



**HAL**  
open science

# L'acrostyle: un organe au coeur des interactions virus-puceron-plante hôte

Marilyne Uzest

► **To cite this version:**

Marilyne Uzest. L'acrostyle: un organe au coeur des interactions virus-puceron-plante hôte. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Montpellier (UM), FRA, 2019. tel-04708524

**HAL Id: tel-04708524**

**<https://hal.science/tel-04708524v1>**

Submitted on 25 Sep 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NoDerivatives 4.0 International License



**Université de Montpellier**  
Ecole Doctorale GAIA



# L'acrostyle, un organe au cœur des interactions virus-puceron-plante hôte

Dossier présenté pour l'obtention de l'Habilitation à Diriger les  
Recherches

**Marilyne Uzest – CRCN Inra**

UMR Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite

Chargée de Recherche Inra dans l'équipe interaction Virus-Insecte-Plante





## Table des Matières

<b>Curriculum Vitae</b>	<b>3</b>
<b>Formation</b>	5
<b>Expériences professionnelles</b>	5
<b>Activités d'enseignement</b>	6
<b>Encadrement – Accueil</b>	6
<b>Animation de la Recherche – Contribution au fonctionnement de collectifs</b>	7
<b>Publications</b>	8
<b>Communications</b>	11
<b>Collaborations</b>	15
<b>Travaux de recherche</b>	<b>17</b>
<b>Parcours scientifique</b>	19
<b>Contexte de l'étude</b>	23
<b>Chapitre 1 – Etude structurale du complexe transmissible du Cauliflower mosaic virus</b>	25
Le complexe transmissible du CaMV	25
Etude structurale de la particule virale	27
Etude structurale des complexes P3:virus	28
Etude structurale de la protéine P3	29
<b>Chapitre 2 – Découverte de l'acrostyle, caractérisation de sa composition protéique et détermination du listing de candidats récepteurs</b>	31
Contexte de l'étude	31
Localisation des récepteurs du CaMV dans les stylets de puceron	33
Découverte de l'acrostyle, organe qui porte les récepteurs du CaMV	35
Identification des premières protéines dans les stylets de puceron	37
Répertoire des protéines de l'acrostyle	38
<b>Chapitre 3 – Vers l'identification du récepteur du CaMV</b>	43
Interaction P2-CaMV/Stylin	43
Approche RNAi – silencing des gènes stylin-01 et stylin-02	45
<b>Projet actuel et développements futurs</b>	<b>47</b>
<b>Mutagenèse chez le puceron</b>	49
<b>Récepteurs d'autres virus non-circulants</b>	52
<b>Rôle de l'acrostyle dans les interactions plante/insecte</b>	53
<b>L'acrostyle, un organe à cibler</b>	55
<b>L'acrostyle est-il une singularité du puceron?</b>	57
<b>Références bibliographiques</b>	<b>59</b>



# Curriculum Vitae

---



**Marilyne UZEST**  
Chargée de Recherche INRA

Tel : 04 99 62 48 06  
email : [marilyne.uzest@inra.fr](mailto:marilyne.uzest@inra.fr)

Nationalité française – 50 ans – Mariée – 2 enfants

Equipe VIP (Virus-Insectes-Plantes)  
UMR 0385 BGPI  
CIRAD-INRA-Montpellier SupAgro  
TAA54/K  
Campus International de Baillarguet  
34398 Montpellier cedex 5

## Formation

---

- 2006 – 2009 **Doctorat** – Ecole Supérieure d’Agronomie de Montpellier  
Spécialité Biologie Intégrative des Plantes – Soutenu le 9 décembre 2009
- 2001 – 2004 **Diplôme de l’Ecole Pratique des Hautes Etudes**. Montpellier  
Spécialité Pathologie Comparée des Invertébrés – Soutenu le 27 septembre 2004
- 1988 **Brevet de Technicien Supérieur Biochimiste**  
Lycée Marie Curie – Marseille
- 1986 **Baccalauréat Série Mathématiques et Sciences de la Vie**  
Lycée Aristide Briand – Gap

## Expériences professionnelles

---

- Depuis 2011 **CR1 INRA, puis CRCN**, centre de Montpellier, UMR BGPI, actuellement dans l’équipe VIP Virus-Insectes-Plantes, dirigée par Stéphane Blanc.  
Projet : Identification des récepteurs de virus de plante non-circulants chez le puceron et caractérisation de l’acrostyle, organe présent dans les stylets de pucerons.
- 1999 – 2010 **TR puis AI INRA**, centre de Montpellier, UMR BGPI, dans l’équipe VIP Virus-Insectes-Plantes, dirigée par Stéphane Blanc.  
Projet développé dans le cadre du diplôme EPHE : Etude de la structure des protéines virales impliquées dans la transmission du *Cauliflower mosaic virus* par puceron.  
Projet développé dans le cadre de la thèse : Caractérisation des partenaires moléculaires impliqués dans l’interaction entre le *Cauliflower mosaic virus* et son vecteur.
- 1990 – 1999 **TR INRA**, centre de Jouy-en-Josas, laboratoire de Génétique Microbienne sous la direction de Bénédicte Michel.  
Etude de l’instabilité génétique : recombinaison illégitime et cassures d’ADN double brin chez *Escherichia coli*.

