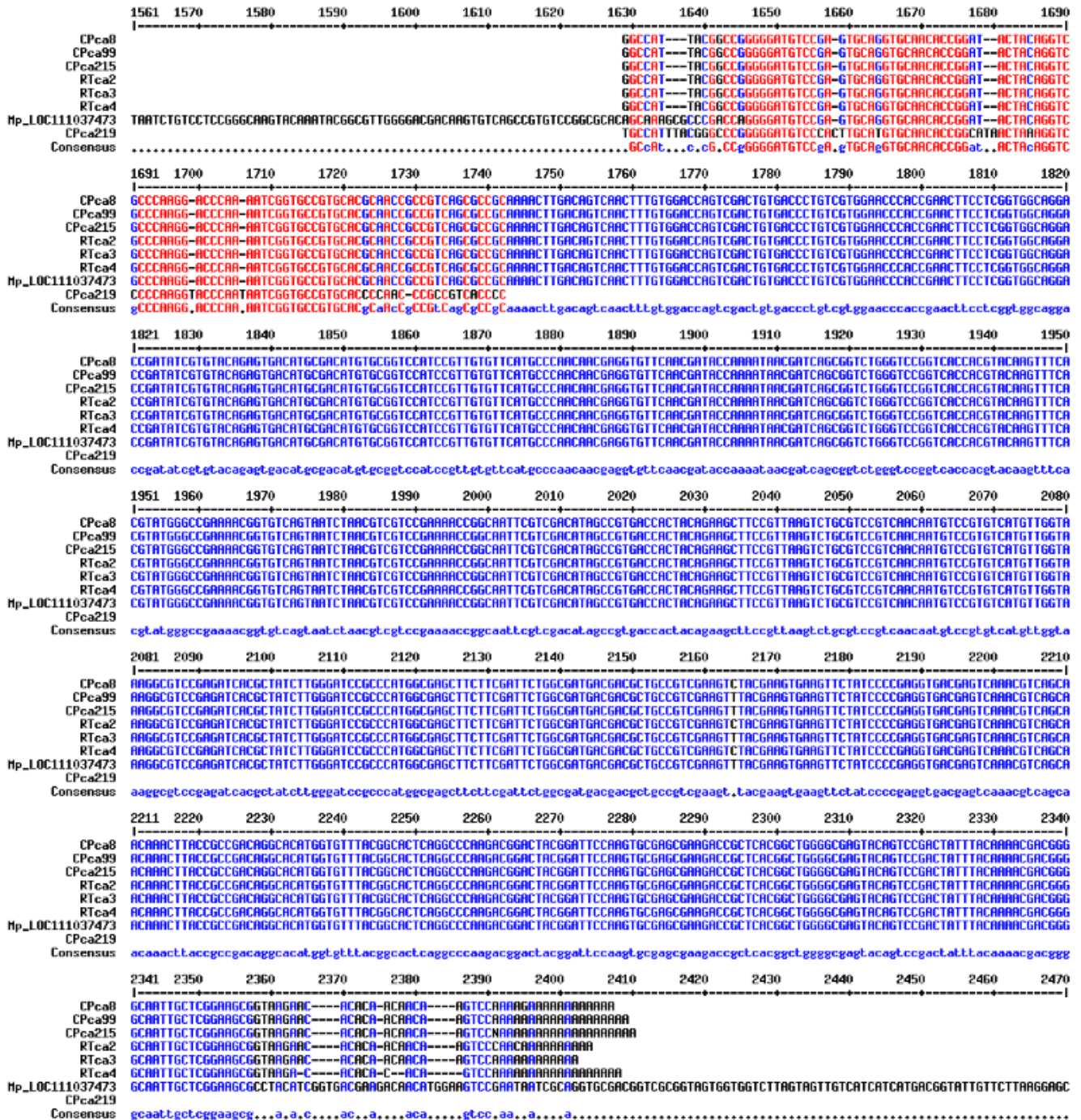


Figure S1: Multiple sequence alignment with hierarchical clustering of the cDNA sequences isolated from the yeast two hybrid screens on the *M. persicae* genome (Mp_LOC11103473). The *M. persicae* cDNA sequences were obtained from the yeast colonies growing on the selective medium [-LWHA] after screening the aphid cDNA library with the CP_{CA} (CPca sequences) or RT_{CA} (RTca sequences). Although all cDNA sequences were of similar size, the sequence of the CPca219 clone of lower quality resulted in a shorter base-pairing with the *M. persicae* genome sequence. A nucleotide polymorphism was observed at position 2164.

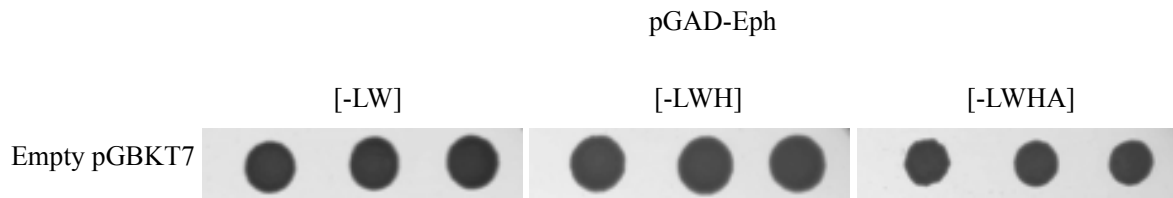


Figure S2: Transcription activation of the GAL4-responsive promoter by the Eph partial domain. The yeast strain Y2HGold was co-transformed with pGAD-Eph and the empty pGBKT7. Three colonies were allowed to grow on a medium lacking leucine and tryptophan [-LW] before being transferred onto a selective medium deprived of leucine, tryptophan, histidine [-LWH] and adenine [-LWHA]. Yeast cells were grown at 28°C for 3 days on [-LW] and for 7 days on [-LWH] and [-LWHA].

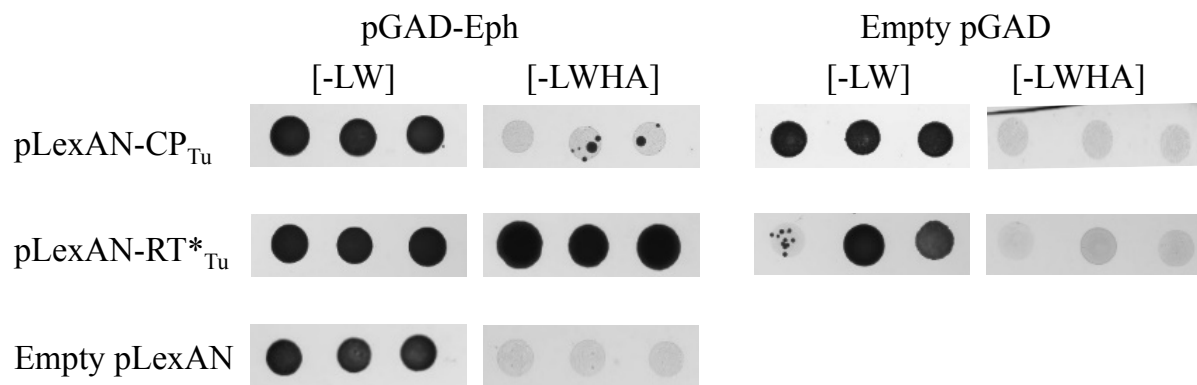


Figure S3: Interaction between TuYV structural proteins and Eph partial domain. The yeast strain NMY51 was co-transformed with pGAD-Eph and pLexAN-CP_{Tu}, pLexAN-RT*_{Tu} or the empty pLexAN. In parallel, yeast cells were co-transformed with the empty pGAD and one of the viral pLexAN-derived plasmids mentioned above. Three colonies were allowed to grow on a medium lacking leucine and tryptophan [-LW] before being transferred onto a selective medium deprived of leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA]. Yeast cells were grown at 28°C for 3 days on [-LW] and for 7 days on [-LWHA].

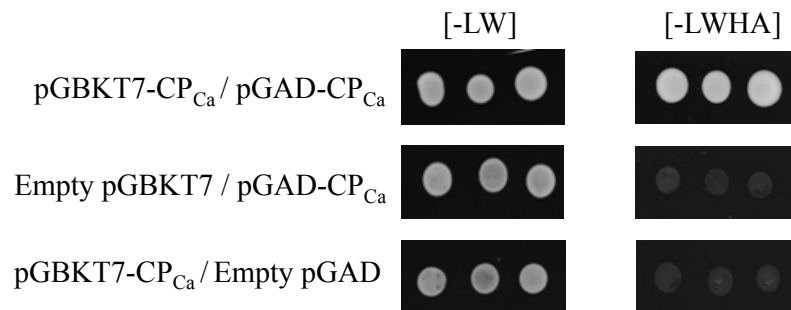


Figure S4: Association of CABYV-CP in yeast. The yeast strain Y2HGold was co-transformed with pGBKT7-CP_{Ca} and pGAD-CP_{Ca}. In parallel, yeast cells were co-transformed with one of the former recombinant plasmid and one of the empty plasmids (empty pGAD or empty pGBKT7). Three colonies were allowed to grow at 28°C for 5 days on a medium lacking leucine and tryptophan [-LW] before being transferred onto a selective medium deprived of leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA].

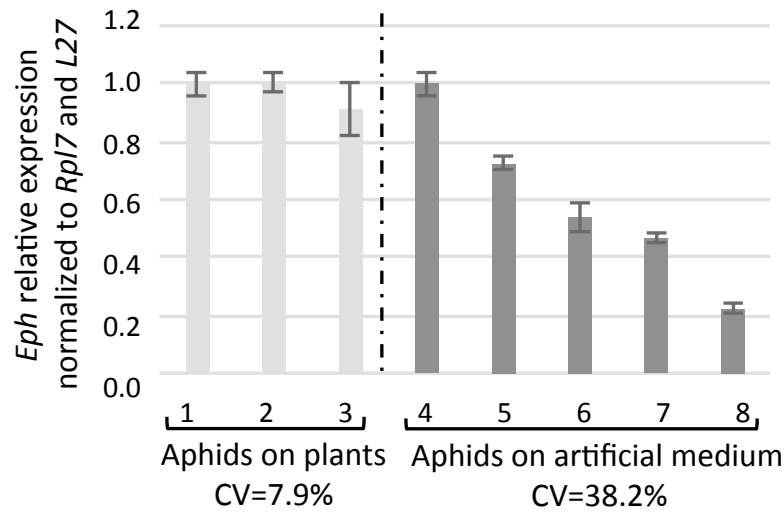


Figure S5: *Eph*-mRNA accumulation in guts from aphids fed on plants or on artificial medium. Hundred guts per sample were dissected from *M. persicae* reared on pepper plants (3 samples) or fed during 5 days on the artificial medium MP148 (5 samples). Data represent the relative expression of *Eph* in each sample normalized to the accumulation of the two reference genes *L27* and *Rlp7* $\pm$ standard deviation of triplicates. The first sample for each condition was arbitrarily fixed to 1. CV: coefficient of variation.

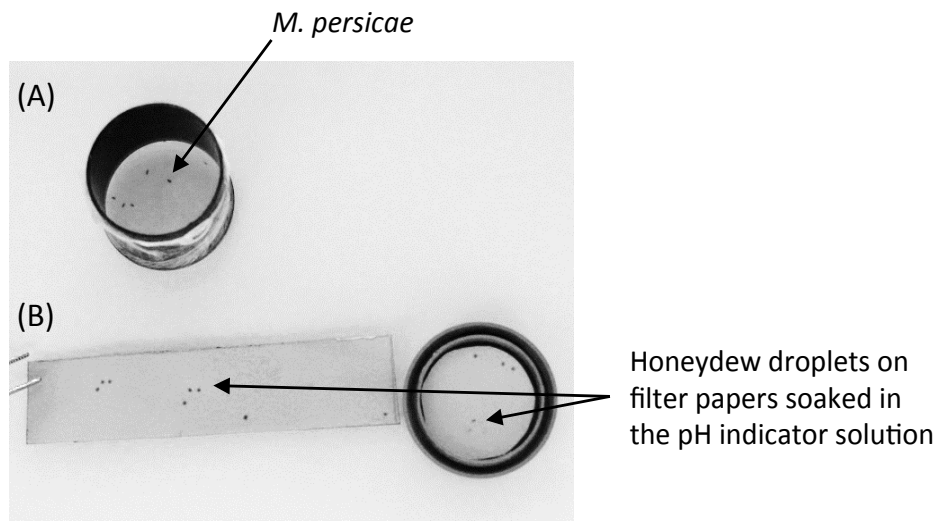


Figure S6: Experimental set-up to evaluate aphid feeding activity on an artificial medium. (A) *M. persicae* were encaged into an opened black container internally covered with a filter paper. The container was closed at one extremity with a parafilm membrane and, at the other end, with another filter paper covering the box lid. Both filter papers shown in (B) were previously soaked into 0.2% bromocresol green to be used as pH-indicator papers. Aphids fed through the parafilm membrane on an artificial medium containing the dsRNA for 48h and the honeydew droplets that appeared as purple dots on the filter papers were quantified.

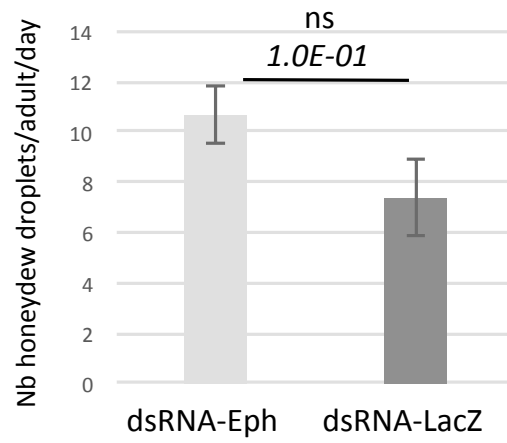


Figure S7: Feeding activity of dsRNA-treated aphids. Honeydew excretion from dsRNA-treated aphids (after 5 days of acquisition) placed onto feeding artificial medium for 48h; the bars represent the average of the number of droplets produced per adult or nymph during this period. ns: non-significant after Student t-test; Results from one experiment with $n=75$.

Table S1

Primer name	Primer sequence 5'>3'	Sense	Restriction sites underlined Mutated nucleotide in bold	Experiment
R_SfiIB-dT20VN	AAGCAGTGGTATCAACGCAG AGTGGCCGAGGCGGCCTTT TTTTTTTTTTTTTTVN	Reverse	SfiI	<i>M. persicae</i> cDNA library. Adaptor for synthesis of the first cDNA strand from mRNA
F_SfiIA-5G	AAGCAGTGGTATCAACGCAG AGTGGCCATTACGGCCGGG GG	Forward	SfiI	<i>M. persicae</i> cDNA library. Adaptor for tagging cDNA 3' end
FR_cDNAAdapt	AAGCAGTGGTATCAACGCAG AGT	-		cDNA amplification
DH01	CATGGGCCATTACGGCCATA GGCCGCCTCGGCC	Forward	SfiI	Adaptor for pGADT7-SfiI construct
DH02	AATTGGCCGAGGCGGCCTAT GGCCGTAATGGCC	Reverse	SfiI	Adaptor for pGADT7-SfiI construct
CA 3	GCAGAGCTCATATGAATACG GTCGCGGC	Forward	SacI, NdeI	pGBKT7-CP _{Ca} and pGBKT7-RT* _{Ca}
CA 8	CAGGAATTCCTATTCGGGTT CTGGA	Reverse	EcoRI	pGBKT7-CP _{Ca}
CA102	TAGTCGACTCTTTGACTATCA T	Reverse	Sall	pGBKT7-RT* _{Ca}
CA103	CCGAAATACGTAGACGGCAG TT	Forward		pGBKT7-RT* _{Ca} and pLexAN-RT* _{Ca} conversion of the stop codon in tyrosine
CA104	CGTCTACGTATTTTCGGGTTCT G	Reverse		pGBKT7-RT* _{Ca} and pLexAN-RT* _{Ca} conversion of the stop codon in tyrosine
R_byCP*	CGTCTACGTATTTGGGGTTG TG	Reverse		pLexAN-RT* _{Tu} conversion of the stop codon in tyrosine
F_byRT*	CCCAAATACGTAGACGAGGA AC	Forward		pLexAN-RT* _{Tu} conversion of the stop codon in tyrosine
F_pLexA-N_RT _{Tu}	ATTAGAGCTCATGAATACGG TCGTGGGTAG	Forward	SacI	pLexAN-CP _{Tu} and pLexAN-RT* _{Tu}
R_pLexA-N_CP _{Tu}	TTGGTACCCTATTTGGGGTT GTGGAATTG	Reverse	KpnI	pLexAN-CP _{Tu}
R_pLexA-N_RT _{Tu}	TTGGTACCTTACTTTACGGAA CCGGATGAG	Reverse	KpnI	pLexAN-RT* _{Tu}
F_pLexAN_CP-RT_CABYV	ATTAGAGCTCATGAATACGG TCGCGGCTAG	Forward	SacI	pLexAN-CP _{Ca} and pLexAN-RT* _{Ca}
R_pLexAN_CP_CABYV	TTGGTACCCTATTTGGGGTTC TGGACCTG	Reverse	KpnI	pLexAN-CP _{Ca}
R_pLexAN_RT_CABYV	ATGGTACCTATCTTTGACTAT CATCCCTG	Reverse	KpnI	pLexAN-RT* _{Ca}
BPqtF0	AAGACAATCTCGCGGGAAG	Forward		real-time PCR
BPqtR1	GGAGACGAACTCCAAAATGA C	Reverse		real-time PCR

2) Expériences complémentaires

Une étape importante dans la validation fonctionnelle est la localisation cellulaire et subcellulaire de la protéine. Une localisation à la surface des cellules des candidats récepteurs permettra de conforter l'hypothèse d'un rôle de ces protéines dans l'accrochage du virus sur les épithéliums. Nous avons tout d'abord cherché à obtenir des données sur la localisation de l'expression des mRNA de la protéine Eph dans les pucerons, en utilisant la technique d'hybridation *in situ* sur des tubes digestifs disséqués. Le site d'entrée du TuYV étant l'intestin moyen postérieur, ces expériences pourraient nous indiquer si la protéine Eph est responsable ou non de la spécificité d'internalisation du virus au niveau de l'intestin moyen. Pour cela des tubes digestifs ont été incubés avec une sonde d'ARN marquée à la digoxigénine et s'hybridant au mRNA *Eph* (expériences réalisées par Aurélie Marmonnier). Des expériences contrôles ont aussi été effectuées avec des sondes antisens ne s'hybridant théoriquement sur aucun mRNA de l'intestin. Cependant, les premiers résultats montrent un fort bruit de fond avec la sonde antisens ce qui n'a pas permis de répondre quant au rôle de Eph dans la spécificité d'internalisation intestinale du TuYV (résultats non montrés). Ces expériences seront poursuivies dans l'avenir.