## Activités d'enseignement

---

Module « Mécanisme et évolution des interactions plante-pathogènes » – Montpellier SupAgro, Montpellier.

Unité d'Enseignement FMOM301: Interactions des micro-organismes avec l'homme les animaux et les plantes. Master M2 BPMBB (Biologie des Plantes et des Microorganismes, Biotechnologie, Bioprocédés), Montpellier.

Unité d'Enseignement HMBA317: interactions des micro-organismes avec l'homme les animaux et les plantes – Spécialité IMHE (Interactions Microorganismes Hôtes et Environnements) – Master Biologie Agrosociétés UM, Montpellier.

Master Sciences du vivant - Biologie des micro-organismes : Virologie – Université de Strasbourg, Strasbourg.

## Encadrement – Accueil

---

### Bac + 2 et Bac +3

2009	Annick Giral, DEUG, Université de Montpellier II
2010	Annick Giral, Licence 3, Université de Montpellier II
2012	Emilie Leroy, DUT, Université d'Auvergne

### Masters

2013	Maëlle Thillier, Master 2, Université de Montpellier II <i>Caractérisation du récepteur d'un virus de plante, le Cucumber mosaic virus (CMV), chez son insecte vecteur le puceron.</i>
2015	Maëlle Deshoux, Master 2, Université de Montpellier <i>Caractérisation fonctionnelle de la première protéine identifiée dans les stylets de puceron.</i>
2016	Floriane Delicque, Master 2, Université de Montpellier <i>Caractérisation du rôle de l'acrostyle – organe des stylets de puceron- dans les interactions plante-insecte</i>
2018	Thibaut Kosuth, Master 1, Université de Montpellier <i>Caractérisation du rôle des protéines cuticulaires de l'acrostyle de puceron dans la transmission de phytovirus et la physiologie de l'insecte.</i>

### Doctorants

2010	Maria Urizarna, Universitat de Barcelona, Espagne. Co-encadrement 4 mois. <i>Identificación de posibles factores de Myzus persicae implicados en la transmisión del virus del grabado del tabaco (TEV) y estrategias para interferir su expresión .</i>
2014	Aurélie Bak, Montpellier SupAgro. Co-encadrement 4 mois. <i>Etude des mécanismes cellulaires de la transmission du Cauliflower mosaic virus par puceron.</i>
2016	Cecilia Prator, University of California, Berkeley, USA. Co-encadrement 4 mois. <i>Mechanisms of transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by one of its insect vectors, Planococcus ficus.</i>

2016-2019 Maëlle Deshoux. Université de Montpellier. Encadrement.  
*Caractérisation du rôle de l'acrostyle – organe des stylets de puceron – dans la transmission de virus de plante et les interactions plante-insecte.*

### Post-Doctorants

2013-2017 Craig G. Webster, CDD 4 ans.  
2016-2017 Baptiste Monsion, CDD 18 mois.  
2017 Caroline Hemmer, CDD 8 mois.

### Personnels non-permanents

2012 Pierre Cesses, Technicien de la Recherche, CDD 3 mois.  
2012-2013 Elodie Pirolles, Assistante Ingénieur, CDD 8 mois.  
2015 Bastien Cayrol, Technicien de la Recherche, CDD 12 mois.  
2015 Cyrielle Ndougou, Ingénieur d'Etude, CDD 4 mois.  
2016-2018 Elodie Pichon, Ingénieur d'étude, CDD 24 mois.  
2016-2017 Alexandre Morisset, Technicien de la Recherche, CDD 9 mois.  
2019 Marie Ducouso, Ingénieure, CDD 4 mois.

### Personnels permanents

Depuis 2016 Bastien Cayrol, Technicien de la recherche Inra.

### Accueil sabbatique

2013-2014 Rodrigo Almeida, University of California, Berkeley, USA. Supervision du programme « Blocking plant virus transmission ».

## Animation de la Recherche – Contribution au fonctionnement de collectifs

---

### Expertise

Membre de comité de thèse	Antoine Alliaume (2013-2016), Inra Colmar
Membre de jury de thèse (examinatrice)	Pierre Simonet (2016), INSA Lyon
Membre de jury de HDR (rapporteuse)	Corinne Schmitt-Keichinger (2017), Université de Strasbourg
Membre de jury de concours	Technicien de la Recherche Inra, Montpellier (2016).

Relectrice pour des revues spécialisées en entomologie, pathologie végétale et virologie:

Arthropod Plant Interactions, Arthropod Structure & Development, Crop Protection, Florida Entomologist, Insect Molecular Biology, Insect Science, Journal of General Virology, Journal of Virology, Molecular Plant Microbe Interactions, Molecular Plant Pathology, Scientific Reports, Virology.