Une autre méthode pour connaître la localisation du récepteur Eph serait l'immunolocalisation, qui nécessite l'obtention d'anticorps spécifiques dirigés contre Eph. Ces anticorps ont été obtenus à partir d'un peptide de synthèse issu du deuxième domaine FNIII de Eph. Nous avons pris soin de vérifier que les séquences protéiques sélectionnées ne présentent pas d'homologies avec les autres protéines de *M. persicae*. La séquence FYPRGDESNVSNKLT de 15 acides aminés a été choisie pour obtenir les anticorps car elle est, selon les prédictions informatiques, la plus immunogène de la séquence FNIII.

Le sérum obtenu a tout d'abord été testé sur des extraits totaux de pucerons par western blot (réalisé par Sophie Meyer) mais un bruit de fond important n'a pas permis d'exploiter plus ce sérum dans des expériences d'immunolocalisation. Nous avons donc cherché à contrôler la réactivité de ce sérum en exprimant chez *E. coli* la protéine Eph dans sa totalité ou uniquement le domaine extra-cellulaire (travail réalisé par Sophie Meyer et Sylvaine Boissinot). Pour cela, la séquence complète de la protéine «Eph FL» (FL, Full-Length) et son domaine externe «Eph ED» (ED, External Domain) ont été clonés dans un vecteur d'expression procaryotique par la technologie Gateway et exprimées, dans un premier temps, en fusion avec des tags 6 histidines aux extrémités C- et N-terminales de la protéine. Des difficultés ont été rencontrées pour exprimer et solubiliser ces protéines. Seule la protéine Eph ED fusionnée aux tags histidines a pu être détectée seulement par western-blot dans les extraits bactériens en utilisant soit l'anticorps @6his ou l'anticorps @Eph que nous avons fait synthétiser (**Fig. 32**). L'expression de la séquence «Eph FL» fusionnée aux

tags histidines n'a pour l'instant pas été obtenue. Afin d'augmenter l'expression de la protéine Eph ED dans les bactéries, sa séquence a été transférée dans un nouveau vecteur d'expression procaryotique permettant la synthèse du domaine Eph ED en fusion avec les deux tags histidines et la protéine Maltose binding protein (MBP) (à l'extrémité N-terminale). L'expression de cette protéine de fusion a pu être observée sur un gel SDS-PAGE et sa nature contrôlée par western-blot avec l'anticorps @Eph (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que l'anticorps synthétisé à partir du peptide de synthèse reconnaît bien Eph ED.

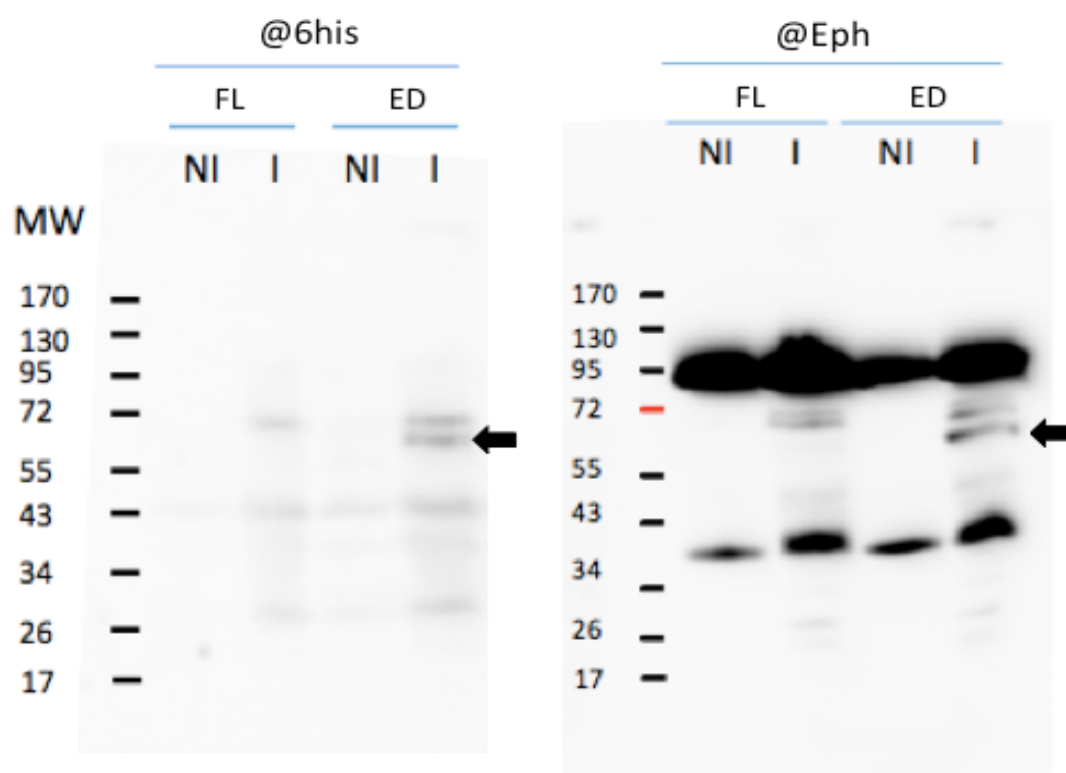


Figure 32 : Expression dans des bactéries et détection du Domaine Extracellulaire (ED) de la protéine Eph fusionnée à des tags 6His par Western-Blot. L'expression de Eph ED a pu être détectée à la fois en utilisant l'anticorps @6his et l'anticorps @Eph. La taille attendue du domaine Eph ED est de 66kDa, tandis que celle de FL est de 112kDa. L'expression de la protéine Full-Length Eph (FL) n'a donc pas été obtenue. Les résultats de l'expression en bactérie de Eph ED fusionné à la MBP ne sont pas montrés. NI : non induit ; I : induit

L'anticorps reconnaissant Eph ED a ensuite été utilisé dans des expériences de compétition (expériences réalisées par Sophie Meyer). Les pucerons ont acquis les anticorps pendant 48h avant d'être transférés sur une source de virus purifié pendant 24h puis sur des plantes tests à raison de 2 pucerons par plante. Le sérum non purifié et non glycérolé dirigé contre Eph ED a été utilisé à raison de 5 ou 25µl dans le milieu d'acquisition (80µl volume final) et les plantes tests ont ensuite été testées par ELISA 3 semaines plus tard (**Table 9**). Ce premier test indique que l'acquisition des anticorps @Eph ne bloque pas la transmission du TuYV, mais au contraire la stimule. Une hypothèse pour expliquer ce résultat serait que la fixation des anticorps sur le domaine extracellulaire de Eph stimule l'endocytose médiée par ces récepteurs et augmente les quantités de virus internalisées dans les cellules. Ce premier test est préliminaire et à répéter, car les effectifs ne sont pas suffisants pour une analyse statistique.

Des expériences de *pull-down* auraient pu être envisagées avec cet anticorps pour confirmer l'interaction *in vivo* entre le récepteur Eph et les capsides virales. Ces expériences auraient aussi pu permettre d'identifier d'autres composants impliqués dans l'endocytose des virus. Cependant, en considérant le bruit de fond important observé lors des expériences de détection de la protéine Eph dans les pucerons entiers, il est possible que notre anticorps ne soit suffisamment spécifique pour mener ces expériences. L'obtention de nouveaux anticorps plus spécifiques, obtenus à partir des protéines Eph ED purifiées, permettrait d'envisager ces expériences.

	@Eph 25µl	@Eph 5µl	@P0 25µL	@P0 5µl	Témoin sucrose 10µl	Témoin sucrose 2µL
Nombre de plantes infectées/ nombre total de plantes	7/11	3/13	0/11	1/12	0/12	0/12
% plantes infectées	63%	23%	0%	8%	0%	0%

Table 9 : Effet de l'acquisition d'anticorps @Eph sur la transmission du TuYV. Acquisition de virus purifié à la concentration 50ng/µL pendant 24h, deux pucerons déposés par plante test (Col-0). Les résultats présentent le nombre de plantes infectées (analysées par DAS-ELISA) sur le nombre total de plantes inoculées. Les contrôles représentent une acquisition d'anticorps dirigés contre la protéine P0 du TuYV ou aucune acquisition anticorps (témoin sucrose 17% final).

V. Validation fonctionnelle de la protéine ALY

Malgré le fait que la protéine soit nucléolaire et qu'elle n'ait jamais été identifiée comme un récepteur viral dans la littérature scientifique, nous avons tout de même voulu savoir si la protéine ALY est impliquée dans la transmission du TuYV par pucerons.

Pour cela, nous avons fait acquérir *in vitro* à des pucerons des dsRNA ciblant ALY durant 3 ou 5 jours, à la concentration de 0,4µg/µL, afin d'inhiber l'expression du gène ALY (les dsRNA utilisés sont ceux décrits dans la publication n°1 : Comparative Analysis of RNAi-Based Methods to Down-Regulate Expression of Two Genes Expressed at Different Levels in *Myzus persicae*, voir Partie 1). Les pucerons ainsi traités ont ensuite acquis les particules de TuYV purifiées à la concentration 25ng/µL pendant 24 heures avant d'être transférés sur des plantes d'*A. thaliana* durant 3 jours. Les plantes tests ont ensuite été analysées 3 semaines plus tard par ELISA (**Table 10**). Tous les résultats de transmission ont été analysés statistiquement par des tests de Fisher qui ont indiqué qu'il n'y a pas de différence statistique entre les deux traitements, acquisition de dsRNA ALY ou de dsRNA contrôles LacZ. Au vu de ces résultats, les expériences de validation fonctionnelle du gène ALY n'ont pas été poursuivies.

		dsRNA ALY		dsRNA LacZ	
		plantes infectées/ effectif total	% plantes infectées	plantes infectées/ effectif total	% plantes infectées
3 jours d'acquisition de dsRNA	Exp. 1	21/39	54%	17/39	44%
	Exp. 2	18/39	46%	26/40	65%
	Exp. 1 + Exp. 2	39/78	50%	43/79	54%
5 jours d'acquisition de dsRNA	Exp. 1	18/33	55%	27/34	79%
	Exp. 2	26/36	72%	27/35	77%
	Exp. 1 + Exp. 2	44/69	64%	54/69	78%

Table 10 : Tests de transmission du TuYV après acquisition par les pucerons de dsRNA ALY ou de dsRNA LacZ pendant 3 ou 5 jours.

VI. Conclusion

Nos résultats montrent que l'acquisition orale par le puceron *M. persicae* de molécules initiateuses du RNAi (siRNA/dsRNA) ciblant les séquences FNIII de *Eph* réduit significativement, et de manière reproductible, la capacité de l'insecte à transmettre le virus de la jaunisse du navet (TuYV), et dans une moindre mesure, le virus de la jaunisse modérée de la betterave (BMV). Ces résultats ont été obtenus en utilisant les plantes transgéniques exprimant des tiges boucles d'ARN ou par l'acquisition de dsRNA synthétisés *in vitro*. En accord avec les résultats de transmission des virus, nos expériences montrent que les acquisitions des siRNA/dsRNA ciblant *Eph* réduisent l'internalisation des particules virales du TuYV, du BMV et dans une moindre mesure celles du virus de la jaunisse des cucurbitacées (CABV). L'ensemble de ces expériences suggère que le récepteur de l'éphrine pourrait être un récepteur d'accrochage ou d'internalisation des polérovirus chez *M. persicae*. L'acquisition par les pucerons de dsRNA ALY n'a pas permis d'obtenir une diminution reproductible de la transmission du TuYV, suggérant que ce gène n'est pas impliqué dans la transmission du virus. Néanmoins, il faut rappeler que l'acquisition de dsRNA ALY n'a jamais conduit à une réduction importante et reproductible de l'accumulation de son mRNA (voir Mulot et al., 2016), ce qui ne permet pas d'éliminer de manière définitive une implication de cette protéine dans le processus de transmission du TuYV.

VII. Discussion générale

1) Originalité du travail

C'est à notre connaissance la première fois que l'utilisation de l'ARN interférence ciblant un gène de pucerons permet de réduire la transmission d'un virus de plante. Une seule étude avait auparavant permis d'identifier, par ARN interférence, le gène de puceron *MPCP4* comme étant impliqué dans l'acquisition du CMV par *M. persicae* (Liang and Gao, 2017). *MPCP4* est une protéine cuticulaire interagissant dans la levure avec la protéine de capside du CMV. L'expression de *MPCP4* augmente lorsque l'insecte se nourrit sur une plante infectée par le CMV, avec un pic d'expression 24 h après acquisition. Ces auteurs ont montré que l'inhibition de l'expression du gène *MPCP4* par l'acquisition de dsRNA réduit significativement les quantités de génomes du CMV retenues dans le puceron. Néanmoins, aucune corrélation avec une diminution de la transmission du CMV n'a été mentionnée dans cette étude.

Une autre étude a montré que l'inhibition de l'expression d'un gène chez le fulgore *Laodelphax striatellus* par ARN interférence conduisait à la réduction de la transmission du virus de la striure du riz (*Rice stripe virus* ou RSV, genre *Tenuivirus*) (Liu et al., 2015). De

même que dans l'étude mentionnée précédemment, une protéine cuticulaire de *L. striatellus* a été identifiée comme un partenaire potentiel de la protéine de la nucléocapside pc3 du RSV par le système du double hybride en levure. Cette protéine, appelée CPR1, est capable de se lier à la protéine pc3 à la fois *in vivo* et *in vitro* et colocalise avec le RSV dans les hémocytes de l'insecte (Liu et al., 2015). L'inhibition de l'expression de CPR1 chez *L. striatellus* par acquisition de dsRNA synthétisés *in vitro* n'a pas réduit la concentration du RSV dans l'intestin. Cependant, elle a entraîné une diminution de l'accumulation du virus dans l'hémolymph et dans les glandes salivaires, et a conduit à une diminution de l'efficacité de la transmission du RSV par son vecteur. Ces données suggèrent que CPR1 interagit avec le RSV et stabilise les virions dans l'hémolymph, probablement en les protégeant d'une possible dégradation ou en favorisant leur adressage vers les glandes salivaires.

2) Les récepteurs de l'éphrine, une nouvelle classe de récepteurs viraux

Afin de confirmer l'importance de la protéine Eph dans la transmission du TuYV par *M. persicae*, il serait intéressant de pouvoir vérifier l'interaction de cette protéine, ou de son domaine extra-cellulaire, avec les particules virales. Les expériences de Far western blot menées au laboratoire (expériences réalisées par Sophie Meyer) n'ont pas permis de contrôler cette interaction en raison d'une liaison aspécifique entre les particules virales et le tag protéique fusionnée au domaine extra-cellulaire de Eph. Nous envisageons donc d'exprimer ce domaine à partir de sa séquence native non fusionnée à un tag. Ces expériences de Far western pourraient être appliquées à différents mutants viraux et nous permettraient d'identifier les déterminants viraux de surface impliqués dans l'interaction avec Eph. Enfin, l'obtention de pucerons mutés dans le gène codant pour cette protéine grâce au système CRISPR-Cas9 permettrait d'apporter la preuve définitive de l'implication de cette protéine dans la transmission du TuYV et éventuellement des autres polérovirus.

Les récepteurs de l'éphrine ont été récemment identifiés comme des facteurs importants de l'entrée cellulaire de plusieurs virus humains. Il est à noter que ces preuves de l'implication des récepteurs de l'éphrine dans la transmission virale chez les mammifères nous ont été rapportées bien après l'identification de la protéine Eph du puceron par Baptiste Monsion par le système double hybride dans la levure. Une équipe de recherche à Strasbourg a utilisé en 2011 un crible d'ARN interférence pour identifier les gènes impliqués dans l'entrée du virus de l'hépatite C (HCV, virus enveloppé de la famille des *Flaviridae*) dans les cellules humaines (Lupberger et al., 2011). L'entrée du HCV est un processus séquentiel impliquant les glycoprotéines de l'enveloppe virale ainsi que plusieurs facteurs responsables de l'attachement puis de l'entrée du virus dans la cellule (von Hahn and Rice, 2008). L'attachement du virus à la cellule cible se fait par interaction entre des glycoprotéines de

l'enveloppe et des glycosaminoglycanes à la surface des cellules (Barth et al., 2006). Le HCV est ensuite internalisé par un mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine nécessitant notamment la formation du complexe protéique entre la tetraspanine CD81 (*Cluster of differentiation*) et la protéine transmembranaire CLDN1 (Claudin-1) (Harris et al., 2010). Le crible d'ARN interférence a permis aux auteurs d'identifier les récepteurs tyrosine kinase EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) et EphA2 comme des cofacteurs facilitant l'entrée du HCV. L'utilisation d'inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase, de siRNA ciblant EphA2 ou encore d'anticorps ciblant la partie extracellulaire de EphA2 affecte fortement l'entrée du virus dans des cellules humaines. De plus, EGFR et EphA2 régulent le recrutement et la formation des complexes protéiques CD81-CLDN1. Enfin, les auteurs ont montré que les récepteurs à activité tyrosine kinase EGFR et EphA2 ne sont pas seulement impliqués dans l'entrée du HCV, mais aussi dans la propagation du virus de cellule à cellule.

Les récepteurs de l'éphrine ont aussi été identifiés comme les récepteurs viraux assurant l'entrée de deux virus phylogénétiquement proches et appartenant à la famille des *Herpesviridae* : le *Rhesus monkey rhadinovirus* (RRV) et le KSHV. Le KSHV est protégé d'une enveloppe dans laquelle sont ancrées plusieurs glycoprotéines virales appelées gB, gH, gL, gM, and gN. Les protéines gH et gL sont organisées en dimères dans l'enveloppe virale. Une étude datant de 2012 a montré que l'interaction entre le dimère gH/gL et le récepteur EphA2 induit la phosphorylation de EphA2 et l'internalisation du virus par un mécanisme d'endocytose non connu (Hahn et al., 2012). Le site d'interaction du complexe gL/gH avec la protéine EphA2 est le domaine de liaison au ligand ce qui explique que le traitement des cellules avec les ligands éphrine A2 inhibe l'infection par le KSHV (Hahn and Desrosiers, 2013). Le récepteur EphA2 joue aussi un rôle important, pour l'entrée par le mécanisme d'endocytose à clathrine, d'un virus proche du KSHV, le *Rhesus monkey rhadinovirus* (RRV) qui infecte les macaques Rhesus (Alexander et al., 2000; Dutta et al., 2013; Searles et al., 1999). Faisant suite aux travaux sur le rôle du récepteur EphA2 dans le cycle infectieux du KSHV, des chercheurs se sont intéressés au rôle des récepteurs de l'éphrine lors de l'infection du RRV. Ils ont ainsi pu montrer que le RRV utilise une large gamme de récepteurs de l'éphrine pour son entrée par endocytose dans les cellules endothéliales des singes (Hahn and Desrosiers, 2013). Cette entrée est aussi dépendante de l'interaction entre les glycoprotéines gL/gH de l'enveloppe du RRV et les récepteurs de l'éphrine. Cependant, l'entrée du RRV dans le fibroblaste se fait de manière indépendante des récepteurs de l'éphrine, indiquant que des mécanismes différents sont utilisés par ce virus pour entrer dans ces cellules.