Co-éditrice du numéro spécial *Insect Science* « Aphids » (volume 21, issue 3, parution juin 2014)

## Organisation de congrès

Co-organisatrice des 6<sup>o</sup> rencontres du Réseau francophone de Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés (BAPOA). Montpellier, France, (2013).

Membre du comité scientifique et membre du comité organisateur des Rencontres de Virologie Végétale (Aussois, France). Rencontres bisannuelles. Depuis 2014.

## Obtention de financements – Coordination de projets – Co-animatrice de projets

- 2011 – 2015 Lauréate du prix « Chercheuses d'avenir » décerné en décembre 2011 par la Région Languedoc-Roussillon. Financement de 80 k€. Coordinatrice du projet « Acrostyle ».
- 2012 – 2014 1<sup>ère</sup> phase des Grand Challenge Explorations. Fondation Bill & Melinda Gates. Financement de 100 k\$ obtenu en 2012 par S. Blanc. Coordinatrice du projet « Acrostyle and plant virus receptors », 5 partenaires impliqués.
- 2015 – 2018 2<sup>ème</sup> phase des Grand Challenge Explorations. Fondation Bill & Melinda Gates. Financement de 885 k\$ obtenu en 2015 par S. Blanc. Coordinatrice du projet « Aphid mouthparts: a key target for plant protection ». 5 partenaires impliqués.
- 2015 – 2019 Obtention d'un financement ANR de 620 k€ en 2015. Coordinatrice du projet « StylHook ». 4 partenaires impliqués.
- 2016 – 2018 Co-animatrice du projet « MutAphid » pour le développement de nouveaux outils pour la validation fonctionnelle chez le puceron. Financement de 35 k€ du département SPE INRA. Coordination Gaël Le Trionnaire, Inra, Rennes. Co-animatrice Véronique Brault, Inra, Colmar.

## Publications

---

### Articles scientifiques

A titre indicatif, les Impact Factor tels qu'indiqués par « InCites Journal Citation Reports » l'année de publication, sont mentionnés à la fin de chaque article (IF). Pour les publications antérieures à 1997, c'est l'IF de 1997 qui est indiqué. Pour les publications 2018, 2019, c'est l'IF 2017 qui est indiqué. Les étudiants Master 2 ou thèse que j'ai encadrés sont soulignés. Les 5 articles précédés d'un # sont inclus dans le PDF.

1. **Uzest M.**, Ehrlich S. D. & Michel, B. (1991). The Escherichia coli terB sequence affects maintenance of a plasmid with the M13 phage replication origin. *J Bacteriol* 173, 7695-7. (IF 3.6)
2. Vilette D., **Uzest M.**, Ehrlich S. D. & Michel B. (1992). DNA transcription and repressor binding affect deletion formation in Escherichia coli plasmids. *EMBO J* 11, 3629-34. (IF 12.6)
3. d'Alencon E., Petranovic M., Michel B., Noiroot P., Aucouturier A., **Uzest M.** & Ehrlich, S. D. (1994). Copy-choice illegitimate DNA recombination revisited. *EMBO J* 13, 2725-34. (IF 12.6)
4. **Uzest M.**, Ehrlich S. D. & Michel B. (1995). Lethality of rep recB and rep recC double mutants of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 17, 1177-88. (IF 5.6)
5. Michel B., Ehrlich S. D. & **Uzest M.** (1997). DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J* 16, 430-8. (IF 12.6)

6. Hébrard E., Drucker M., Leclerc D., Hohn T., **Uzest M.**, Froissart R., Strub J.-M., Sanglier S., van Dorselaer A., Padilla A., Labesse G. & Blanc S. (2001). Biochemical Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus. *J. Virol.* 75, 8538-8546. (IF 5.6)
7. Drucker M., Froissart R., Hébrard E., **Uzest M.**, Ravallec M., Esperandieu P., Mani J. C., Pugniere M., Roquet F., Fereres, A. & Blanc, S. (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2422-2427. (IF 10.7)
8. Froissart R., **Uzest M.**, Ruiz-Ferrer V., Drucker M., Hébrard E., Hohn T. & Blanc S. (2004). Splicing of Cauliflower mosaic virus 35S RNA serves to downregulate a toxic gene product. *J Gen Virol* 85, 2719-26. (IF 3.3)
9. 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**, 267-77. (IF 5.2)  
\* Co-premier auteur
10. Froissart R., Roze D., **Uzest M.**, Galibert L., Blanc S. & Michalakis, Y. (2005). Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biol* 3, e89 (IF 13.9)
11. Moreno A., Hébrard 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, 13587-93. (IF 5.2)
- # 12. **Uzest M.**, Gargani D., Drucker M., Hébrard 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, 17959-64. (IF 9.6)
13. Martinière A., Gargani D., **Uzest M.**, Lautredou N., Blanc S. & Drucker M. (2009). A Role for Plant Microtubules in the Formation of Transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant J* 58, 135-146. (IF 6.9)
- # 14. **Uzest M.**, Gargani D., Dombrovsky A., Cazevieille C., Cot D. & Blanc S. (2010). The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 39, 221-9. (IF 1.7)
- # 15. Hoh F., **Uzest M.\***, Drucker M., Plisson-Chastang C., Bron P., Blanc S. & Dumas C. (2010). Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. *J Virol* 84, 4706-13. (IF 5.2)  
\* Co-premier auteur
16. Brault V., **Uzest M.**, Monsion B., Jacquot E. & Blanc S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333, 524-38. (IF 1.5)
17. Blanc S., **Uzest M.**, Drucker M. (2011). New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Curr Opin Microbiol.* 14:483-491. (IF 7.9)
18. Blanc S., Drucker M., **Uzest M.** (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:403-25. (IF 9.6)
19. Filloux D., Murrell S., Koohapitagtam M., Golden M., Julian C., Galzi S. **Uzest M.**, Rodier-Goud M., D'hont A., Vernerey M.-S., Wilkin P. Peterschmitt M., Winter S., Murrell B., Martin D. P., Roumagnac, P. (2015). The genomes of many yam species contain transcriptionally active endogenous geminiviral sequences that may be functionally expressed. *Virus Evolution*, 2015, 1 (1) : 1-17.
20. 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., Gabaldón T., Jordan A., Julca I., Kettles G.J., Kowitzwanich 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.* 2017 Apr 4;18(1):63. doi: 10.1186/s13059-017-1202-6. (IF 13.2)