Il est intéressant de signaler que les protéines orthologues des protéines Eph et ALY identifiées chez le puceron comme partenaires des polérovirus sont toutes deux impliquées dans la transmission et le cycle infectieux du KSHV chez les mammifères. Le rôle d'ALY dans

la transmission des polérovirus par puceron n'a pour l'instant pas été démontré. Son identification comme partenaire des protéines de structure du TuYV relance l'hypothèse d'une possible réplication modérée de ce virus dans les cellules du puceron. Néanmoins, la réplication des polérovirus n'ayant pour le moment pas été démontrée dans le puceron, il est possible que les polérovirus et les *Herpesviridae* possèdent des origines phylogénétiques lointaines et que ces interactions aient été conservées. Il est aussi envisageable que ces interactions soient liées à une forme de convergence évolutive.

3) Les récepteurs de l'éphrine et l'endocytose médiée par les cavéolines

Les virus d'animaux utilisent le plus communément la voie de l'endocytose par vésicules recouvertes de clathrine pour infecter les cellules (Maniak, 2001). Les autres voies d'entrée par endocytose fréquemment utilisées sont la macropinocytose, l'endocytose médiée par les cavéoles et l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques (Mercer et al., 2010). Si le HCV utilise les récepteurs de l'éphrine pour entrer dans les cellules humaines par endocytose à clathrine, il est intéressant de noter que, chez les mammifères, plusieurs récepteurs de l'éphrine interagissent avec la protéine Cav-1 (cavéoline 1) (Couet et al., 1997; Lajoie et al., 2007; Vihanto et al., 2006; Yamamoto et al., 1998). La protéine Cav-1 est une protéine majeure et indispensable au complexe d'endocytose médié par les cavéoles qui est notamment impliquée dans des phénomènes de transcytose chez les mammifères (Frank et al., 2009; Lajoie and Nabi, 2010).

Une étude a montré que l'interaction entre Cav-1 et le récepteur EphB1 est indispensable à la signalisation déclenchée après interaction entre le récepteur EphB1 et son ligand et conduit à une internalisation du récepteur EphB1 dans des cavéoles. D'autres récepteurs de l'éphrine, les récepteurs EphA2 et EphB4 semblent également dépendre de Cav-1 pour leur activité (Muto et al., 2011; Vihanto et al., 2006). Une étude a également montré que le récepteur EphA2 est impliqué dans l'entrée du KSHV par endocytose liée aux radeaux lipidiques (Chakraborty et al., 2012). Le KSHV s'accroche à la surface des cellules par l'intermédiaire de différentes molécules, notamment des héparanes sulfates et des intégrines. Cette interaction permet de relocaliser le complexe d'entrée au niveau de radeaux lipidiques riches en Cav-1 et d'y recruter plusieurs récepteurs d'entrée, dont le récepteur EphA2. Le récepteur EphA2 se lie également à des molécules de signalisation, et est responsable du recrutement de nombreux autres facteurs permettant l'endocytose du KSHV. EphA2 est donc un régulateur crucial de l'infection du KSHV et une cible moléculaire importante pour la lutte contre ce virus (Chakraborty et al., 2012). Le fait que les vésicules d'endocytose dérivent de radeaux lipidiques riches en cavéolines tend à montrer que l'entrée du virus impliquant EphA2 pourrait se faire par un mécanisme d'endocytose médiée par les cavéoles. Cependant cette possibilité n'a pas été adressée par les auteurs de la

publication, et des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette possibilité. Les voies de l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques et de l'endocytose médiée par les cavéoles sont très similaires et dépendent de la présence du cholestérol, des radeaux lipidiques et d'une signalisation complexe impliquant des tyrosines kinases et des phosphatases (Mercer et al., 2010).

De nombreuses études basées sur la microscopie électronique ont montré la présence de particules virales des virus de la famille des *Luteoviridae* dans des vésicules recouvertes de protéines structurales identifiées comme des vésicules à clathrine (Gildow, 1993; Gray and Gildow, 2003; Reinbold et al., 2003). Ces observations ont donc conduit à proposer ce mode d'endocytose comme celui responsable de l'internalisation des *Luteoviridae* dans le corps des pucerons. Cependant, il apparaît que les vésicules d'endocytose à clathrine ressemblent fortement aux vésicules d'endocytose médiée par la cavéoline. De plus, les particules de TuYV ont également été observées dans des vésicules non recouvertes de protéines structurales dont la nature exacte reste inconnue. Il serait donc envisageable que l'internalisation des particules des polérovirus se produise également par un mécanisme autre que l'endocytose à clathrine. A cet effet, il serait intéressant de tester le rôle de Cav-1 dans la transmission du TuYV par l'utilisation de l'ARN interférence, ou d'inhibiteurs des cavéoles tels que le Filipin et le Genistei (Rejman et al., 2005). Il est intéressant de signaler qu'il existe déjà un exemple de virus traversant l'intestin d'un lépidoptère par transcytose en utilisant l'endocytose médiée par la cavéoline-1. Il s'agit du *Junonia coenia densovirus* (JcDNV, *Parvoviridae*) qui infecte *Spodoptera frugiperda* (Wang et al., 2013).

4) Eph : un co-récepteur du TuYV

Les expériences d'hybridation *in situ* et d'immunolocalisation permettront de savoir dans quelle(s) partie(s) du tube digestif le gène *Eph* est exprimé (cf. Chapitre 2, IV., 2, « expériences complémentaires »). Cependant, le gène *Eph* du puceron *M. persicae* contient de nombreux sites d'épissage, et plusieurs transcrits alternatifs de ce gène ont déjà été identifiés chez *M. persicae* et *A. pisum*. Il est possible que seuls certains isoformes du gène *Eph* soient spécifiques de certaines cellules de l'intestin et confèrent la spécificité d'internalisation du TuYV. La sonde d'ARN utilisée dans les expériences d'hybridation *in situ* ainsi que l'anticorps anti-Eph que nous avons obtenu ciblent tous deux les séquences des domaines FNIII. Ces séquences FNIII pourraient être conservées chez plusieurs isoformes de *Eph*, y compris ceux n'intervenant pas dans l'accrochage ou l'entrée du virus dans les cellules intestinales. Il est aussi possible qu'un ou plusieurs autres co-récepteurs soient nécessaires pour l'entrée du virus dans les cellules du puceron, ce qui a été fortement suggéré dans des études de génétique réalisées en 2006 et 2007 (Burrows et al., 2006; Burrows et al., 2007). Ces auteurs ont démontré que la transmission des *Luteoviridae* est

régulée en grande partie par un gène majeur ou un ensemble de gènes étroitement liés, tandis que pour chacun des membres des *Luteoviridae* un ensemble unique de gènes mineurs est capable d'influencer l'efficacité de la transmission. De nombreux virus utilisent plus d'une molécule pour leur attachement et leur l'endocytose dans les cellules hôtes (Bhella, 2015; Mercer et al., 2010). Le KSHV est d'ailleurs un bon exemple de cette complexité. Il interagit tout d'abord avec des récepteurs d'accrochage à la surface de la cellule hôte, notamment des héparanes sulfates et des intégrines. Cette interaction permet au virus de se lier avec plusieurs autres récepteurs, dont le récepteur EphA2 et le récepteur xCT. Ces interactions contribuent à créer une cascade de signalisation et le recrutement des facteurs formant le complexe d'endocytose (revue dans : Kumar and Chandran, 2016). On constate, dans ce modèle, que si le récepteur EphA2 est nécessaire pour l'endocytose du virus, il est loin d'être suffisant. Ces découvertes ouvrent donc des pistes à suivre pour identifier les autres corécepteurs du TuYV. Il serait en effet intéressant d'identifier les facteurs partenaires de la protéine Eph dans les pucerons virulifères par des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP). Comme mentionné auparavant, ces expériences ne sont pour l'instant pas envisageables en raison des réactions aspécifiques de l'antisérum obtenu dirigé contre Eph ED. Afin de réduire les réactions aspécifiques, il serait possible de mener ces expériences de co-IP sur des vésicules d'endocytose extraites et purifiées à partir d'intestins disséqués.

Il faut également signaler que le gène *Eph* du puceron *M. persicae* possède de très fortes homologies de séquence (99% d'identité au niveau nucléotidique) avec son orthologue chez *A. pisum*, également vecteur du TuYV (non publié). Il serait donc intéressant d'analyser les homologies de séquences avec des protéines Eph exprimées dans des pucerons non vecteurs du TuYV tel que *A. gossypii*.

Il n'existe pas pour le moment de données précises sur la structure 3D de la capsid du TuYV, mais des travaux sont actuellement en cours pour obtenir la structure du virus par cryomicroscopie (collaboration avec le laboratoire de Patrick Bron, Centre de Biologie Structurale, INSERM/CNRS, Montpellier). L'obtention de ces données, combinées à la structure 3D de la protéine Eph, permettrait de mieux comprendre les interactions entre ces deux protéines.

5) Une nouvelle cible moléculaire pour la lutte antivirale

Les pucerons étant de loin les vecteurs les plus importants assurant la transmission des virus de plante, nos résultats revêtent une grande importance dans le domaine de l'agronomie. Ils apportent la preuve de concept de l'utilisation de la technique d'ARN interférence pour diminuer la transmission des virus par les pucerons. De plus, nous avons montré que

l'inhibition de la transmission des polérovirus n'était pas liée à une modification importante de la physiologie du puceron, ce qui ne perturberait pas les équilibres écologiques. Le gène *Eph* représente donc une cible stratégique dans le cadre d'une lutte antivirale applicable au champ.

La technique d'ARN interférence ciblant les molécules réceptrices des virus est une pratique émergente dans le domaine médical pour limiter la réplication des virus. Cette stratégie, qui consiste à cibler les protéines de l'hôte pour contrecarrer l'infection par un pathogène, porte le nom de *Host-directed therapy* (HDT) (Kaufmann et al., 2017). Un exemple de ces travaux porte sur le HIV (*human immunodeficiency virus*). La protéine CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*) a été identifiée depuis plusieurs années comme un des récepteurs d'entrée du HIV dans les lymphocytes (Berger et al., 1999; Signoret et al., 1998). Il a été montré que l'inhibition de l'expression de CCR5 dans des macrophages transgéniques délivrant des siRNA ciblant CCR5 permet de rendre les macrophages résistants à l'infection (Anderson and Akkina, 2007). Faisant suite à cette découverte, de nombreuses méthodes ont été utilisées afin de cibler CCR5 chez les individus atteints du HIV, parmi lesquelles l'utilisation de siRNA et de hpRNA (Hutter et al., 2015). Une étude clinique est actuellement en cours afin d'évaluer l'utilisation du RNAi pour inhiber l'expression de la protéine CCR5 (étude clinique n°NCT01734850), ce qui souligne le potentiel des méthodes de HDT.

La lutte contre la dissémination du TuYV en champs pourrait se faire par le blocage de l'interaction Ephr/TuYV ou par l'application du RNAi pour diminuer l'expression du récepteur Eph dans le puceron. De nombreuses mises au point et des contrôles supplémentaires seraient cependant nécessaires avant d'envisager l'application de cette technique aux champs. Le choix de la méthode à appliquer permettant l'ingestion des dsRNA par les pucerons demandera une étude plus poussée. En effet, vu la faible acceptabilité des plantes transgéniques par la société, il serait bon d'analyser si la pulvérisation des dsRNA ciblant *Eph* permet de reproduire l'effet sur la transmission observée après une ingestion orale des dsRNA. De plus, toutes les séquences des génomes des organismes potentiellement en contact avec ces dsRNA (autres insectes, petits mammifères...) étant loin d'être connues, il est possible que les dsRNA ciblant *Eph* chez le puceron affectent d'autres cibles chez ces organismes dans le cas d'homologie de séquence avec la séquence *Eph* du puceron. Avant d'appliquer cette technique au champ, il est bien entendu qu'il faudra disposer d'un plus vaste panel de génomes séquencés afin de conclure à son innocuité.

Nous avons signalé la protéine APN du puceron *A. pisum* comme le récepteur du PEMV chez cette espèce de puceron. On ne sait pas encore si APN est aussi un récepteur du TuYV chez *M. persicae* et des expériences sont actuellement en cours pour évaluer cette hypothèse. Le

cas échéant, il serait alors envisageable d'utiliser un système dit de « pyramidage » pour diminuer l'expression simultanée de Eph et d'APN et voir l'effet sur la transmission du TuYV.

Pour conclure, la validation de l'implication du récepteur de l'éphrine dans la transmission du TuYV offre une nouvelle voie pour lutter contre la dissémination du TuYV dans les cultures. Grâce à l'identification de cette cible moléculaire, il pourrait être possible de lutter contre la transmission des polérovirus sans perturber les équilibres écologiques. Les résultats présentés dans ce manuscrit permettent d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission des *Luteoviridae* par leur vecteur.

VIII. Matériel et méthodes :

1) Élevage des pucerons

Les colonies de *M. persicae* et *M. persicae* ssp. *nicotianae* ont été élevées respectivement sur des plants de poivrons *Capsicum annuum* et des plants de tabac *Nicotiana tabacum* à 20°C avec une photopériode de 16 heures.

2) Plantes utilisées pour les agroinfiltrations et les tests de transmission

Des plants de *Nicotiana benthamiana* ont été cultivés dans des serres pendant quatre semaines avant d'être agro-infiltrés. Les plantes agro-infiltrées ont été cultivées dans une chambre à 23°C pendant la journée et à 20°C pendant la nuit avec une photopériode de 10 heures. Les plants d'*A.thaliana* ont été cultivés dans des chambres de croissance avec la même configuration que celle mentionnée ci-dessus.

3) Vérification de l'insertion des transgènes dans les plantes transgéniques de génération T3

L'insertion des transgènes dans les générations de plantes T3 d'*A. thaliana* exprimant des structures d'ARN en tige boucle a été vérifiée par PCR sur du tissu frais en utilisant le kit PCR Plant KAPA3G (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) après avoir sélectionné les des plantes par un traitement herbicide (BASTA®) (séquence des primers en *supplemental data* publication n°1).

4) Inoculation de plantes par les virus via les agrobactéries

Les agrobactéries contenant la séquence à exprimer (séquence virale ou dsRNA) sont mises en culture pendant 18 h dans un milieu LB contenant les antibiotiques appropriés (Rifampicine 100 µg/ml et Kanamycine 250 µg/ml), du MES 10 mM, pH 5,6, et de

l'acétosyringone 20 μ M. Elles ont ensuite été sédimentées par centrifugation (10 min, 4 500 g, 17°C) et remises en suspension dans un tampon contenant MgCl_2 10 mM, MES 10 mM, acétosyringone 150 μ M. La $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ est ajustée à 0,5 puis la suspension est laissée à température ambiante pendant 1 à 3 h. Les feuilles à inoculer sont alors légèrement blessées avec une aiguille, puis les bactéries sont inoculées aux plantes au niveau de la blessure et à l'aide d'une seringue.

5) Détection de siRNA par Northern Blot

Pour évaluer l'accumulation des siRNA dans les plants d'*A. thaliana* transgéniques exprimant des structures d'ARN en tige boucle ou dans les feuilles agro-inoculées de *N. benthamiana* avec ces mêmes constructions, l'ARN total a été extrait des feuilles en utilisant le réactif TRIzol [™](Sigma, St. Louis, MO, USA). Dix microgrammes d'ARN total ont été mélangés avec un volume égal de formamide désionisé puis dénaturés pendant 5 minutes à 95°C. Les ARN totaux ont été séparés sur un gel de polyacrylamide à 17,5% (rapport acrylamide-bisacrylamide 19 : 1, urée 7 M dans du tampon Tris-Borate-EDTA 0,5X) et transférés sur une membrane Amersham Hybond-NX (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) par transfert liquide (cuve Bio Rad, Criterion Blotter, Hercules, CA, USA) pendant 75 min à 80 V / 300 mA. Les ARN ont été fixés sur la membrane par irradiation aux UV (120 000 uJ / cm^2 , Spectrolinker XL-1000 UV Crosslinker, Spectronics, Westbury, NY, USA). Les sondes d'ADN ont été préparées par amplification par PCR d'un fragment de 249 bp pour *Eph*, d'un fragment de 182 bp pour *ALY* et d'un fragment de 276 bp pour *lacZ* en utilisant des amorces listées dans le Tableau des données supplémentaires S1 de la publication n°1 et des dUTP fixé à de la digoxigénine (DIG) (Roche). Alternativement, la sonde ALY a été marquée avec du phosphore radioactif par une collaboratrice d'un laboratoire partenaire (Elodie Klein, IBMP, Strasbourg, France). Pour assurer une charge égale d'ARN dans chaque puit, les membranes ont aussi été hybridées avec une sonde ciblant l'ARN U6. Les signaux ont été détectés en utilisant le kit de chimioluminescence (CDP-Star, Roche) pour les sondes marquées à la digoxigénine, ou par autoradiographie lors de l'utilisation de la sonde radioactive.

6) Purification de petits ARN pour l'acquisition par les pucerons

Les petits ARN ont été précipités à partir de l'ARN total extrait de *N. benthamiana* agro-infiltrées avec les constructions exprimant les structures ARN en tige boucle avant d'être administrés aux pucerons par acquisition sur membrane. Le culot d'ARN extrait au Trizol a été lavé trois fois avec de l'éthanol à 70% pour éliminer les traces toxiques de phénol avant d'être mis en suspension dans de l'eau RNase-free. Un volume égal de PEG 8000 à 20% a ensuite été ajouté à la suspension d'ARN totaux avec 1/10 de volume de NaCl 5M. Après

une incubation d'une heure dans la glace, le mélange a été centrifugé à 13 000 tr / min pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les petits ARN a été mélangé avec trois volumes d'éthanol à 100% avant incubation à -20°C pendant 2 h. Après centrifugation à 13 000 tr / min pendant 30 minutes à 4°C, le culot a été lavé trois fois avec de l'éthanol à 70%, puis remis en suspension dans de l'eau RNase-free. L'intégrité des petits ARN a été vérifiée par dilution des siRNA dans un volume égal de formamide puis par leur séparation sur gel d'agarose à 50 V dans du TAE 0,5X.

7) ARN double brin synthétisé *in vitro*

Les fragments de dsRNA ont été synthétisés en utilisant le kit T7 RiboMAX™ Large Scale Production System (Promega, Madison, WI, USA) sur des fragments de PCR préparés à partir de vecteurs recombinants pLITMUS 28i (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) contenant soit un fragment *Eph* de 249 pb, soit un fragment *ALY* de 182 pb ou soit un fragment *LacZ* de 276 pb.

Pour obtenir les dsRNA, les vecteurs recombinants pLITMUS 28i ont été utilisés comme matrices pour synthétiser des fragments de PCR contenant les séquences introduites flanquées de promoteurs T7 aux deux extrémités en utilisant des amorces T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage dans le vecteur pLITMUS 28i. Les fragments de PCR ont ensuite été purifiés avec le système MSB™ Spin PCRapace (Strattec, Birkenfeld, Allemagne) et utilisés comme matrice pour la transcription *in vitro*. Les milieux réactionnels de transcription contenant les ARN sens et anti-sens ont été dénaturés à 96°C pendant 5 minutes et l'appariement des deux brins d'ARN a été effectué par une diminution progressive et lente de la température jusqu'à atteindre la température ambiante. Des traitements à la RNase H et à la DNase Q1 ont ensuite été effectués sur les dsRNA pendant 20 min à 37°C pour éliminer les matrices d'ADN et l'ARN monocaténaire. Les dsRNA ont été purifiés à l'aide du kit de purification de produits de transcription MEGAclean™ (Thermo Fisher Scientific Ambion™, Austin, TX, USA), quantifiés par spectroscopie à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific), et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose pour déterminer leur pureté et stabilité. Les dsRNA ont été stockés à -20°C avant utilisation.

8) Acquisition de dsRNA / siRNA par *M. persicae*

Pour toutes les méthodes d'acquisition de siRNA et / ou de dsRNA, le temps d'acquisition a été choisi afin d'atteindre l'absorption maximale de dsRNA / siRNA tout en maintenant un bon taux de survie des pucerons. Ces temps d'acquisition ont donc varié entre les différentes sources de dsRNA / siRNA.

- Pour l'acquisition des dsRNA/siRNA à partir des plantes *A. thaliana* transgéniques, des individus du quatrième stade larvaire ou des adultes de *M. persicae* ont été déposés sur les plantes transgéniques pendant deux jours. Les adultes ont ensuite été retirés et les nymphes nées sur les plantes transgéniques ont été conservées pendant 10 à 13 jours supplémentaires avant d'être collectées pour l'extraction de l'ARN et l'analyse par qRT-PCR.

-Pour l'acquisition des dsRNA/siRNA à partir de *N. benthamiana* agro-infiltrées avec les constructions d'ARN en tige/boucle, l'acquisition par *M. persicae* ssp. *nicotianae* a été réalisée en plaçant le premier stade larvaire pendant 10 jours sur des disques foliaires découpés à partir de feuilles agro-infiltrées. Les disques foliaires ont été placés dans de petites boîtes de Pétri à la surface d'une couche d'agarose à 1%. Les disques foliaires ont été remplacés par des disques de feuilles fraîchement infiltrés (cinq ou six jours après infiltration) tous les trois jours pendant une période de 10 jours afin d'assurer la production de niveaux élevés de siRNA tout au long de l'expérience.

- Pour l'acquisition de petits ARN extraits des feuilles agro-infiltrées de *N. benthamiana*, des pucerons *M. persicae* du 4ème stade larvaire ou des adultes ont été placés sur un milieu artificiel contenant la fraction de siRNA diluée dans du saccharose (20% de concentration finale) pendant une période allant de 24 h à trois jours. Les stades de pucerons plus jeunes n'ont pas survécu à cette préparation.

- Pour l'acquisition de siRNA sur *N. benthamiana* infectées par le TRV modifié, des pucerons *M. persicae* ssp. *nicotianae* de second stade larvaire ont été déposés sur des feuilles détachées de *N. benthamiana* infectées par le TRV qui ont d'abord été débarrassées de leurs poils foliaires peu appréciés des pucerons par friction sous l'eau de la surface des feuilles. Les feuilles ont été placées en survie pendant 7 jours et les pucerons ont été récoltés au bout de cette période.

- Pour l'acquisition de dsRNA synthétisés *in vitro* par *M. persicae*, des larves de quatrième stade et des adultes ont été nourris artificiellement pendant 72 h sur des dsRNA dilués dans du saccharose (concentration finale 20%) ou dans du MP148 [47] placé entre deux couches de Parafilm M TM. Pour chaque condition expérimentale, environ 150 à 200 individus ont été placés dans une seule chambre d'alimentation.

Tous les dispositifs expérimentaux, à savoir le matériel végétal infesté de pucerons, ou les pucerons nourris artificiellement, ont été placés dans une chambre de croissance de confinement L2 à 23°C le jour et 20°C la nuit avec une photopériode de 10 h.

9) Extraction d'ARN à partir de pucerons entiers ou d'intestins disséqués

L'ARN total a été extrait de *M. persicae* entiers (8 à 20 pucerons ont été regroupés dans chaque échantillon) en utilisant le kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN) en suivant la procédure d'extraction pour les tissus animaux. Les pucerons ont d'abord été broyés avec un pilon dans le tampon de lyse RLT dans des tubes Eppendorf. L'ARN a été élué dans 50 µl d'eau RNase-free. L'extraction d'ARN a également été réalisée sur des intestins disséqués. La dissection a été effectuée en immobilisant d'abord les pucerons sur un ruban adhésif double face, puis en tirant avec une pince la tête du puceron, permettant d'extraire l'oesophage, l'intestin moyen antérieur et une partie de l'intestin moyen postérieur. Après avoir retiré les têtes, les intestins ont été rassemblés dans 100 µl de tampon de lyse RLT du kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN) placés dans de la glace. L'ARN total a été extrait comme décrit ci-dessus, en omittant le broyage avec le pilon. L'ARN a été élué dans 24 µl d'eau RNase-free et quantifié à 260 nm avec le Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Ces lots d'ARN qui correspondent donc à l'ARN extrait de plusieurs pucerons ou de plusieurs intestins ont été analysés par qRT-PCR.

10) Analyses par qRT-PCR

Pour la qRT-PCR, les cDNA ont été synthétisés à partir de 200 ng d'ARN total extrait d'intestins ou de 1000 ng d'ARN total extrait de pucerons entiers en utilisant des oligo (dT) (Promega) comme amorce et le kit de transcriptase inverse M-MLV (Promega). Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées en triplicats dans des plaques optiques de 96 puits en utilisant 10 à 50 ng de cDNA, 0,6 µL de chaque amorce à 10 mM et 10 µL de SYBR™Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dans un volume final de 20 µL. Les amorces utilisées pour amplifier les mRNA *ALY* et *Eph* ont été définies à l'extérieur des séquences cibles pour éviter l'amplification dans les pucerons des dsRNA acquis. Les réactions de qRT-PCR ont été conduites sur un thermocycleur CFX (Bio-Rad) et initiées avec une incubation de 3 min à 90°C, suivie de 40 cycles d'amplification (10s à 95°C, 30 s à 60°C). L'analyse de la courbe de fusion a été effectuée de 60°C à 95°C avec 5s d'incrément de 0,5°C. Les valeurs de seuil de cycle (CT) ont été calculées en utilisant le logiciel Bio-Rad CFX Manager™ (Bio-Rad). Les niveaux d'expression relatifs ont été normalisés par rapport aux deux gènes de ménage *Rpl7* et *L27* en soustrayant les valeurs de CT contrôles aux valeurs de CT de *Eph* / *ALY*, afin d'obtenir les valeurs de ΔCT . La stabilité de l'expression de *Rpl7* et *L27* a été vérifiée dans cinq lots de 15 *M. persicae* adultes et trois lots de 80-90 tubes digestifs prélevés chez des adultes élevés sur des plants de poivron. Pour les pucerons entiers, les valeurs de CT moyennes pour *rpl7* et *L27* étaient respectivement $20,27 \pm 0,08$ et $16,28 \pm 0,07$. Dans les intestins, les valeurs moyennes de CT pour *rpl7* et *L27* étaient respectivement $20,54 \pm 0,07$ et $16,65 \pm 0,05$. La spécificité des amorces de PCR a été évaluée par analyse de la courbe de

fusion des produits de PCR, et l'efficacité d'amplification moyenne a été déterminée par le logiciel Bio-Rad CFX Manager™. Les niveaux d'expression relatifs de *Eph* et d'*ALY* ont été calculés en utilisant la méthode de $\Delta\Delta CT$. Les résultats ont été analysés par le test t de Student dans lequel n = 3 se réfère à des triplicats techniques.

Pour déterminer le nombre de génomes du TuYV internalisés / acquis chez *M. persicae*, l'ARN total a été extrait à partir des pucerons entiers après un transfert de 3 jours sur des plantes Col-0 non-infectées (période d'inoculation ou IAP) pour vider l'intestin du contenu ingéré sur la source virale (sur le virus purifié ou sur les plantes infectées). L'ARN viral a été converti en cDNA en utilisant l'amorce inverse BPqtRI et le kit de transcriptase inverse M-MLV (Promega). L'amorce directe BPqtFO et l'amorce inverse BPqtR1 ont été utilisées pour amplifier par PCR en temps réel (qRT-PCR) les cDNA correspondant aux nts 3694-3830 sur la séquence génomique TuYV (numéro d'accès X13063) en utilisant le même programme PCR que cité ci-dessus. Parallèlement, l'ARN viral a été extrait de virions purifiés à l'aide du RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Après quantification à 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific), la qRT-PCR a été réalisée comme décrit ci-dessus. Des séries de dilution de 1.10^9 à 1.10^4 copies de cDNA viral obtenues à partir d'ARN extraits de virions purifiés ont été utilisées pour calibrer le thermocycleur Biorad CFX et la comparaison entre les valeurs CT standard et les valeurs CT des échantillons ont fourni une quantification absolue des génomes du TuYV.

11) Tests de transmission de virus par *M. persicae*

Dans les expériences de transmission des polérovirus, des pucerons préalablement nourris pendant 10 jours sur *A. thaliana* transgénique ont été transférés pendant 24 h sur du TuYV purifié préparé comme décrit dans Van den Heuvel et al., 1991. La concentration virale a été fixée à 25 µg / ml dans le milieu artificiel d'alimentation (Bruyère et al., 1997). Pour les tests de transmission à partir de pucerons ayant acquis des dsRNA synthétisés *in vitro*, les pucerons ont ensuite été soit transférés sur une solution de virus purifié, comme décrit précédemment, soit sur des plants de *M. perfoliata* infectés par le TuYV après agro-infiltration. Après 24 h d'acquisition du virus, 2 pucerons virulifères ont été transférés sur des plantes test Col-0 pendant 72 h. Après cette période d'inoculation, certains pucerons ont été collectés pour une analyse plus approfondie par qRT-PCR (voir ci-dessus) tandis que les pucerons restants ont été éliminés par un traitement insecticide. Les plantes ont été testées par DAS-ELISA 3 semaines plus tard en utilisant des anticorps spécifiques du virus comme décrit dans (Bruyère et al., 1997).

12) Tests de fécondité des pucerons et tests de comportement alimentaire

La fécondité des pucerons *M. persicae* au quatrième stade larvaire et à l'âge adulte a été

enregistrée après 5 jours d'acquisition de dsRNA synthétisés *in vitro*. Quatre pucerons ont ensuite été transférés sur chaque *A. thaliana* Col-0. La production de larves a été enregistrée pendant 5 jours. Un test t de Student a été appliqué après avoir contrôlé que les données suivaient un modèle linéaire et qu'il y avait égalité des variances entre les échantillons.

Pour évaluer l'activité alimentaire des pucerons, des larves *M. persicae* de quatrième stade larvaire ou des adultes nourris pendant 5 jours sur des dsRNA synthétisés *in vitro* ont été transférés sur un milieu artificiel alimentaire MP148 (Harrewijn, 1983) pendant 48 h. 9 pucerons ont été enfermés dans des boîtes individuelles (10 ou 11 boîtes par condition) recouvertes intérieurement d'un papier indicateur de pH préparé dans 0,2% de vert de bromocrésol dissous dans l'éthanol, permettant ainsi de dénombrer les gouttelettes de miellat produites par les pucerons. Le nombre ainsi que la taille des taches sur le papier indicateur ont été évalués par le logiciel d'analyse d'image ImageJ™. Après avoir contrôlé que les données suivaient un modèle linéaire et que la variance était égale entre les échantillons, un test t de Student a été appliqué aux valeurs.

13) Synthèse de la sonde ribonucléique pour les expériences d'hybridation *in situ*

La séquence codante complète de *Eph* a été obtenue par reverse-transcription à partir de l'ARN total extrait de *M. persicae* et en utilisant un oligodT pour amorcer la synthèse des cDNA. Les amorces R_FL-EPH et F_FL-EPH (voir *supplemental data* du publication n°2) ont ensuite été utilisées pour amplifier par PCR la séquence. Après digestion du fragment d'ADN avec les enzymes de restriction XbaI et HindIII, un fragment de 653 pb englobant le second domaine de fibronectine et les séquences du domaine transmembranaire a été cloné dans le plasmide BlueScript II SK (+) (Stratagene) digéré avec les mêmes enzymes. Après linéarisation du plasmide recombinant par HindIII, la ribosonde antisens a été synthétisée par la transcriptase T7 avec des nucléotides UTP marqués à la digoxygénine (Promega, Ribomax à grande échelle d'ARN et Roche, mélange de marquage DIG RNA).

14) Préparation de bactéries thermo-compétentes et transformation des bactéries

Un litre de milieu LB estensemencé avec 20 mL d'une pré-culture de 16°C à 37°C (*E. coli*, souche DH5 α) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,5 à 0,6. La culture est refroidie pendant 10 min minimum dans la glace puis sédimentée à 4°C pendant 10 min à 5000 g et le culot est repris dans 160 mL de tampon TfbI froid (30 mM KOAc 100 mM RbCl₂ 10 mM RbCl₂ 50 mM MnCl₂ 15% Glycerol (v/v) pH = 5.8). Une seconde centrifugation est effectuée et le culot est repris dans 3 mL de tampon TfbII froid (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerol (v/v), pH = 6.5) et les bactéries sont aliquotées par 100 μ L dans des

microtubes préalablement refroidis et stockées à -80°C.

15) Transformation de bactéries thermo-compétentes

Après incubation à 4°C pendant 30 min, le tube contenant les bactéries et les produits de clonage est incubé 1 min à 42°C puis 2 min à 4°C. Après incubation des bactéries 1 h à 37°C dans 400 µL de LB, une partie du mélange est étalée sur du milieu LB solidifié avec 2 % d'agar et contenant les antibiotiques appropriés.

16) Détection du virus par DAS-ELISA

Deux à trois semaines après inoculation des plantes, un échantillon de jeunes feuilles de 200 mg est broyé dans 1 mL de tampon de broyage (PBS 1x, Tween-20 0,05%, PVP 2%). 200 µL du surnageant sont déposés dans le puits d'une plaque de microtitration préalablement recouvert avec l'anticorps primaire dirigé contre le virus et dilué dans un tampon carbonate (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9,6). Après une nuit d'incubation à 4°C et trois lavages avec du PBS-Tween 0,05 % pour éliminer les protéines non retenues par l'anticorps, l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dirigé contre le virus, dilué dans un tampon [PBS 1x, Tween-20 0,05 %, PVP 2%, ovalbumine 0,2 %] est déposé dans les puits. Après 4 h d'incubation à 32°C et 3 trois lavages pour enlever l'excès d'anticorps, le complexe est révélé par l'ajout du substrat p-nitrophenyl phosphate incolore, transformé en paranitrophénol, de couleur jaune lorsqu'il est hydrolysé par la phosphatase alcaline. La détection des virions dans chaque puits de la plaque est alors faite en mesurant la DO à 405 nm à différents temps après l'addition du substrat.

17) Extraction de plasmides à partir de bactéries

Les plasmides sont extraits d'une culture d'une nuit à 37°C de bactéries *E. coli* en utilisant le kit QIAprep Spin miniprep (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur, ou selon la méthode classique de la « lyse alcaline ».

18) Extraction d'ARN viraux à partir de virions purifiés

Le protocole « Purification of total RNA from Plant Cells and Tissues » du RNeasy Mini kit (Qiagen) est adapté pour l'extraction des ARN à partir de particules virales purifiées. Le tampon RLT contenant du β-mercaptoéthanol est ajouté à la solution de virions purifiés représentant généralement entre 2 à 3 µg. Après un vortex de 10 sec, l'éthanol 100 % est ajouté dans le tube pour précipiter les ARN. La solution est ensuite déposée sur les colonnes roses du kit et l'extraction se poursuit comme décrit dans le protocole jusqu'à la reprise des ARN viraux dans 30 µL d'eau.

IX. Bibliographie

- Acosta, E.G., Castilla, V., Damonte, E.B., 2008. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 89, 474-484.
- Acosta, E.G., Castilla, V., Damonte, E.B., 2009. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell Microbiol* 11, 1533-1549.
- Acosta, E.G., Castilla, V., Damonte, E.B., 2012. Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PLoS One* 7, e44835.
- Acosta, E.G., Piccini, L.E., Talarico, L.B., Castilla, V., Damonte, E.B., 2014. Changes in antiviral susceptibility to entry inhibitors and endocytic uptake of dengue-2 virus serially passaged in Vero or C6/36 cells. *Virus Res* 184, 39-43.
- Alexander, L., Denekamp, L., Knapp, A., Auerbach, M.R., Damania, B., Desrosiers, R.C., 2000. The primary sequence of rhesus monkey rhadinovirus isolate 26-95: sequence similarities to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and rhesus monkey rhadinovirus isolate 17577. *J Virol* 74, 3388-3398.
- Alford, S., Watson-Hurthig, A., Scott, N., Carette, A., Lorimer, H., Bazowski, J., Howard, P.L., 2010. Soluble ephrin a1 is necessary for the growth of HeLa and SK-BR3 cells. *Cancer Cell Int* 10, 41.
- Alford, S.C., Bazowski, J., Lorimer, H., Elowe, S., Howard, P.L., 2007. Tissue transglutaminase clusters soluble A-type ephrins into functionally active high molecular weight oligomers. *Exp Cell Res* 313, 4170-4179.
- Alhoot, M.A., Wang, S.M., Sekaran, S.D., 2012. RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. *PLoS One* 7, e34060.
- Allison, R.F., Sorenson, J.C., Kelly, M.E., Armstrong, F.B., Dougherty, W.G., 1985. Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: Evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3969-3972.
- Ammar el, D., Tsai, C.W., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., Hogenhout, S.A., 2009. Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annu Rev Entomol* 54, 447-468.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., Vance, V.B., 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13079-13084.
- Anderson, J., Akkina, R., 2007. Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. *Gene Ther* 14, 1287-1297.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., Daszak, P., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19, 535-544.
- Ang, F., Wong, A.P., Ng, M.M., Chu, J.J., 2010. Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virol J* 7, 24.
- Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases, 1985. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 719, 1-116.
- Ashoub, A., Rohde, W., Prufer, D., 1998. In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res* 26, 420-426.
- Astúa, M.M., 2012. Unveiling and Blocking the Interaction Between Tomato Spotted Wilt Virus and Its Insect Vector, *Frankliniella Occidentalis*. Kansas State University.
- Azzam, O., Frazer, J., de la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P., Maxwell, D.P., 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204, 289-296.
- Bachmann, A., Knust, E., 2008. The use of P-element transposons to generate transgenic flies. *Methods*

Mol Biol 420, 61-77.

Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M.A., Hay, R.T., 1990. Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J Gen Virol* 71 (Pt 10), 2251-2256.

Bak, A., Gargani, D., Macia, J.L., Malouvet, E., Vernerey, M.S., Blanc, S., Drucker, M., 2013. Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *J Virol* 87, 12207-12215.

Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L.D., Duvallet, G., Jittapalapong, S., 2014. Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect Genet Evol* 28, 596-615.

Bansal, R., Michel, A.P., 2013. Core RNAi Machinery and Sid1, a Component for Systemic RNAi, in the Hemipteran Insect, *Aphis glycines*. *Int J Mol Sci* 14, 3786-3801.

Barth, H., Schnober, E.K., Zhang, F., Linhardt, R.J., Depla, E., Boson, B., Cosset, F.L., Patel, A.H., Blum, H.E., Baumert, T.F., 2006. Viral and cellular determinants of the hepatitis C virus envelope-heparan sulfate interaction. *J Virol* 80, 10579-10590.

Bass, B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101, 235-238.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P., Liu, J.L., 2014. Highly Efficient Targeted Mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 System. *Cell Rep* 6, 1178-1179.

Baumberger, N., Tsai, C.H., Lie, M., Havecker, E., Baulcombe, D.C., 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 17, 1609-1614.

Bencharki, B., Boissinot, S., Revollon, S., Ziegler-Graff, V., Erdinger, M., Wiss, L., Dinant, S., Renard, D., Beuve, M., Lemaitre-Guillier, C., Brault, V., 2010. Phloem protein partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 799-810.

Berger, E.A., Murphy, P.M., Farber, J.M., 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17, 657-700.

Berget, S.M., Moore, C., Sharp, P.A., 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 3171-3175.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Bhatia, V., Bhattacharya, R., Uniyal, P.L., Singh, R., Niranjana, R.S., 2012. Host generated siRNAs attenuate expression of serine protease gene in *Myzus persicae*. *PLoS One* 7, e46343.

Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L., Drake, J.M., Brownstein, J.S., Hoen, A.G., Sankoh, O., Myers, M.F., George, D.B., Jaenisch, T., Wint, G.R., Simmons, C.P., Scott, T.W., Farrar, J.J., Hay, S.I., 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504-507.

Bhella, D., 2015. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370, 20140035.

Bilgi, V., Fosu-Nyarko, J., Jones, M.G., 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.

Blair, C.D., Adelman, Z.N., Olson, K.E., 2000. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin Microbiol Rev* 13, 651-661.

Blanc, S., Cerutti, M., Usmany, M., Vlak, J.M., Hull, R., 1993. Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor expressed in a heterologous system. *Virology* 192, 643-650.

Blanc, S., Drucker, M., Uzest, M., 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev Phytopathol* 52, 403-425.

Blanc, S., Gutierrez, S., 2015. The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Curr Opin Virol* 15, 27-33.

Boccardo, G., Milne, R., 1984. Plant reovirus group, in: Harrison, B.D., Murant, A.F. (Eds.), CMI/AAB

descriptions of plant viruses Commonwealth Microbiology Institute and Association of Applied Biology, Kew, United Kingdom.

Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., Ziegler-Graff, V., 2007. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 17, 1615-1621.

Bosque-Perez, N.A., Eigenbrode, S.D., 2011. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res.* 5, 159-201.

Bouvaine, S., Boonham, N., 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.

Boyne, J.R., Colgan, K.J., Whitehouse, A., 2008. Recruitment of the complete hTREX complex is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus intronless mRNA nuclear export and virus replication. *PLoS Pathog* 4, e1000194.

Bradley, R.H.E., 1964. Aphid transmission of stylet-borne viruses, in: Corbett, M.K., Sisler, H.D. (Eds.), *Plant Virology*. University of Florida Press Gainesville, Florida, pp. 148-174.

Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J.J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., Torrance, L., 2013. Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annual Review of Phytopathology* 51, 177-201.

Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K.E., Ziegler-Graff, V., 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J Virol* 77, 3247-3256.

Brault, V., Herrbach, E., Reinbold, C., 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38, 302-312.

Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Richards, K., Ziegler-Graff, V., 2000. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J Virol* 74, 1140-1148.

Brault, V., Perigon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K., Ziegler-Graff, V., 2005. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* 79, 9685-9693.

Brault, V., Tanguy, S., Reinbold, C., Le Trionnaire, G., Arneodo, J., Jaubert-Possamai, S., Guernec, G., Tagu, D., 2010a. Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Gen Virol* 91, 802-808.

Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., Blanc, S., 2010b. Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333, 524-538.

Brault, V., van den Heuvel, J.F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *Embo J* 14, 650-659.

Bressan, A., Watanabe, S., 2011. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Res* 155, 520-525.

Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G., 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85-94.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.X., Ji, L.H., Ding, S.W., Baulcombe, D.C., 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17, 6739-6746.

Brown, J.K., 2010. Bemisia: Phylogenetic biology of the Bemisia tabaci sibling species group., in: Stansly P. A., N.S.E. (Ed.), *Bemisia: Bionomics and management of a global pest* Springer, Amsterdam, pp. 31-67.

Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olive, E., Briddon, R.W., Hernandez-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A., 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch*

Viol 160, 1593-1619.

Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M.T., Van den Heuvel, J.F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G., Herrbach, E., 1997. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 230, 323-334.

Bucher, G., Scholten, J., Klingler, M., 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* 12, R85-86.

Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M., Benson, E.C., Gildow, F.E., Gray, S.M., 2006. Genetic Regulation of Polerovirus and Luteovirus Transmission in the Aphid *Schizaphis graminum*. *Phytopathology* 96, 828-837.

Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M., Gray, S.M., 2007. Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* (Edinb) 98, 106-113.

Caciagli, P., Piles, V.M., Marian, D., Vecchiati, M., Masenga, V., Mason, G., 2009. Virion stability is important for the circulative transmission of tomato yellow leaf curl sardinia virus by *Bemisia tabaci*, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. *Journal of Virology* 83, 5784-5795.

Calisher, C.H., Karabatsos, N., 1988. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution, in: Monath, T.P. (Ed.), *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 19-57.

Calvo, C.F., Fontaine, R.H., Soueid, J., Tammela, T., Makinen, T., Alfaro-Cervello, C., Bonnaud, F., Miguez, A., Benhaim, L., Xu, Y., Barallobre, M.J., Moutkine, I., Lyytikka, J., Tatlisumak, T., Pytowski, B., Zalc, B., Richardson, W., Kessaris, N., Garcia-Verdugo, J.M., Alitalo, K., Eichmann, A., Thomas, J.L., 2011. Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis. *Genes Dev* 25, 831-844.

Canapa, A., Barucca, M., Biscotti, M.A., Forconi, M., Olmo, E., 2015. Transposons, Genome Size, and Evolutionary Insights in Animals. *Cytogenet Genome Res* 147, 217-239.

Cao-Lormeau, V.M., 2009. Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Viol J* 6, 35.

Carn, V.M., 1996. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. *Br Vet J* 152, 377-393.

Carrington, J.C., Cary, S.M., Parks, T.D., Dougherty, W.G., 1989a. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* 8, 365-370.

Carrington, J.C., Freed, D.D., Sanders, T.C., 1989b. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J Virol* 63, 4459-4463.

Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642-655.

Castel, S.E., Martienssen, R.A., 2013. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet* 14, 100-112.

Chakraborty, S., Veettil, M.V., Bottero, V., Chandran, B., 2012. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with EphrinA2 receptor to amplify signaling essential for productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1163-1172.

Chapman, R.F., 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 48, 455-484.

Chavez, J.D., Cilia, M., Weisbrod, C.R., Ju, H.J., Eng, J.K., Gray, S.M., Bruce, J.E., 2012. Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. *J Proteome Res* 11, 2968-2981.

Chay, C.A., Gunasinge, U.B., Dinesh-Kumar, S.P., Miller, W.A., Gray, S.M., 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* 219, 57-65.

Chen, A.Y., Walker, G.P., Carter, D., Ng, J.C., 2011a. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16777-16782.

- Chen, H., Chen, Q., Omura, T., Uehara-Ichiki, T., Wei, T., 2011b. Sequential infection of Rice dwarf virus in the internal organs of its insect vector after ingestion of virus. *Virus Res* 160, 389-394.
- Chen, N., Fan, Y.L., Bai, Y., Li, X.D., Zhang, Z.F., Liu, T.X., 2016. Cytochrome P450 gene, CYP4G51, modulates hydrocarbon production in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem Mol Biol* 76, 84-94.
- Chen, Q., Wang, H., Ren, T., Xie, L., Wei, T., 2015. Interaction between non-structural protein Pns10 of rice dwarf virus and cytoplasmic actin of leafhoppers is correlated with insect vector specificity. *J Gen Virol* 96, 933-938.
- Chen, S., Lewallen, M., Xie, T., 2013. Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development* 140, 255-265.
- Cherqui, A., Tjallingii, W.F., 2000. Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J Insect Physiol* 46, 1177-1186.
- Chihota, C.M., Rennie, L.F., Kitching, R.P., Mellor, P.S., 2001. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol Infect* 126, 317-321.
- Chihota, C.M., Rennie, L.F., Kitching, R.P., Mellor, P.S., 2003. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med Vet Entomol* 17, 294-300.
- Chin, J.F., Chu, J.J., Ng, M.L., 2007. The envelope glycoprotein domain III of dengue virus serotypes 1 and 2 inhibit virus entry. *Microbes Infect* 9, 1-6.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., Kim, J.S., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 31, 230-232.
- Chougule, N.P., Li, H., Liu, S., Linz, L.B., Narva, K.E., Meade, T., Bonning, B.C., 2013. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 8465-8470.
- 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.
- Chu, P.W., Helms, K., 1988. Novel virus-like particles containing circular single-stranded DNAs associated with subterranean clover stunt disease. *Virology* 167, 38-49.
- Cicero, J.M., Brown, J.K., 2011a. Anatomy of accessory salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and correlations to begomovirus transmission. *Annals of the Entomological Society of America* Volume 104, 280-286.
- Cicero, J.M., Brown, J.K., 2011b. Functional anatomy of whitefly organs associated with Squash leaf curl virus (Geminiviridae: Begomovirus) transmission by the B biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 104, 261-279.
- Cilia, M., Peter, K.A., Bereman, M.S., Howe, K., Fish, T., Smith, D., Gildow, F., MacCoss, M.J., Thannhauser, T.W., Gray, S.M., 2012. Discovery and targeted LC-MS/MS of purified polerovirus reveals differences in the virus-host interactome associated with altered aphid transmission. *PLoS One* 7, e48177.
- Cilia, M., Tamborindeguy, C., Fish, T., Howe, K., Thannhauser, T.W., 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.
- Claverie, J.M., Ogata, H., Audic, S., Abergel, C., Suhre, K., Fournier, P.E., 2006. Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus. *Virus Res* 117, 133-144.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A., Dixon, J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6499-6503.
- Coleman, A.D., Wouters, R.H., Mugford, S.T., Hogenhout, S.A., 2015. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *J Exp Bot* 66, 541-548.
- Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., Alvarez-Buylla, A., 2000. Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone.

Nat Neurosci 3, 1091-1097.

Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T., Lisanti, M.P., 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem* 272, 6525-6533.

Crill, W.D., Roehrig, J.T., 2001. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol* 75, 7769-7773.

Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceicao, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A., Da Poian, A.T., 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev* 39, 155-170.

Czosnek, H., 2007. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease, Management, Molecular Biology, Breeding For Resistance. Springer, Dordrecht, Netherlands. .

Czosnek, H., Ghanim, M., Morin, S., Rubinstein, G., Fridman, V., Zeidan, M., 2001. Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. *Adv Virus Res* 57, 291-322.

D. Bartley, T., W. Hunt, R., Welcher, A., J. Boyle, W., P. Parker, V., Lindberg, R., lu, H., M. Colombero, A., Elliott, R., A. Guthrie, B., 1994. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature* 368, 558-560.

Da Poian, A.T., Carneiro, F.A., Stauffer, F., 2005. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz J Med Biol Res* 38, 813-823.

Das, S., Debnath, N., Cui, Y., Unrine, J., Palli, S.R., 2015. Chitosan, Carbon Quantum Dot, and Silica Nanoparticle Mediated dsRNA Delivery for Gene Silencing in *Aedes aegypti*: A Comparative Analysis. *ACS Appl Mater Interfaces* 7, 19530-19535.

Dass, C.R., Choong, P.F., 2008. The use of chitosan formulations in cancer therapy. *J Microencapsul* 25, 275-279.

Day, M.F., Fenner, F., Woodroffe, G.M., McIntyre, G.A., 1956. Further studies on the mechanism of mosquito transmission of myxomatosis in the European rabbit. *J Hyg (Lond)* 54, 258-283.

de Castro, I.F., Volonte, L., Risco, C., 2013. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell Microbiol* 15, 24-34.

de Zoeten, G.A., Skaf, J.S., 2001. Pea enation mosaic and the vagaries of a plant virus. *Adv Virus Res* 57, 323-350.

Deng, F., Zhao, Z., 2014. Influence of catalase gene silencing on the survivability of *Sitobion avenae*. *Arch Insect Biochem Physiol* 86, 46-57.

Derrien, B., Baumberger, N., Schepetilnikov, M., Viotti, C., De Cillia, J., Ziegler-Graff, V., Isono, E., Schumacher, K., Genschik, P., 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 15942-15946.

Diaz-Pendon, J.A., Canizares, M.C., Moriones, E., Bejarano, E.R., Czosnek, H., Navas-Castillo, J., 2010. Tomato yellow leaf curl viruses: menage a trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol Plant Pathol* 11, 441-450.

Dinesh-Kumar, S.P., Brault, V., Miller, W.A., 1992. Precise mapping and in vitro translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. *Virology* 187, 711-722.

Ding, B.Y., Shang, F., Zhang, Q., Xiong, Y., Yang, Q., Niu, J.Z., Smagghe, G., Wang, J.J., 2017. Silencing of Two Insulin Receptor Genes Disrupts Nymph-Adult Transition of Alate Brown Citrus Aphid. *Int J Mol Sci* 18.

Dolja, V.V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A., Koonin, E.V., 1991. Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* 184, 79-86.

Dougherty, W.G., Allison, R.F., Dawn Parks, T., Johnston, R.E., Feild, M.J., Armstrong, F.B., 1985. Nucleotide sequence at the 3' terminus of pepper mottle virus genomic RNA: evidence for an alternative mode of potyvirus capsid protein gene organization. *Virology* 146, 282-291.

- Dowling, D., Pauli, T., Donath, A., Meusemann, K., Podsiadlowski, L., Petersen, M., Peters, R.S., Mayer, C., Liu, S., Zhou, X., Misof, B., Niehuis, O., 2016. Phylogenetic Origin and Diversification of RNAi Pathway Genes in Insects. *Genome Biol Evol* 8, 3784-3793.
- Dutta, D., Chakraborty, S., Bandyopadhyay, C., Valiya Veetil, M., Ansari, M.A., Singh, V.V., Chandran, B., 2013. EphrinA2 regulates clathrin mediated KSHV endocytosis in fibroblast cells by coordinating integrin-associated signaling and c-Cbl directed polyubiquitination. *PLoS Pathog* 9, e1003510.
- Easty, D.J., Guthrie, B.A., Maung, K., Farr, C.J., Lindberg, R.A., Toso, R.J., Herlyn, M., Bennett, D.C., 1995. Protein B61 as a new growth factor: expression of B61 and up-regulation of its receptor epithelial cell kinase during melanoma progression. *Cancer research* 55, 2528-2532.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.
- Elzinga, D.A., De Vos, M., Jander, G., 2014. Suppression of plant defenses by a *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary effector protein. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 747-756.
- Espinoza, A.M., Medina, V., Hull, R., Markham, P.G., 1991. Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology* 185, 337-344.
- Fan, J., Zhang, Y., Francis, F., Cheng, D., Sun, J., Chen, J., 2015. Orco mediates olfactory behaviors and winged morph differentiation induced by alarm pheromone in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 64, 16-24.
- Feinberg, E.H., Hunter, C.P., 2003. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* 301, 1545-1547.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., Zhu, J.K., 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res* 23, 1229-1232.
- Filichkin, S.A., Brumfield, S., Filichkin, T.P., Young, M.J., 1997. In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J Virol* 71, 569-577.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Frank, P.G., Pavlides, S., Lisanti, M.P., 2009. Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 335, 41-47.
- Franz, A.W., van der Wilk, F., Verbeek, M., Dulleman, A.M., van den Heuvel, J.F., 1999. Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* 262, 210-219.
- Freire, J.M., Veiga, A.S., de la Torre, B.G., Santos, N.C., Andreu, D., Da Poian, A.T., Castanho, M.A., 2013. Peptides as models for the structure and function of viral capsid proteins: Insights on dengue virus capsid. *Biopolymers* 100, 325-336.
- Frohlich, D.R., Torres-Jerez, I.I., Bedford, I.D., Markham, P.G., Brown, J.K., 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 8, 1683-1691.
- Froissart, R., Michalakakis, Y., Blanc, S., 2002. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology* 92, 576-579.
- Fu, Z.F., 2005. Genetic comparison of the rhabdoviruses from animals and plants. *Curr Top Microbiol Immunol* 292, 1-24.
- Gardner, R.C., Howarth, A.J., Hahn, P., Brown-Luedi, M., Shepherd, R.J., Messing, J., 1981. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acids Res* 9, 2871-2888.
- Garret, A., Kerlan, C., Thomas, D., 1993. The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch. Virol.* 131, 377-392.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R.W., Knossow, M., Flamand, A., 1993. Low-pH conformational changes of rabies virus

glycoprotein and their role in membrane fusion. *J Virol* 67, 1365-1372.

Gaudin, Y., Tuffereau, C., Durrer, P., Brunner, J., Flamand, A., Ruigrok, R., 1999. Rabies virus-induced membrane fusion. *Mol Membr Biol* 16, 21-31.