- # 21. 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.* 2017 Apr 19. doi: 10.1111/1744-7917.12469. (IF 2.1)
22. Chesnais Q., Couty A., **Uzest M.**, Brault V., Ameline A. (2017). Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Sci.* 2017 Jul 21. doi: 10.1111/1744-7917.12508. (IF 2.1)
23. Jimenez J., Webster C.G.\*, Moreno A., Almeida R.P.P., Blanc S., Fereres A., **Uzest M.** (2017). Fasting alters aphid probing behaviour but does not universally increase the transmission rate of non-circulative viruses. *J Gen Virol* 98(3) :3111-3121 (IF 2.5)
- \* Co-premier auteur
24. Alliaume A., Reinbold C., **Uzest M.**, Lemaire O., Herrbach E. (2018). Mouthparts morphology of the mealybug *Phenacoccus aceris*. *Bulletin of Insectology.* 71 (1):1-9. (IF 1.1)
- # 25. Webster C.G., Pichon E., van Munster M., Monsion B., Deshoux M., Gargani D., Calevro F., Jimenez J., Moreno A., Krenz B., Thompson J.R., Perry K.L., Fereres A., Blanc S., **Uzest M.** (2018). Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *J Virol.* 2018 May 16. pii: JVI.00432-18. doi: 10.1128/JVI.00432-18. (IF 4.4)
26. Deshoux M., Monsion B., **Uzest M.** Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Curr Opin Virol.* 2018 Dec;33:137-143. doi: 10.1016/j.coviro.2018.07.015. Epub 2018 Sep 20. (IF 5.6)
27. Le Trionnaire G., Tanguy-Perry S., Hudaverdian S., Gleonnec F., Richard G., Cayrol B., Monsion B., Pichon E., Deshoux M., Webster C.G., **Uzest M.**, Herpin A., Tagu D. (*in press*). An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* (IF 3.6)

## Chapitre d'ouvrage

28. **Uzest M.**, Blanc S. (2016). Molecular mechanisms involved in non-circulative virus-vector Interactions. In Brown J. (ed.). Vector-mediated transmission of plant pathogens. San Diego, USA: Academic Press. p59-72

## Articles dans des revues à IF<1 ou non référencée

- S. Blanc, **M. Uzest**, T. Candresse, M. Drucker, A. Fereres, D. Gargani, E. Garzo, H. Hébrard. (2008). Une protéine clé pour la transmission d'un virus de plante à la pointe des stylets de l'insecte vecteur. *Virologie* 12 (1), 70-2.
- Uzest M.**, Drucker M., Blanc S. (2011). La transmission d'un complexe : pas si simple. Cas du virus de la mosaïque du chou-fleur. *Virologie* 15 (3), 192-204. (IF 0.13)

## Articles de vulgarisation

Véronique Brault, **Marilyne Uzest**, Paloma Cabeza-Orcel. Viroses transmises par les pucerons. Deux protéines au rôle majeur. Décembre 2018. N°461. Perspectives Agricoles.

## Mémoire de recherche

1. Etude de la structure des protéines virales impliquées dans la transmission du *Cauliflower mosaic virus* par vecteur. Diplôme E.P.H.E. soutenu le 27 septembre 2004.
2. Caractérisation des partenaires moléculaires impliqués dans les interactions entre le *Cauliflower mosaic virus* et son insecte vecteur. Thèse de doctorat soutenue le 9 décembre 2009.

## 2 articles soumis ou en cours de préparation

1. Gushinskaya N., Ressnikoff D., Arafah K., Voisin S., Bulet P., **Uzest M.**, Rahbé Y. (*submitted*). Insect mouthpart transcriptome unveils [extensive] novel cuticular proteins and complex organization.