Gelinas, R.E., Roberts, R.J., 1977. One predominant 5'-undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs. *Cell* 11, 533-544.

Ghanim, M., 2014. A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of Tomato yellow leaf curl virus (Geminiviridae; Begomovirus) by its whitefly vector. *Virus Res* 186, 47-54.

Gildow, F., 1999. Luteovirus transmission mechanisms regulating vector specificity, in: Smith, H.G., Barker, H. (Eds.), *The Luteoviridae*. CAB International, Oxon, UK, pp. 88-111.

Gildow, F.E., 1991. Barley yellow dwarf virus transport through aphids, in: Peters, D.C., Webster, J.A., Chlouber, C.S. (Ed.), *Proceedings of the Symposium Aphid-Plant Interactions: Populations to Molecules*, Stillwater, Oklahoma, USA, pp. 165-177.

Gildow, F.E., 1993. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* 83, 270-277.

Gildow, F.E., Gray, S.M., 1993. The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* 83, 1293-1302.

Godin, C.C., Boivin, G., 2002. Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères. AAC-CRDH / PRISME, Quebec, Canada.

Goldberg, J.S., Hirschi, K.K., 2009. Diverse roles of the vasculature within the neural stem cell niche. *Regen Med* 4, 879-897.

Gong, Y.H., Yu, X.R., Shang, Q.L., Shi, X.Y., Gao, X.W., 2014. Oral delivery mediated RNA interference of a carboxylesterase gene results in reduced resistance to organophosphorus insecticides in the cotton Aphid, *Aphis gossypii* Glover. *PLoS One* 9, e102823.

Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D.V., Lewsey, M.G., Atencio, F.A., Llave, C., Kalinina, N.O., Carr, J.P., Palukaitis, P., Canto, T., 2010. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* 23, 294-303.

Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljic, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek, H., Vavre, F., Fleury, F., Ghanim, M., 2010. The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *J Virol* 84, 9310-9317.

Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H., Robaglia, C., 1993. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J Gen Virol* 74 (Pt 12), 2737-2742.

Gray, S., Cilia, M., Ghanim, M., 2014. Circulative, "nonpropagative" virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv Virus Res* 89, 141-199.

Gray, S., Gildow, F.E., 2003. Luteovirus-aphid interactions. *Annu Rev Phytopathol* 41, 539-566.

Gu, J., Liu, M., Deng, Y., Peng, H., Chen, X., 2011. Development of an efficient recombinant mosquito densovirus-mediated RNA interference system and its preliminary application in mosquito control. *PLoS One* 6, e21329.

Guo, H., Song, X., Wang, G., Yang, K., Wang, Y., Niu, L., Chen, X., Fang, R., 2014a. Plant-generated artificial small RNAs mediated aphid resistance. *PLoS One* 9, e97410.

Guo, K., Wang, W., Luo, L., Chen, J., Guo, Y., Cui, F., 2014b. Characterization of an aphid-specific, cysteine-rich protein enriched in salivary glands. *Biophys Chem* 189, 25-32.

Guo, S.S., Zhang, M., Liu, T.X., 2016. Insulin-Related Peptide 5 is Involved in Regulating Embryo Development and Biochemical Composition in Pea Aphid with Wing Polyphenism. *Front Physiol* 7, 31.

- Gusmao, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Russo Ede, S., Peixoto, A.M., Bacci Junior, M., Berbert-Molina, M.A., Lemos, F.J., 2007. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 919-924.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons, C., Yoksan, S., Peeling, R.W., 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 8, S7-16.
- Hahn, A.S., Desrosiers, R.C., 2013. Rhesus monkey rhadinovirus uses eph family receptors for entry into B cells and endothelial cells but not fibroblasts. *PLoS Pathog* 9, e1003360.
- Hahn, A.S., Kaufmann, J.K., Wies, E., Naschberger, E., Panteleev-Ivlev, J., Schmidt, K., Holzer, A., Schmidt, M., Chen, J., Konig, S., Ensser, A., Myoung, J., Brockmeyer, N.H., Sturzl, M., Fleckenstein, B., Neipel, F., 2012. The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* 18, 961-966.
- Haley, B., Hendrix, D., Trang, V., Levine, M., 2008. A simplified miRNA-based gene silencing method for *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 321, 482-490.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
- Hammond, S.M., 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579, 5822-5829.
- Harding, R.M., Burns, T.M., Dale, J.L., 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J Gen Virol* 72 (Pt 2), 225-230.
- Hardy, J.L., Houk, E.J., Kramer, L.D., Reeves, W.C., 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol* 28, 229-262.
- Harmel, N., Letocart, E., Cherqui, A., Giordanengo, P., Mazzucchelli, G., Guillonnet, F., De Pauw, E., Haubruge, E., Francis, F., 2008. Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol Biol* 17, 165-174.
- Harrewijn, P., 1983. The effect of cultural measures on behaviour and population development of potato aphids and transmission of viruses. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* 48, 791-798.
- Harris, H.J., Davis, C., Mullins, J.G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M.J., Mee, C.J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P., McKeating, J.A., 2010. Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 285, 21092-21102.
- Hayes, R.J., Buck, K.W., 1990. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase. *Cell* 63, 363-368.
- Herrbach, E., Sauvion, N., Boudon-Padieu, E., Lett, J.M., Reynaud, B., Sforza, R., 2013. Une relation trophique originale : la vécation entomophile d'agents pathogènes, in: Sauvion, N., Calatayud, P.A., Thiéry, D., Marion-Poll, F. (Eds.), *Interactions insectes-plantes*. Quae, Marseille, France, pp. 511-550.
- Hidari, K.I., Suzuki, T., 2011. Dengue virus receptor. *Trop Med Health* 39, 37-43.
- Hill, S.A., Lane, A., Hardwick, N.V., 1989. The incidence and importance of beet western yellows virus in oilseed rape. *Aspects of Applied Biology*, 311-318.
- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Revers, F., 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* 4, 154.
- Hipper, C., Monsion, B., Bortolamiol-Becet, D., Ziegler-Graff, V., Brault, V., 2014. Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *J Gen Virol* 95, 496-505.
- Hiriart, E., Farjot, G., Gruffat, H., Nguyen, M.V., Sergeant, A., Manet, E., 2003. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J Biol Chem* 278, 335-342.
- Hoch, A.L., Gargan, T.P., 2nd, Bailey, C.L., 1985. Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by

hematophagous Diptera. *Am J Trop Med Hyg* 34, 188-193.

Hofer, P., Bedford, I.D., Markham, P.G., Jeske, H., Frischmuth, T., 1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology* 236, 288-295.

Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., Sonnewald, U., 2001. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J* 28, 529-543.

Hogenhout, S.A., Ammar el, D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46, 327-359.

Hogenhout, S.A., Bos, J.I., 2011. Effector proteins that modulate plant--insect interactions. *Curr Opin Plant Biol* 14, 422-428.

Hohnle, M., Hofer, P., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., Frischmuth, T., 2001. Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology* 290, 164-171.

Horn, T., Boutros, M., 2010. E-RNAi: a web application for the multi-species design of RNAi reagents--2010 update. *Nucleic Acids Res* 38, W332-339.

Howard, K.A., Rahbek, U.L., Liu, X., Damgaard, C.K., Glud, S.Z., Andersen, M.O., Hovgaard, M.B., Schmitz, A., Nyengaard, J.R., Besenbacher, F., Kjems, J., 2006. RNA interference in vitro and in vivo using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Mol Ther* 14, 476-484.

Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H., 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 (Pt 6), 1407-1414.

Hull, R., 2013. *Plant Virology*, Fifth edition ed. Academic press.

Hung, J.J., Hsieh, M.T., Young, M.J., Kao, C.L., King, C.C., Chang, W., 2004. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol* 78, 378-388.

Hutter, G., Bodor, J., Ledger, S., Boyd, M., Millington, M., Tsie, M., Symonds, G., 2015. CCR5 Targeted Cell Therapy for HIV and Prevention of Viral Escape. *Viruses* 7, 4186-4203.

Huvenne, H., Smagghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol* 56, 227-235.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., Kageyama, R., 2010. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30, 3489-3498.

Ingwell, L.L., Eigenbrode, S.D., Bosque-Perez, N.A., 2012. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci. Rep.* 2, 578.

Jaag, H.M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N., Prufer, D., 2003. An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8939-8944.

Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Fang, R.X., Goodin, M.M., Hogenhout, S.A., 2008. Plant Rhabdoviruses, in: Walker, P.J. (Ed.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd. ed. Elsevier, Oxford, UK.

Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N., Deng, M., 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 623-660.

Janes, P.W., Saha, N., Barton, W.A., Kolev, M.V., Wimmer-Kleikamp, S.H., Nievergall, E., Blobel, C.P., Himanen, J.P., Lackmann, M., Nikolov, D.B., 2005. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 123, 291-304.

Janes, P.W., Wimmer-Kleikamp, S.H., Frangakis, A.S., Treble, K., Griesshaber, B., Sabet, O., Grabenbauer, M., Ting, A.Y., Saftig, P., Bastiaens, P.I., Lackmann, M., 2009. Cytoplasmic relaxation of active Eph controls ephrin shedding by ADAM10. *PLoS Biol* 7, e1000215.

- 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.
- Jay, C.N., Rossall, S., Smith, H.G., 1999. Effects of beet western yellows virus on growth and yield of oilseed rape (*Brassica napus*). *The Journal of Agricultural Science* 133, 131-139.
- Johnson, A.J., Guirakhoo, F., Roehrig, J.T., 1994. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. *Virology* 203, 241-249.
- Jupin, I., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204, 82-90.
- Kanchiswamy, C.N., Maffei, M., Malnoy, M., Velasco, R., Kim, J.S., 2016. Fine-Tuning Next-Generation Genome Editing Tools. *Trends Biotechnol* 34, 562-574.
- Kania, A., Klein, R., 2016. Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 240-256.
- Kaplan, I.B., Lee, L., Ripoll, D.R., Palukaitis, P., Gildow, F., Gray, S.M., 2007. Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *J Gen Virol* 88, 1821-1830.
- Kaplan, I.B., Zhang, L., Palukaitis, P., 1998. Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions. *Virology* 246, 221-231.
- Karabatsos, N., 1985. International catalogue of arboviruses, in: Hyg, A.S.T.M. (Ed.). Am. Soc. Trop. Med. Hyg, San Antonio, US.
- Kasschau, K.D., Carrington, J.C., 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95, 461-470.
- Kato, N., Dasgupta, R., Smartt, C.T., Christensen, B.M., 2002. Glucosamine:fructose-6-phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 11, 207-216.
- Katul, U., Vetten, H.J., Maiss, E., Makkouk, K.M., Lesemann, D.E., Casper, R., 1993. Characterisation and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Ann Appl Biol* 123, 629-647.
- Kaufman, W.R., Nuttall, P.A., 1996. *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae): mechanism and control of arbovirus secretion in tick saliva. *Exp Parasitol* 82, 316-323.
- Kaufmann, S.H.E., Dorhoi, A., Hotchkiss, R.S., Bartenschlager, R., 2017. Host-directed therapies for bacterial and viral infections. *Nat Rev Drug Discov*.
- Khelifa, M., Journou, S., Krishnan, K., Gargani, D., Esperandieu, P., Blanc, S., Drucker, M., 2007. Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol* 88, 2872-2880.
- Kheyr-Pour, A., Bananej, K., Dafalla, G.A., Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H., Gronenborn, B., 2000. Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence Comparisons and Identification of a Whitefly-Transmission Determinant. *Phytopathology* 90, 629-635.
- Kil, E.J., Kim, S., Lee, Y.J., Byun, H.S., Park, J., Seo, H., Kim, C.S., Shim, J.K., Lee, J.H., Kim, J.K., Lee, K.Y., Choi, H.S., Lee, S., 2016. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed-transmissible geminivirus in tomatoes. *Sci Rep* 6, 19013.
- Kilpatrick, A.M., Randolph, S.E., 2012. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet* 380, 1946-1955.
- Krenn, H.W., Aspöck, H., 2012. Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Struct Dev* 41, 101-118.
- Krishnan, M.N., Sukumaran, B., Pal, U., Agaisse, H., Murray, J.L., Hodge, T.W., Fikrig, E., 2007. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *J Virol* 81, 4881-4885.

- Kritzman, A., Gera, A., Raccach, B., van Lent, J.W., Peters, D., 2002. The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Arch Virol* 147, 2143-2156.
- Kuadkitkan, A., Wikan, N., Fongsaran, C., Smith, D.R., 2010. Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells. *Virology* 406, 149-161.
- Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S., Strauss, J.H., 2002. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108, 717-725.
- Kumar, B., Chandran, B., 2016. KSHV Entry and Trafficking in Target Cells-Hijacking of Cell Signal Pathways, Actin and Membrane Dynamics. *Viruses* 8.
- Kuno, G., 2004. A survey of the relationships among the viruses not considered arboviruses, vertebrates, and arthropods. *Acta Virol* 48, 135-143.
- Kuno, G., Chang, G.J., 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin Microbiol Rev* 18, 608-637.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455, 100-104.
- Lajoie, P., Nabi, I.R., 2010. Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *Int Rev Cell Mol Biol* 282, 135-163.
- Lajoie, P., Partridge, E.A., Guay, G., Goetz, J.G., Pawling, J., Lagana, A., Joshi, B., Dennis, J.W., Nabi, I.R., 2007. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. *J Cell Biol* 179, 341-356.
- Lander, E.S., 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell* 164, 18-28.
- Lastra, J.R., Esparza, J., 1976. Multiplication of vesicular stomatitis virus in the leafhopper *Peregrinus maidis* (Ashm.), a vector of a plant rhabdovirus. *J Gen Virol* 32, 139-142.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1295-1309.
- Lazarowitz, S.G., Shepherd, R.J., 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 11, 327-349.
- Leclerc, D., Burri, L., Kajava, A.V., Mougeot, J.L., Hess, D., Lustig, A., Kleemann, G., 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.
- Lee, L., Kaplan, I.B., Ripoll, D.R., Liang, D., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2005. A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission. *J Virol* 79, 1207-1214.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M., Blanc, S., 1999. Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO J* 18, 7077-7085.
- Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., 1992. Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9136-9140.
- Leydesdorff, L., Rafols, I., 2011. Local emergence and global diffusion of research technologies: An exploration of patterns of network formation. *Journal of the American Society for Information Science and Technology* 62, 846-860.
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S.M., Gildow, F., 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.

- Li, X., Ryan, M.D., Lamb, J.W., 2000. Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *Journal of General Virology* 81, 1857-1864.
- Li-Byarlay, H., Li, Y., Stroud, H., Feng, S., Newman, T.C., Kaneda, M., Hou, K.K., Worley, K.C., Elisk, C.G., Wickline, S.A., Jacobsen, S.E., Ma, J., Robinson, G.E., 2013. RNA interference knockdown of DNA methyltransferase 3 affects gene alternative splicing in the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12750-12755.
- Liang, Y., 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.
- Lin, S.L., Chang, S.J., Ying, S.Y., 2013. Transgene-like animal models using intronic microRNAs. *Methods Mol Biol* 936, 279-294.
- Linz, L.B., Liu, S., Chougule, N.P., Bonning, B.C., 2015. In Vitro Evidence Supports Membrane Alanine Aminopeptidase N as a Receptor for a Plant Virus in the Pea Aphid Vector. *J Virol* 89, 11203-11212.
- Liu, S., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G., 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology* 78, 1791-1794.
- Liu, S., Briddon, R.W., Bedford, I.D., Pinner, M.S., Markham, P.G., 1999. Identification of genes directly and indirectly involved in the insect transmission of African cassava mosaic geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Virus Genes* 18, 5-11.
- Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C., Perry, K.L., 2002. A conserved capsid protein surface domain of Cucumber mosaic virus is essential for efficient aphid vector transmission. *J Virol* 76, 9756-9762.
- Liu, S., Sivakumar, S., Sparks, W.O., Miller, W.A., 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.
- 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.
- Liu, Y., Jia, D., Chen, H., Chen, Q., Xie, L., Wu, Z., Wei, T., 2011. The P7-1 protein of southern rice black-streaked dwarf virus, a fivirus, induces the formation of tubular structures in insect cells. *Arch Virol* 156, 1729-1736.
- Llida, T., Shinkai, A., Kimura, I., 1972. Rice dwarf virus., in: CMI/AAB (Ed.), descriptions of plant viruses no. 102. . Commonwealth Microbiology Institute and Association of Applied Biology, Kew, United Kingdom.
- Loy, J.D., Mogler, M.A., Loy, D.S., Janke, B., Kamrud, K., Scura, E.D., Harris, D.L., Bartholomay, L.C., 2012. dsRNA provides sequence-dependent protection against infectious myonecrosis virus in *Litopenaeus vannamei*. *J Gen Virol* 93, 880-888.
- Lu, Q., Sun, E.E., Klein, R.S., Flanagan, J.G., 2001. Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. *Cell* 105, 69-79.
- Lubinga, J.C., Clift, S.J., Tuppurainen, E.S., Stoltz, W.H., Babiuk, S., Coetzer, J.A., Venter, E.H., 2014. Demonstration of lumpy skin disease virus infection in *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using immunohistochemistry. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 113-120.
- Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S., Mahlare, R., Coetzer, J.A., Stoltz, W.H., Venter, E.H., 2015. Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transbound Emerg Dis* 62, 174-182.
- Luo, M., Green, T.J., Zhang, X., Tsao, J., Qiu, S., 2007. Structural comparisons of the nucleoprotein from three negative strand RNA virus families. *Virol J* 4, 72.
- Lupberger, J., Zeisel, M.B., Xiao, F., Thumann, C., Fofana, I., Zona, L., Davis, C., Mee, C.J., Turek, M., Gorke, S., Royer, C., Fischer, B., Zahid, M.N., Lavillette, D., Fresquet, J., Cosset, F.L., Rothenberg, S.M., Pietschmann, T., Patel, A.H., Pessaux, P., Doffoel, M., Raffelsberger, W., Poch, O., McKeating, J.A., Brino, L., Baumert, T.F., 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral

therapy. *Nat Med* 17, 589-595.

Ma, K., Li, F., Liang, P., Chen, X., Liu, Y., Tang, Q., Gao, X., 2017. RNA interference of Dicer-1 and Argonaute-1 increasing the sensitivity of *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) to plant allelochemical. *Pestic Biochem Physiol* 138, 71-75.

Maniak, M., 2001. Endocytosis, in: Oxford University Press (Ed.), Endocytosis. Marsh, M., Oxford, UK.

Mann, F., Miranda, E., Weinl, C., Harmer, E., Holt, C.E., 2003. B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. *J Neurobiol* 57, 323-336.

Mao, J., Zeng, F., 2012. Feeding-based RNA interference of a gap gene is lethal to the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS One* 7, e48718.