2. Masson V., Deshoux M.\*, Arafah K., Voisin S., Gushinskaya N., Rahbé Y., Cayrol B., Webster C.G., van Munster M., Blanc S., Bulet P., **Uzest M.** (*in prep*). Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the surface of the acrostyle.

\*Co-premier auteur

## Communications

---

### Communications orales sur invitation à des congrès scientifiques nationaux ou internationaux

1. **Uzest M.**; Gargani D.; Blanc S. (2008). Toward the characterization of the receptor of a non-circulative plant virus in its insect vector. Plant Interactions with Aphids and Other Insects with Piercing Mouthparts, Wageningen, Hollande.
2. **Uzest M.**, Gargani D. & Blanc S. (2009). Towards the characterization of the functional role of the common duct in aphid stylets. 8th International Symposium on Aphids; Catania, Italie.
3. **Uzest M.**, Gargani D. & Blanc S. (2010). L'acrostyle, ou la face cachée des stylets maxillaires de puceron. 7<sup>ème</sup> édition de la Conférence Internationale Francophone d'Entomologie, Louvain-La-Neuve, Belgique.
4. **Uzest M.** (2011). Découverte et caractérisation d'un nouvel organe - l'acrostyle - dans les stylets du puceron impliqué dans la transmission des virus de plante. 3<sup>ème</sup> Journées des Microscopistes, Montpellier, France.
5. **Uzest M.** (2012). Identification du récepteur du *Cauliflower mosaic virus* chez son insecte vecteur et caractérisation de l'acrostyle. Séminaire UMR SVQV, Colmar, France.
6. **Uzest M.** (2013). Identification of the *Cauliflower mosaic virus* receptor in its insect vector and characterisation of the acrostyle. Séminaire UMR DGIMI, Montpellier, France.
7. **Uzest M.**, Gargani D., Thillier M., Pirolles E., Blanc S. (2013). Characterization of the Acrostyle, an organ present at the tip of aphid maxillary stylets involved in non-circulative virus transmission. 9th International Symposium on Aphids, Pékin, Chine.
8. **Uzest M.** (2015). The acrostyle within aphids' stylets : role in plant virus transmission and plant-insect interaction. Séminaire Université de Berkeley, Californie (USA).
9. **Uzest, M.** (2015). The acrostyle in aphids' stylets : an Achilles heel for virus transmission ? Annual meeting American Phytopathological Society. Pasadena, Californie (USA).
10. **Uzest, M.** (2015). The acrostyle, an organ within aphid mouthparts : role in plant virus transmission and plant-aphid interaction. XIth International Plant Molecular Biology Congress, Foz de Iguazu, Brésil.
11. **Uzest, M.** (2016). The acrostyle within aphid stylets : role in plant virus transmission and plant-aphid interaction. Séminaire Université de Davis, Californie (USA).
12. **Uzest, M.** (2016). The acrostyle within aphid stylets : role in plant virus transmission and plant-aphid interaction. XXV International Congress of Entomology, Orlando, Florida.
13. **Uzest, M.** (2016). The acrostyle, organ within aphid's mouthparts: an Achilles heel for virus transmission ? European PhD network in insect science annual meeting. La Colle-sur-Loup, France.
14. **Uzest, M.** (2017). The acrostyle organ within aphid stylets: role in plant virus transmission and plant-insect interaction. Séminaire UMR IGEPP. Rennes, France.
15. **Uzest, M.** (2017). Cassava Whitefly Project:- 3<sup>rd</sup> Annual Meeting. 26<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> November 2017. Ronda, Malaga, Espagne.
16. **Uzest, M.** (2018). Vers l'identification de récepteurs de virus de plante non-circulants chez les pucerons. XXe Journées Francophones de Virologie. Paris, France.

17. **Uzest, M.** (2018). Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. XI European Congress of Entomology. Naples, Italie.

## *2 autres conférences invitées programmées pour 2019*

**Uzest M.** Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. 14th International Plant Virus Epidemiology. May 13-17 2019. Séoul, Corée du Sud.

**Uzest M.** Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. Association of Applied Biologists - International Advances in Plant Virology 2019. Oct 29-31 2019. Rome, Italie.

## **Communications orales à des congrès scientifiques nationaux ou internationaux**

18. **Uzest M.,** Bron P., Plisson C., Hoh, Dumas S., Hébrard E., Blanc S. (2002). Etudes structurales des protéines virales impliquées dans la transmission du CaMV par puceron : données préliminaires. Réunion du groupe vection, Dijon, France.
19. **Uzest M.,** Plisson C., Drucker M., Froissart R., Dumas C., Blanc S. and Bron P. (2003). Structural studies of the CaMV particle and the reconstituted complex P3/virion; Association of Applied Biologists, Montpellier, France.
20. **Uzest, M.,** Fereres, A., Gargani, D., Candresse, T., Blanc, S. (2007). Caractérisation du récepteur d'un virus non-circulant chez son insecte vecteur. 11ème Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
21. **Uzest M.,** Gargani D., Blanc S. (2008). Le récepteur du Cauliflower mosaic virus (CaMV) dans les stylets de son puceron vecteur. Réseau Français de la Biologie Adaptative des Pucerons, Paris, France.
22. **Uzest M.,** Gargani D. & Blanc S. (2008). Caractérisation du récepteur d'un virus non-circulant chez son insecte vecteur. Atelier Biologie des interactions vecteur-agents pathogènes , Montpellier, France
23. **Uzest M.,** Gargani D. & Blanc S. (2009). La face cachée du canal commun des stylets maxillaires de puceron. 12<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
24. **Uzest M.,** Gargani D. & Blanc S. 2009. La face cachée du canal commun des stylets maxillaires de puceron. 2<sup>ème</sup> Rencontre du réseau Français de la Biologie Adaptative des Pucerons, Paris, France
25. Van Munster M., Hoh F., **Uzest M.,** Giral A., Drucker M., Plisson-Chastang C., Bron P., Blanc S., Dumas C. (2011). Apport de la biologie structurale dans la compréhension de la transmission d'un virus de plante par un insecte vecteur; structure tridimensionnelle de la protéine P3 du Cauliflower mosaic virus. 13<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
26. Monsion B., Boissinot S., **Uzest M.,** Blanc S., Brault V. (2011). Identification of aphid and plant virus-partners involved in transmission by aphids. Role of ALY proteins in polerovirus cycle? 13<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
27. **Uzest, M.,** Pirolles, E., Le Blaye S. & Blanc S. (2012). Identification of the Cauliflower mosaic virus receptor in is insect vector & characterisation of the acrostyle : antibodies library and peptide array approches. 5<sup>ème</sup> réunion annuelle du réeau BAPOA, Lyon, France.
28. **Uzest M.,** Gargani D., Thillier M., Webster C., Almeida R., Le Blaye S., Blanc S. (2013). Receptors of non-circulative viruses in their insect vectors. Cucumber mosaic virus. 6<sup>ème</sup> réunion annuelle du réseau BAPOA, Montpellier, France.
29. Herrbach, E., Alliaume, A., Beuve, M., Hommay, G., Le Maguet, J., Reinbold, C., **Uzest, M.,** Wiss, L., Lemaire, O. (2014). Recent advances in the study of grapevine leafroll disease in north eastern France. Siebeldingen, Allemagne.
30. Webster C. & **Uzest M.** (2014). Effect of pre-acquisition starvation of aphid transmission of non-circulative viruses. 7<sup>ème</sup> réunion annuelle du réseau BAPOA, Avignon, France.