Mao, J., Zeng, F., 2014. Plant-mediated RNAi of a gap gene-enhanced tobacco tolerance against the *Myzus persicae*. *Transgenic Res* 23, 145-152.

Mao, Q., Liao, Z., Li, J., Liu, Y., Wu, W., Chen, H., Chen, Q., Jia, D., Wei, T., 2017. Filamentous Structures Induced by a Phytoreovirus Mediate Viral Release from Salivary Glands in Its Insect Vector. *J Virol* 91.

Marston, D.J., Dickinson, S., Nobes, C.D., 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol* 5, 879-888.

Martin, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F., 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 (Pt 10), 2701-2705.

Martiniere, A., Bak, A., Macia, J.L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E., Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., Drucker, M., 2013. A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *Elife* 2, e00183.

Mathers, T.C., Chen, Y., Kaithakottil, G., Legeai, F., Mugford, S.T., Baa-Puyoulet, P., Bretaudeau, A., Clavijo, B., Colella, S., Collin, O., Dalmay, T., Derrien, T., Feng, H., Gabaldon, T., Jordan, A., Julca, I., Kettles, G.J., Kowitzanich, K., Lavenier, D., Lenzi, P., Lopez-Gomollon, S., Loska, D., Mapleson, D., Maumus, F., Moxon, S., Price, D.R., Sugio, A., van Munster, M., Uzest, M., Waite, D., Jander, G., Tagu, D., Wilson, A.C., van Oosterhout, C., Swarbreck, D., Hogenhout, S.A., 2017. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biol* 18, 27.

Mattick, J.S., 2009. The Genetic Signatures of Noncoding RNAs. *PLOS Genetics* 5, e1000459.

Mayo, M.A., Miller, W.A., 1999. The structure and expression of Luteovirus genomes. CABI Publishing, Wallingford.

Mayo, M.A., Ziegler-Graff, V., 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Adv Virus Res* 46, 413-460.

McEwan, D.L., Weisman, A.S., Hunter, C.P., 2012. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Mol Cell* 47, 746-754.

Medina-Ortega, K.J., Bosque-Perez, N.A., Ngumbi, E., Jimenez-Martinez, E.S., Eigenbrode, S.D., 2009. *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from Barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Environ Entomol* 38, 836-845.

Mehta, P., Wyman, J.A., K., N.M., P., M.D., 1994. Transmission of tomato yellow leaf curl geminivirus by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 87, 1291-1297.

Mercado-Curiel, R.F., Black, W.C.t., Munoz Mde, L., 2008. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol* 8, 118.

Mercado-Curiel, R.F., Esquinca-Aviles, H.A., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., Munoz Mde, L., 2006. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol* 6, 85.

Mercer, J., Schelhaas, M., Helenius, A., 2010. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem* 79, 803-833.

Miller, W.A., Dineshkumar, S.P., Paul, C.P., 1995. Luteovirus gene expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14, 179-211.

- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S., 2005. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *Journal of virology* 79, 1223-1231.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., 2003. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6986-6991.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S.C., 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313-319.
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., van der Oost, J., 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 353, aad5147.
- Moreno, A., Hebrard, E., Uzest, 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.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 256, 75-84.
- Moritz, G., Kumm, S., Mound, L., 2004. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Res* 100, 143-149.
- Mosso, C., Galvan-Mendoza, I.J., Ludert, J.E., del Angel, R.M., 2008. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* 378, 193-199.
- Mou, X., Yuan, G.R., Jiang, H.B., Liu, Z., Wang, J.J., 2017. Functional characterization of two acetylcholinesterase genes in the brown citrus aphid, *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy), using heterologous expression and RNA interference. *Pestic Biochem Physiol* 138, 76-83.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2005. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 3, 13-22.
- Munoz Mde, L., Limon-Camacho, G., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Mendoza-Hernandez, G., Black, W.C.t., 2013. Proteomic identification of dengue virus binding proteins in *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes albopictus* cells. *Biomed Res Int* 2013, 875958.
- Munoz, M.L., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R., Ortega, A., 1998. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett* 168, 251-258.
- Murphy, F.A., Fauquet, C.A., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., 1995. Virus taxonomy, 6th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Arch Virol Suppl. Springer-Verlag, Vienna, Austria, pp. 1-586.
- Muto, A., Yi, T., Harrison, K.D., Davalos, A., Fancher, T.T., Ziegler, K.R., Feigel, A., Kondo, Y., Nishibe, T., Sessa, W.C., Dardik, A., 2011. Eph-B4 prevents venous adaptive remodeling in the adult arterial environment. *J Exp Med* 208, 561-575.
- Mutti, N.S., Louis, J., Pappan, L.K., Pappan, K., Begum, K., Chen, M.S., Park, Y., Dittmer, N., Marshall, J., Reese, J.C., 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.
- Mutti, N.S., Park, Y., Reese, J.C., 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.
- Mysore, K., Flannery, E.M., Tomchaney, M., Severson, D.W., Duman-Scheel, M., 2013. Disruption of *Aedes aegypti* olfactory system development through chitosan/siRNA nanoparticle targeting of semaphorin-1a. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2215.
- Naessens, E., Dubreuil, G., Giordanengo, P., Baron, O.L., Minet-Kebdani, N., Keller, H., Coustau, C., 2015. A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune Responses. *Curr Biol* 25, 1898-1903.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., Prins, M., Goldbach, R., Peters, D., 2000. Impeded Thrips Transmission of Defective Tomato spotted wilt virus Isolates. *Phytopathology* 90, 454-459.

- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olive, E., Sanchez-Campos, S., 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* 49, 219-248.
- Ng, J.C., Falk, B.W., 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44, 183-212.
- Noris, E., Vaira, A.M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B., Accotto, G.P., 1998. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J Virol* 72, 10050-10057.
- Okuda, K., de Souza Caroci, A., Ribolla, P.E., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T., 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell* 34, 210-219.
- Omura, T., Yan, J., Zhong, B., Wada, M., Zhu, Y., Tomaru, M., Maruyama, W., Kikuchi, A., Watanabe, Y., Kimura, I., Hibino, H., 1998. The P2 protein of rice dwarf phyto-reovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector. *J Virol* 72, 9370-9373.
- Ottone, C., Krusche, B., Whitby, A., Clements, M., Quadrato, G., Pitulescu, M.E., Adams, R.H., Parrinello, S., 2014. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol* 16, 1045-1056.
- Pakkianathan, B.C., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Mahadav, A., Zeidan, M., Czosnek, H., Ghanim, M., 2015. Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, *Bemisia tabaci*. *J Virol* 89, 9791-9803.
- Palukaitis, P., Roossinck, M.J., Dietzgen, R.G., Francki, R.I., 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res* 41, 281-348.
- Pan, L.L., Chen, Q.F., Zhao, J.J., Guo, T., Wang, X.W., Hariton-Shalev, A., Czosnek, H., Liu, S.S., 2017a. Clathrin-mediated endocytosis is involved in Tomato yellow leaf curl virus transport across the midgut barrier of its whitefly vector. *Virology* 502, 152-159.
- Pan, Y., Zhu, E., Gao, X., Nauen, R., Xi, J., Peng, T., Wei, X., Zheng, C., Shang, Q., 2017b. Novel mutations and expression changes of acetyl-coenzyme A carboxylase are associated with spirotetramat resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol Biol* 26, 383-391.
- Parker, M., Roberts, R., Enriquez, M., Zhao, X., Takahashi, T., Pat Cerretti, D., Daniel, T., Chen, J., 2004. Reverse endocytosis of transmembrane ephrin-B ligands via a clathrin-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 17-23.
- Pasquale, E.B., 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38-52.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P., Ziegler-Graff, V., 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1994-1999.
- Peng, T., Pan, Y., Gao, X., Xi, J., Zhang, L., Yang, C., Bi, R., Yang, S., Xin, X., Shang, Q., 2016a. Cytochrome P450 CYP6DA2 regulated by cap 'n' collar isoform C (CncC) is associated with gossypol tolerance in *Aphis gossypii* Glover. *Insect Mol Biol* 25, 450-459.
- Peng, T., Pan, Y., Yang, C., Gao, X., Xi, J., Wu, Y., Huang, X., Zhu, E., Xin, X., Zhan, C., Shang, Q., 2016b. Over-expression of CYP6A2 is associated with spirotetramat resistance and cross-resistance in the resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pestic Biochem Physiol* 126, 64-69.
- Perera, R., Kuhn, R.J., 2008. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 11, 369-377.
- Peter, K.A., Gildow, F., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J Virol* 83, 5419-5429.
- Peter, K.A., Liang, D., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2008. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J Gen Virol* 89, 2037-2045.
- Pierfelice, T., Alberi, L., Gaiano, N., 2011. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron* 69, 840-855.
- Pinheiro, P.V., Kliot, A., Ghanim, M., Cilia, M., 2015. Is there a role for symbiotic bacteria in plant virus

transmission by insects? *Current Opinion in Insect Science* 8, 69–78.

Pirone, T.P., Megahed, S., 1966. Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNA's. *Virology* 30, 631-637.

Pitino, M., Coleman, A.D., Maffei, M.E., Ridout, C.J., Hogenhout, S.A., 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One* 6, e25709.

Pitino, M., Hogenhout, S.A., 2013. Aphid protein effectors promote aphid colonization in a plant species-specific manner. *Mol Plant Microbe Interact* 26, 130-139.

Pitulescu, M.E., Adams, R.H., 2010. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* 24, 2480-2492.

Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S., 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.

Plusnin, A., Beaty, B.J., Elliott, R.M., Goldbach, R., Kormelink, R., Lundkvist, K.A., Schmaljohn, C.S., Tesh, R.B., 2012. Family Bunyaviridae, in: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic, San Diego, CA, pp. 725-741.

Pokidysheva, E., Zhang, Y., Battisti, A.J., Bator-Kelly, C.M., Chipman, P.R., Xiao, C., Gregorio, G.G., Hendrickson, W.A., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2006. Cryo-EM reconstruction of dengue virus in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell* 124, 485-493.

Prado, E., Tjallingii, W.F., 1994. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72, 157-165.

Price, D.R., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends Biotechnol* 26, 393-400.

Pridgeon, J.W., Zhao, L., Becnel, J.J., Strickman, D.A., Clark, G.G., Linthicum, K.J., 2008. Topically applied AaeIP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*. *J Med Entomol* 45, 414-420.

Rajabaskar, D., Bosque-Pérez, N.A.E., S. D., 2015. Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Res* 186, 32-37.

Rebers, J.E., 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.

Rebijith, K.B., Asokan, R., Hande, H.R., Kumar, N.K., Krishna, V., Vinutha, J., Bakthavatsalam, N., 2016a. RNA Interference of Odorant-Binding Protein 2 (OBP2) of the Cotton Aphid, *Aphis gossypii* (Glover), Resulted in Altered Electrophysiological Responses. *Appl Biochem Biotechnol* 178, 251-266.

Rebijith, K.B., Asokan, R., Ranjitha, H.H., Rajendra Prasad, B.S., Krishna, V., Krishna Kumar, N.K., 2016b. Diet-Delivered dsRNAs for Juvenile Hormone-Binding Protein and Vacuolar ATPase-H Implied Their Potential in the Management of the Melon Aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environ Entomol* 45, 268-275.

Reeves, W.C., 2001. Partners: serendipity in arbovirus research. *J Vector Ecol* 26, 1-6.

Reinbold, C., Gildow, F.E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M.C., van Den Heuvel, J.F., Brault, V., 2001. Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 82, 1995-2007.

Reinbold, C., Herrbach, E., Brault, V., 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *J Gen Virol* 84, 3473-3484.

Rejman, J., Bragonzi, A., Conese, M., 2005. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther* 12, 468-474.

Revollon, S., Strub, J.M., Fitchette, A.C., Wiss, L., Gomord, V., Van Dorselaer, A., Brault, V., 2010. A reinvestigation provides no evidence for sugar residues on structural proteins of poleroviruses and argues against a role for glycosylation of virus structural proteins in aphid transmission. *Virology* 402, 303-314.

- Reyes-del Valle, J., del Angel, R.M., 2004. Isolation of putative dengue virus receptor molecules by affinity chromatography using a recombinant E protein ligand. *J Virol Methods* 116, 95-102.
- Ribeiro, C., Brehelin, M., 2006. Insect haemocytes: what type of cell is that? *J Insect Physiol* 52, 417-429.
- Richards, C. et al., 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* 452, 949-955.
- Rico-Hesse, R., 2010. Dengue virus virulence and transmission determinants. *Curr Top Microbiol Immunol* 338, 45-55.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F.A., Gaudin, Y., 2006. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 313, 187-191.
- Rodrigues, J.P., Rode, M., Gatfield, D., Blencowe, B.J., Carmo-Fonseca, M., Izaurralde, E., 2001. REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1030-1035.
- Roignant, J.Y., Carre, C., Mugat, B., Szymczak, D., Lepesant, J.A., Antoniewski, C., 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* 9, 299-308.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B.A., Santana-Magal, N., Elimelech, M., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Cilia, M., Ghanim, M., 2015. Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Curr Opin Virol* 15, 1-8.
- Ross, K.A., Brenza, T.M., Binnebose, A.M., Phanse, Y., Kanthasamy, A.G., Gendelman, H.E., Salem, A.K., Bartholomay, L.C., Bellaire, B.H., Narasimhan, B., 2015. Nano-enabled delivery of diverse payloads across complex biological barriers. *J Control Release* 219, 548-559.
- Rossmann, M.G., Johnson, J.E., 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* 58, 533-573.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., Mesleard, F., Varsani, A., Blanc, S., Martin, D.P., Peterschmitt, M., 2015. Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. *J Virol* 89, 9683-9688.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., Enright, A.J., 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17719-17724.
- Sako, N., Yoshioka, K., Eguchi, K., 1984. Mediation of helper component in aphid transmission of some potyviruses. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50, 515-521.
- Sakoonwatanyoo, P., Boonsanay, V., Smith, D.R., 2006. Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology* 49, 161-172.
- Salas-Benito, J.S., del Angel, R.M., 1997. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol* 71, 7246-7252.
- Saleh, M.C., van Rij, R.P., Hekele, A., Gillis, A., Foley, E., O'Farrell, P.H., Andino, R., 2006. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol* 8, 793-802.
- San Miguel, K., Scott, J.G., 2016. The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Manag Sci* 72, 801-809.
- Sanchez-Campos, S., Rodriguez-Negrete, E.A., Cruzado, L., Grande-Perez, A., Bejarano, E.R., Navas-Castillo, J., Moriones, E., 2016. Tomato yellow leaf curl virus: No evidence for replication in the insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 6, 30942.
- Sapountzis, P., Duport, G., Balmand, S., Gaget, K., Jaubert-Possamai, S., Febvay, G., Charles, H., Rahbe, Y., Colella, S., Clevro, 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.
- Schiffelers, R.M., Ansari, A., Xu, J., Zhou, Q., Tang, Q., Storm, G., Molema, G., Lu, P.Y., Scaria, P.V., Woodle, M.C., 2004. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 32, e149.

- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prufer, D., Rohde, W., Rohfritsch, O., 1997. In situ localization of the putative movement protein (p17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* 235, 311-322.
- Schneweis, D.J., Whitfield, A.E., Rotenberg, D., 2017. Thrips developmental stage-specific transcriptome response to tomato spotted wilt virus during the virus infection cycle in *Frankliniella occidentalis*, the primary vector. *Virology* 500, 226-237.
- Scott, J.G., Michel, K., Bartholomay, L.C., Siegfried, B.D., Hunter, W.B., Smagghe, G., Zhu, K.Y., Douglas, A.E., 2013. Towards the elements of successful insect RNAi. *J Insect Physiol* 59, 1212-1221.
- Searles, R.P., Bergquam, E.P., Axthelm, M.K., Wong, S.W., 1999. Sequence and genomic analysis of a Rhesus macaque rhadinovirus with similarity to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *J Virol* 73, 3040-3053.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.M., Van Dorselaer, A., Van Regenmortel, M.H., 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.
- Shabalina, S.A., Koonin, E.V., 2008. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol Evol* 23, 578-587.
- Shakesby, A.J., Wallace, I.S., Isaacs, H.V., Pritchard, J., Roberts, D.M., Douglas, A.E., 2009. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem Mol Biol* 39, 1-10.
- Shang, F., Ding, B.Y., Xiong, Y., Dou, W., Wei, D., Jiang, H.B., Wei, D.D., Wang, J.J., 2016a. Differential expression of genes in the alate and apterous morphs of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Sci Rep* 6, 32099.
- Shang, F., Xiong, Y., Xia, W.K., Wei, D.D., Wei, D., Wang, J.J., 2016b. Identification, characterization and functional analysis of a chitin synthase gene in the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Hemiptera, Aphididae). *Insect Mol Biol* 25, 422-430.
- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338-1340.
- Shintaku, M., Palukaitis, P., 1990. Genetic Mapping of Cucumber Mosaic Virus, in: Pirone, T.P., Shaw, J.G. (Eds.), *Viral Genes and Plant Pathogenesis*. Springer, New York, NY, pp. 156-164.
- Shrestha, A., Champagne, D.E., Culbreath, A.K., Rotenberg, D., Whitfield, A.E., Srinivasan, R., 2017. Transcriptome changes associated with Tomato spotted wilt virus infection in various life stages of its thrips vector, *Frankliniella fusca* (Hinds). *J Gen Virol* 98, 2156-2170.
- Sicard, A., Zeddari, J.L., Yvon, M., Michalakakis, Y., Gutierrez, S., Blanc, S., 2015. Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View. *J Virol* 89, 9719-9726.
- Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P., Schwartz, T.W., Malim, M.H., Hoxie, J.A., Marsh, M., 1998. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *Journal of Cell Science* 111, 2819-2830.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H., Fire, A., 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-476.
- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S.P., Nonet, M.L., Fire, A., Ahringer, J., Plasterk, R.H., 2002. Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 12, 1317-1319.
- Sin, S.H., McNulty, B.C., Kennedy, G.G., Moyer, J.W., 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5168-5173.
- Singh, D.R., Cao, Q., King, C., Salotto, M., Ahmed, F., Zhou, X.Y., Pasquale, E.B., Hristova, K., 2015. Unliganded EphA3 dimerization promoted by the SAM domain. *Biochem J* 471, 101-109.
- Sinisterra, X.H., McKenzie, C.L., Hunter, W.B., Powell, C.A., Shatters, R.G.J., 2005. Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius:

Hemiptera Aleyrodidae). *J Gen Virol* 86, 1525–1532.

Sioud, M., Sorensen, D.R., 2003. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1220-1225.

Smardon, A., Spoerke, J.M., Stacey, S.C., Klein, M.E., Mackin, N., Maine, E.M., 2000. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 10, 169-178.