31. Alliaume, A., **Uzest, M.**, Beuve, M., Reinbold, C., Hommay, G., Lemaire, O., Herrbach, E. (2015). Mouthparts anatomy and transmission studies of the Grapevine leafroll-associated virus 1 and Grapevine virus A by the mealybug *Phenacoccus aceris*. 15<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
32. A. Alliaume, **M. Uzest**, C. Prator, M. Beuve, C. Reinbold, G. Hommay, R.P.P. Almeida, O. Lemaire et E. Herrbach. (2015). Etude de la transmission de l'ampélovirus Grapevine Leafroll-associated virus 1 et du vitivirus Grapevine virus A par la cochenille *Phenacoccus aceris*. 9<sup>ème</sup> colloque de la Société Française de Phytopathologie, Colmar, France.
33. Alliaume, A., Reinbold, C., **Uzest, M.**, Beuve, M. ; Hommay, G. ; Lemaire, O. ; Herrbach, E. (2015). Transmission studies of the Grapevine leafroll-associated virus 1 and the Grapevine virus A by the mealybug *Phenacoccus aceris*. Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Ankara, Turquie.
34. Chesnais Q., Couty A., **Uzest M.**, Brault V., Ameline A. (2016). Vector manipulation by viruses: The pathosystem Brassicaceae-aphids-phytoviruses, a study case. XXV International Congress of Entomology, Orlando, Florida.
35. Le Trionnaire G, Tanguy S, Hudaverdian S, Gleonnec F, Richard G, Webster C, Simon JC, Tagu D, **Uzest M.** (2016). CRISPR-Cas9 mutagenesis in the pea aphid. 9<sup>ème</sup> réunion annuelle du réseau BAPOA, Amiens, France.
36. Rahbé Y, Gushinskaia N, Monsion B, Uzest M. 2017. Vection des bactéries par les insectes : la cuticule importe t'elle ? 10<sup>èmes</sup> Rencontres du réseau BAPOA. Amiens, France.
37. C. Webster, S. Blanc and **M. Uzest.** (2017). Stylin-1: a putative receptor of *Cauliflower mosaic virus*. 16<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
38. E. Pichon, C. G. Webster, C. Ndougounga, B. Cayrol, M. Deshoux, S. Le Blaye, S. Blanc & **M. Uzest.** (2017). Caractérisation du rôle des protéines cuticulaires de l'acrostyle dans la transmission. 10<sup>èmes</sup> Rencontres du réseau BAPOA, Colmar, France.
39. M. Deshoux, B. Monsion, C. G. Webster, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, S. Blanc & **M. Uzest.** (2017). Caractérisation du rôle de l'acrostyle dans les interactions plante-puceron. 10<sup>èmes</sup> Rencontres du réseau BAPOA, Colmar, France.
40. M. Deshoux, B. Monsion, C. G. Webster, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, S. Blanc & **M. Uzest.** (2017). The role of cuticular proteins located at the surface of the acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets, in plant-aphid interactions. European PhD network "Insect science" annual meeting, Napoli, Italy.
41. G. Le Trionnaire, D. Tagu, A. Herpin, **M. Uzest**, S. Tanguy, S. Hudaverdian, G. Richard, F. Gleonnec, B. Cayrol, B. Monsion, E. Pichon, M. Deshoux, C. G. Webster. (2018) A robust and efficient Crispr-cas9 mutagenesis protocol in the pea aphid. XI European Congress of Entomology, Naples, Italie.
42. M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C. G. Webster, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, J. Jimenez, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc & **M. Uzest.** (2018). An effector from aphid saliva interacts with the acrostyle, an organ at the tip of insect stylets. Effectome XIth annual meeting, Lauret, France.
43. M. Deshoux, B. Monsion, C. G. Webster, E. Pichon, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, J. Jimenez, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc & **M. Uzest.** (2018). Caractérisation du rôle de l'acrostyle – organe qui porte les récepteurs de virus de plante - dans les interactions plante/insecte. 11<sup>èmes</sup> Rencontres du réseau BAPOA, Rennes, France.
44. **M. Uzest**, G. Le Trionnaire, B. Cayrol, M. Deshoux, F. Gleonnec, A. Herpin, S. Hudaverdian, B. Monsion, E. Pichon, D. Tagu, S. Tanguy, G. Richard, C. G. Webster. (2018). CRISPR-Cas9 chez *Acyrtosiphon pisum* pour valider le rôle de Stylin-01 dans la transmission du *Cauliflower mosaic virus*. 11<sup>èmes</sup> Rencontres du réseau BAPOA, Rennes, France.
45. F. Hoh, C. Fallet, A. Ancelin, J. Lai-Kee-Him, S. Trapani, **M. Uzest**, S. Blanc and P. Bron. (2019). Structure of the Cauliflower mosaic virus P2 protein: insight into molecular mechanism of transmission. 17<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
46. M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C.G. Webster, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, S. Blanc & **M. Uzest.** (2019). Role of Stylins, cuticular proteins of the acrostyle, in noncirculative

- virus transmission and plant-aphid interactions. 17<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
47. M. Deshoux, B. Monsion, E. Pichon, C.G. Webster, B. Cayrol, V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, P. Bulet, S. Blanc & **M. Uzest**. (2019). The acrostyle, an organ at the tip of aphid stylets, interacts with an effector from aphid saliva. UK-France joint meeting on Aphids, Rothamsted, UK.
  48. Rahbé, Y., Guschinskaya, N., Munster van, M. & **Uzest, M.** (2019) From stylet to cuticle: Transcriptomics and genomics of aphid cuticular proteins. UK-France joint meeting on Aphids, Rothamsted, UK.
  49. G. Le Trionnaire, **M. Uzest**, M. Deshoux, B. Cayrol, B. Monsion, E. Pichon, T. Kosuth, S. Tanguy, S. Hudaverdian, F. Gleonnec, G. Richard, C.G. Webster, A. Herpin and D. Tagu. (2019). Development of a robust CRISPR-Cas9 mutagenesis protocol in the pea aphid to knock out *stylin-01* gene and study the role of Stylin-01 cuticular protein in *Cauliflower mosaic virus* transmission. UK-France joint meeting on Aphids, Rothamsted, UK.