Smirnova, E., Firth, A.E., Miller, W.A., Scheidecker, D., Brault, V., Reinbold, C., Rakotondrafara, A.M., Chung, B.Y., Ziegler-Graff, V., 2015. Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Poleroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. *PLoS Pathog* 11, e1004868.

Smith, H.G., Hinckes, J.A., 1985. Studies on beet western yellows virus in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). *Annals of Applied Biology* 107, 473-484.

Sokolova, M., Prufer, D., Tacke, E., Rohde, W., 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* 400, 201-205.

Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L., 2004. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434-1437.

Sorensen, D.R., Leirdal, M., Sioud, M., 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol* 327, 761-766.

Soto, M.J., Chen, L.F., Seo, Y.S., Gilbertson, R.L., 2005. Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology* 341, 257-270.

Stevens, M., McGrann, G., Clark, B., 2008. Turnip yellows virus (syn Beet western yellows virus): an emerging threat to European oilseed rape production? *HGCA* 69.

Stevens, M., Smith, H.G., Hallsworth, P.B., 1994. The host range of beet yellowing viruses among common arable weed species. *Plant Pathology* 43, 579-588.

Stewart, L.R., Medina, V., Tian, T., Turina, M., Falk, B.W., Ng, J.C., 2010. A mutation in the Lettuce infectious yellows virus minor coat protein disrupts whitefly transmission but not in planta systemic movement. *J Virol* 84, 12165-12173.

Suksanpaisan, L., Susantad, T., Smith, D.R., 2009. Characterization of dengue virus entry into HepG2 cells. *J Biomed Sci* 16, 17.

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.

Sun, X., Belouzard, S., Whittaker, G.R., 2008. Molecular architecture of the bipartite fusion loops of vesicular stomatitis virus glycoprotein G, a class III viral fusion protein. *J Biol Chem* 283, 6418-6427.

Superti, F., Hauttecoeur, B., Morelec, M.J., Goldoni, P., Bizzini, B., Tsiang, H., 1986. Involvement of gangliosides in rabies virus infection. *J Gen Virol* 67 (Pt 1), 47-56.

Suzuki, M., Kuwata, S., Kataoka, J., Masuta, C., Nitta, N., Takanami, Y., 1991. Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183, 106-113.

Tacke, E., Schmitz, J., Prufer, D., Rohde, W., 1993. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* 197, 274-282.

Takahashi, Y., Nishikawa, M., Kobayashi, N., Takakura, Y., 2005. Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases. *J Control Release* 105, 332-343.

Tamborindeguy, C., Monsion, B., Brault, V., Hunnicutt, L., Ju, H.J., Nakabachi, A., Van Fleet, E., 2010. A genomic analysis of transcytosis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, a mechanism involved in virus transmission. *Insect Mol Biol* 19 Suppl 2, 259-272.

- Tamilarasan, S., Rajam, M.V., 2013. Engineering Crop Plants for Nematode Resistance through Host-Derived RNA Interference. *Cell Dev Biol* 2, 114.
- Tassetto, M., Kunitomi, M., Andino, R., 2017. Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*. *Cell* 169, 314-325 e313.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.
- Terradot, L., Souchet, M., Tran, V., Giblot Ducray-Bourdin, D., 2001. Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling. *Virology* 286, 72-82.
- Thairu, M.W., Skidmore, I.H., Bansal, R., Novakova, E., Hansen, T.E., Li-Byarlay, H., Wickline, S.A., 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, M., Lu, J.J., Ge, Q., Zhang, C., Chen, J., Klibanov, A.M., 2005. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5679-5684.
- Thornbury, D.W., Patterson, C.A., Dessens, J.T., Pirone, T.P., 1990. Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C. *Virology* 178, 573-578.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Plasterk, R.H., 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet* 36, 489-519.
- Tjallingii, W.F., Hogen Esch, T., 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18, 317-328.
- Torrance, L., 1992. Analysis of epitopes on potato leafroll virus capsid protein. *Virology* 191, 485-489.
- Tunncliffe, R.B., Hautbergue, G.M., Kalra, P., Jackson, B.R., Whitehouse, A., Wilson, S.A., Golovanov, A.P., 2011. Structural basis for the recognition of cellular mRNA export factor REF by herpes viral proteins HSV-1 ICP27 and HVS ORF57. *PLoS Pathog* 7, e1001244.
- Tuppurainen, E.S., Lubinga, J.C., Stoltz, W.H., Troskie, M., Carpenter, S.T., Coetzer, J.A., Venter, E.H., Oura, C.A., 2013. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Rhipicephalus appendiculatus* male ticks. *Epidemiol Infect* 141, 425-430.
- Tuppurainen, E.S., Venter, E.H., Coetzer, J.A., Bell-Sakyi, L., 2015. Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis* 6, 134-140.
- Tzin, V., Yang, X., Jing, X., Zhang, K., Jander, G., Douglas, A.E., 2015. RNA interference against gut osmoregulatory genes in phloem-feeding insects. *J Insect Physiol* 79, 105-112.
- Uchibori, M., Hirata, A., Suzuki, M., Ugaki, M., 2013. Tomato yellow leaf curl virus accumulates in vesicle-like structures in descending and ascending midgut epithelial cells of the vector whitefly, *Bemisia tabaci*, but not in those of nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79, 115-122.
- Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharbid, S., Czubyko, F., Aigner, A., 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 12, 461-466.
- Uzest, M., Blanc, S., 2016. CHAPTER 5: Molecular Mechanisms Involved in Noncirculative Virus-Vector Interactions, in: Marilyne, U., Stéphane, B. (Eds.), *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, pp. 59-72.
- Uzest, 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.
- 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.
- van den Heuvel, J.F., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., Richards, K., 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding

- to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* 71, 7258-7265.
- van den Heuvel, J.F., Hogenhout, S.A., van der Wilk, F., 1999. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends Microbiol* 7, 71-76.
- Van den Heuvel, J.F., Verbeek, M., Van der Wilk, F., 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 75 (Pt 10), 2559-2565.
- van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Chen, C., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2008. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* 4, e1000244.
- van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X., Smit, J.M., 2007. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol* 81, 12019-12028.
- van Munster, M., Dulleman, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault, V., Clerivet, A., van der Wilk, F., 2003a. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *J Invertebr Pathol* 84, 6-14.
- van Munster, M., Dulleman, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault, V., Clerivet, A., van der Wilk, F., 2003b. A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the species of the genus Densovirus. *J Gen Virol* 84, 165-172.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R.W., Rivera-Bustamante, R., Murilo Zerbini, F., Martin, D.P., 2017. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch Virol* 162, 1819-1831.
- Vihanto, M.M., Vindis, C., Djonov, V., Cerretti, D.P., Huynh-Do, U., 2006. Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci* 119, 2299-2309.
- Viruses, I.C.O.T.o., Van Regenmortel, M.H.V., International Union of Microbiological Societies, V.D., 2000. Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego.
- von Hahn, T., Rice, C.M., 2008. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem* 283, 3689-3693.
- Walkey, D.G.A., Payne, C.J., 1990. The reaction of two lettuce cultivars to mixed infection by beet western yellows virus, lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Plant Pathology* 39, 156-160.
- Walkey, D.G.A., Pink, D.A.C., 1990. Studies on resistance to beet western yellows virus in lettuce (*Lactuca sativa*) and the occurrence of field sources of the virus. *Plant Pathology* 39, 141-155.
- Wang, D., Liu, Q., Li, X., Sun, Y., Wang, H., 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., Qi, L.S., 2016a. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem* 85, 227-264.
- 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., Cui, F., 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., Cui, F., 2015c. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. *Sci Rep* 5, 8885.
- Wang, X., Zhou, G., 2003. Identification of a protein associated with circulative transmission of barley yellow dwarf virus from cereal aphids, *Schizaphis graminum* and *Sitobion avenae*. *Chinese Science Bulletin* 48, 2083-2087.
- Wang, X.X., Zhang, Y., Zhang, Z.F., Tian, H.G., Liu, T.X., 2016b. Deciphering the Function of Octopaminergic Signaling on Wing Polyphenism of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Front Physiol* 7, 603.
- Wang, Y., Gosselin Grenet, A.S., Castelli, I., Cermenati, G., Ravallec, M., Fiandra, L., Debaisieux, S., Multeau, C., Lautredou, N., Dupressoir, T., Li, Y., Casartelli, M., Ogliastro, M., 2013. Densovirus crosses the insect midgut by transcytosis and disturbs the epithelial barrier function. *J Virol* 87, 12380-12391.

- Wang, Y., Juranek, S., Li, H., Sheng, G., Wardle, G.S., Tuschl, T., Patel, D.J., 2009. Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* 461, 754-761.
- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., Patel, D.J., 2008. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 456, 209-213.
- Wang, Y., Zhang, H., Li, H., Miao, X., 2011. Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. *PLoS One* 6, e18644.
- Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., Jupin, I., 1997. Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology* 228, 132-140.
- Watanabe, S., Bressan, A., 2013. Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *J Gen Virol* 94, 209-219.
- Watanabe, S., Greenwell, A.M., Bressan, A., 2013. Localization, concentration, and transmission efficiency of Banana bunchy top virus in four asexual lineages of *Pentalonia* aphids. *Viruses* 5, 758-776.
- Waterhouse, P.M., 1988. Luteovirus group, in: CMI/AAB (Ed.), *Description of plant viruses*
- Watterson, D., Kobe, B., Young, P.R., 2012. Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *J Gen Virol* 93, 72-82.
- Weaver, S.C., 1997. Vector biology in arboviral pathogenesis, in: Nathanson, N., Ahmed, R., Gonzalez-Scarano, F., Griffin, D.E., Holmes, K.V., Murphy, F.A., Robinson, H.L. (Eds.), *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. , pp. 329-352.
- Weaver, S.C., Reisen, W.K., 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85, 328-345.
- Webster, C.G., Thillier, M., Pirolles, E., Cayrol, B., Blanc, S., Uzest, M., 2017. Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions. *Insect Sci.*
- Wei, T., Chen, H., Ichiki-Uehara, T., Hibino, H., Omura, T., 2007. Entry of Rice dwarf virus into cultured cells of its insect vector involves clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 81, 7811-7815.
- Wei, T., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H., Takahashi, M., Ichiki-Uehara, T., Omura, T., 2006. The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures. *J Virol* 80, 8593-8602.
- Wei, T., Shimizu, T., Omura, T., 2008. Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells. *Virology* 372, 349-356.
- Westra, E.R., Dowling, A.J., Broniewski, J.M., Houtte, S.v., 2016. Evolution and Ecology of CRISPR. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47, 307-331.
- Whangbo, J.S., Hunter, C.P., 2008. Environmental RNA interference. *Trends Genet* 24, 297-305.
- Whitfield, A.E., Falk, B.W., Rotenberg, D., 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480, 278-289.
- Whitfield, A.E., Kumar, N.K., Rotenberg, D., Ullman, D.E., Wyman, E.A., Zietlow, C., Willis, D.K., German, T.L., 2008. A soluble form of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) glycoprotein G(N) (G(N)-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology* 98, 45-50.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L., 2004. Expression and characterization of a soluble form of tomato spotted wilt virus glycoprotein GN. *J Virol* 78, 13197-13206.
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L., 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol* 43, 459-489.
- Whyard, S., Singh, A.D., Wong, S., 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 39, 824-832.
- Will, T., Schmidtberg, H., Skaljic, M., 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.

- Will, T., Vilcinskas, A., 2015. The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochem Mol Biol* 57, 34-40.
- Wilson, R.C., Doudna, J.A., 2013. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 42, 217-239.
- Winston, W.M., Molodowitch, C., Hunter, C.P., 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 295, 2456-2459.
- Woolston, C.J., Covey, S.N., Penswick, J.R., Davies, J.W., 1983. Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus genome. *Gene* 23, 15-23.
- Woolston, C.J., Czaplewski, L.G., Markham, P.G., Goad, A.S., Hull, R., Davies, J.W., 1987. Location and sequence of a region of cauliflower mosaic virus gene II responsible for aphid transmissibility. *Virology* 160, 246-251.
- Wu, D., Qi, T., Li, W.X., Tian, H., Gao, H., Wang, J., Ge, J., Yao, R., Ren, C., Wang, X.B., Liu, Y., Kang, L., Ding, S.W., Xie, D., 2017. Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. *Cell Res* 27, 402-415.
- Wykosky, J., Palma, E., Gibo, D.M., Ringler, S., Turner, C.P., Debinski, W., 2008. Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene* 27, 7260-7273.
- Xiao, D., Lu, Y.-H., Shang, Q.-L., Song, D.-L., Gao, X.-W., 2015a. Gene silencing of two acetylcholinesterases reveals their cholinergic and non-cholinergic functions in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Pest Management Science* 71, 523-530.
- Xiao, D., Lu, Y.H., Shang, Q.L., Song, D.L., Gao, X.W., 2015b. 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, L., Duan, X., Lv, Y., Zhang, X., Nie, Z., Xie, C., Ni, Z., Liang, R., 2014. Silencing of an aphid carboxylesterase gene by use of plant-mediated RNAi impairs *Sitobion avenae* tolerance of Phoxim insecticides. *Transgenic Res* 23, 389-396.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M.P., Myers, M.G., Jr., Ishikawa, Y., 1998. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273, 26962-26968.
- Yan, T., Chen, H., Sun, Y., Yu, X., Xia, L., 2016. RNA Interference of the Ecdysone Receptor Genes EcR and USP in Grain Aphid (*Sitobion avenae* F.) Affects Its Survival and Fecundity upon Feeding on Wheat Plants. *Int J Mol Sci* 17.
- Yang, X., Thannhauser, T.W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E., 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.
- Yano, J., Hirabayashi, K., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Nogawa, M., Kashimori, I., Naito, H., Kitagawa, H., Ishiyama, K., Ohgi, T., Irimura, T., 2004. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 10, 7721-7726.
- Yazi Mendoza, M., Salas-Benito, J.S., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Martinez, S., del Angel, R.M., 2002. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45-kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg* 67, 76-84.
- Zhang, M., Zhou, Y., Wang, H., Jones, H., Gao, Q., Wang, D., Ma, Y., Xia, L., 2013a. Identifying potential RNAi targets in grain aphid (*Sitobion avenae* F.) based on transcriptome profiling of its alimentary canal after feeding on wheat plants. *BMC Genomics* 14, 560.
- Zhang, W., Chipman, P.R., Corver, J., Johnson, P.R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T.S., Strauss, J.H., Rossmann, M.G., Kuhn, R.J., 2003a. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol* 10, 907-912.
- Zhang, X., Sheng, J., Plevka, P., Kuhn, R.J., Diamond, M.S., Rossmann, M.G., 2013b. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6795-6799.

- Zhang, X., Zhang, J., Zhu, K.Y., 2010. Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Mol Biol* 19, 683-693.
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P.R., Zhang, W., Pletnev, S.V., Sedlak, D., Baker, T.S., Strauss, J.H., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., 2003b. Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22, 2604-2613.
- Zhang, Y., Fan, J., Sun, J., Chen, J., 2015. Cloning and RNA interference analysis of the salivary protein C002 gene in *Schizaphis graminum*. *Journal of Integrative Agriculture* 14, 698-705.
- Zhang, Y., Lu, Z., 2015. Peroxiredoxin 1 protects the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* from oxidative stress induced by *Micrococcus luteus* infection. *J Invertebr Pathol* 127, 115-121.
- Zhou, F., Pu, Y., Wei, T., Liu, H., Deng, W., Wei, C., Ding, B., Omura, T., Li, Y., 2007. The P2 capsid protein of the nonenveloped rice dwarf phyto-reovirus induces membrane fusion in insect host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19547-19552.
- Zhou, J., Shum, K.T., Burnett, J.C., Rossi, J.J., 2013a. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. *Pharmaceuticals (Basel)* 6, 85-107.
- Zhou, R., Mohr, S., Hannon, G.J., Perrimon, N., 2013b. Inducing RNAi in *Drosophila* cells by transfection with dsRNA. *Cold Spring Harb Protoc* 2013, 461-463.
- Ziebell, H., Murphy, A.M., Groen, S.C., Tungadi, T., Westwood, J.H., Lewsey, M.G., Moulin, M., Kleczkowski, A., Smith, A.G., Stevens, M., Powell, G., Carr, J.P., 2011. Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Sci Rep* 1, 187.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J., Simonis, M.T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microbe Interact* 9, 501-510.
- Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J., Klein, R., 2003. EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol* 5, 869-878.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C., 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., 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.
- Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V., Gafni, Y., 2007. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* 358, 159-165.

Analyse fonctionnelle du récepteur de l'éphrine de *Myzus persicae* et mise en évidence de son rôle dans la transmission du virus de la jaunisse du navet

Résumé

Les polérovirus infectent une large gamme de plantes d'intérêt économique. Ils sont transmis par un insecte vecteur, le puceron, selon le mode circulant non-multipliant. Le virus, acquis par le puceron lors de l'ingestion de sève sur une plante infectée, traverse l'épithélium des cellules intestinales puis celui des glandes salivaires par un mécanisme de transcytose impliquant des récepteurs encore inconnus.

Le récepteur de l'éphrine (Eph) est une protéine membranaire dont un domaine est capable de se lier dans la levure aux protéines structurales des polérovirus. En développant des techniques basées sur l'ARN interférence, nous avons montré que l'acquisition orale d'ARN double brin ciblant Eph chez le puceron *Myzus persicae* permet de réduire de manière reproductible l'internalisation des polérovirus dans le corps du puceron. Les pucerons ainsi traités transmettent le virus avec une efficacité réduite. Eph pourrait donc assurer la fonction de récepteur des polérovirus chez *M. persicae*.

Mots clés :

Polérovirus, transmission virale, ARN interférence, inhibition de la transmission, virus de plante, puceron vecteur

Résumé en anglais

Poleroviruses infect a wide range of economically important plants. They are transmitted in a circulative and non-propagative mode by an insect vector, the aphid. The virus particles are acquired by aphids when ingesting the sap from an infected plant and cross successively the epithelia of the midgut and the salivary gland cells by a transcytosis mechanism that relies on the presence of unknown receptors.

The ephrin receptor (Eph) is a membrane protein which contains a domain able to bind in yeast to the structural proteins of poleroviruses. By developing methods based on RNA interference, we have shown that oral acquisition of double-stranded RNA targeting Eph in the aphid *Myzus persicae* can reproducibly reduce polerovirus internalization into the aphid's body. Such treated aphids transmit the virus to plants with a lower efficiency. Eph could therefore function as a receptor for poleroviruses in *M. persicae*.

Keywords :

polerovirus, virus transmission, virus receptor, RNA interference, transmission inhibition, plant viruses, aphid vector