### Communications par affiche à des congrès scientifiques

1. **Uzest M.**, Plisson C., Drucker M., Froissart R., Dumas C., Conway J., Thomas D., Blanc S. & Bron P. (2005). Étude structurale du complexe P3: virion du Cauliflower mosaic virus par cryo-microscopie électronique. 10<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
2. Blanc S. & **Uzest M.** (2008). Characterization of the first non-circulative plant virus receptor in its insect vector. 4th Meeting of the International Aphid Genomics Consortium – Pea Aphid Genome Annotation Workshop, Princeton (NJ, USA).
3. Hoh F., **Uzest, M.**, Plisson C., Bron, P., Blanc S., Dumas, C. (2008). Structural studies of the virion associated protein P3 from Cauliflower mosaic virus. Association Française de Cristallographie, Rennes, France.
4. **Uzest M.**, Gargani D., Blanc S. (2011). What has the acrostyle - a newly described organ at the tip of the maxillary stylets - to do with plant/insect interactions ? Effectome IVth annual meeting on plant pathogen effectors, Lauret, France.
5. **Uzest M.**, Gargani D., Webster C., Almeida R., Thillier M., Le Blaye S., Blanc S. (2014). Is the Acrostyle of aphid stylets a universal transport device for non-circulative viruses ? 2<sup>nd</sup> Hemipteran Plant Interaction Symposium, Riverside, CA (USA).
6. **Uzest, M.**, Gargani, D., Webster, C., Thillier, M., Pirolles, E., Le Blaye, S., Blanc, S. (2014). Characterization of the Acrostyle, an organ present at the tip of aphid maxillary stylets involved in non-circulative virus transmission. 10th European Congress of Entomology, York, UK.
7. F. Lecorre, J. Lai-Kee Him, F. Hoh, E. Richard, S. Trapani, **M. Uzest**, S. Blanc and P. Bron. (2015). Structural characterization of the protein P2, the aphid transmission factor of the cauliflower mosaic virus. 15<sup>°</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
8. Webster, C., Blanc, S., **Uzest, M.** (2015). Effect of pre-acquisition starvation on aphid transmission of non-circulative viruses. 15<sup>°</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
9. **M. Uzest**, C. Webster, D. Gargani, M. van Munster, S. Blanc. (2015). Characterization of the acrostyle, organ recently discovered at the tip of aphid maxillary stylets involved in plant virus transmission. Society of Experimental Biology annual meeting, Prague, République Tchèque.
10. Jiménez, J., Webster, C., Moreno, A., **Uzest, M.**, Blanc, S., Fereres, A. (2016). Pre-acquisition starvation does not increase the transmission rate of cucumber mosaic virus (CMV) by *Aphis gossypii*. International plant virus epidemiology symposium, Avignon, France
11. Chesnais Q, Couty A, **Uzest M**, Brault V, Ameline A. (2016). Interactions between phytovirus and aphids vectors can be modulated depending on vector transmission efficiency. 18<sup>°</sup> Colloque de la Biologie de l'Insecte, Tours, France.
12. M. Deshoux, S. Blanc & **M. Uzest**. (2016). Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions. European PhD network in insect science annual meeting, La Colle-sur-Loup, France.

13. C. Webster, M. Thillier, E. Pirolles, S. Blanc and **M. Uzest**. (2017). Understanding the proteomic composition of the acrostyle through novel methods and the identification of cuticular proteins available for viral binding. 16<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
14. M. Deshoux, S. Blanc & **M. Uzest**. (2017). Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions. 16<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
15. E. Pichon, C.G. Webster, C. Nougonna, B. Cayrol, M. Deshoux, S. Blanc & **M. Uzest**. (2017). Knockdown of cuticular transcripts in aphids: the ups and downs. 16<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
16. B. Monsion, Craig G. Webster, D. Gargani, M. Thillier, S. Blanc & **M. Uzest**. (2017). Localization of Cucumber mosaic virus particles and the Turnip mosaic virus helper component (HC) in aphid stylets. 16<sup>ème</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
17. M. Deshoux, S. Blanc & **M. Uzest**. (2017). Characterization of the role of the acrostyle – organ within aphid stylets which bears receptors of plant viruses – in plant-aphid interactions. 3<sup>rd</sup> Hemipteran Plant Interaction Symposium, Madrid, Espagne.
18. F. Hoh, P. Barthe, C. Fallet, A. Ancelin, J. Lai-Kee-Him, C. G. Webster, B. Cayrol, A. Morisset, S. Blanc, **M. Uzest**, A. Padilla and P. Bron. (2019). A structural study of potential plant virus receptors. 17<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.
19. G. Le Trionnaire, B. Cayrol, M. Deshoux, F. Gleonnec, A. Herpin, S. Hudaverdian, T. Kosuth, B. Monsion, E. Pichon, D. Tagu, S. Tanguy, G. Richard, C. G. Webster & **M. Uzest**. (2019). CRISPR-Cas9 in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* to generate Stylin-01 knockout mutants and study the role of Stylin-01 in *Cauliflower mosaic virus* transmission. 17<sup>èmes</sup> Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France.

## Collaborations

---

### Seules sont notées ci-après les collaborations depuis 2015:

**Rodrigo Almeida**, Université de Berkeley, California. Récepteurs de virus de vigne chez l'insecte vecteur. Hors financement.

**Arnaud Ameline**, Université de Picardie, Amiens. Interaction virus plante-insecte. Hors financement.

**Véronique Brault**, Inra, UMR SVQV, Colmar. Outils de validation fonctionnelle chez le puceron. Projet SPE Inra MutAphid.

**Patrick Bron**, Inserm, Centre de Biochimie Structurale, Montpellier : Structuraliste. Partenaire du projet ANR StylHook et du projet financé par la fondation Gates.

**Philippe Bulet**, CNRS, BioPark Archamps : Spectrométrie de masse. Partenaire du projet ANR StylHook et du projet financé par la fondation Gates.

**Federica Calevro**, INSA, Lyon : Mise en place de validation fonctionnelle chez le puceron. Hors financement.

**Laurent David**, Université Lyon 1, Lyon : Chimie des biopolymères. Partenaire du projet ANR StylHook et du projet financé par la fondation Gates.

**A. Fereres**, CSIC Madrid, Espagne : Comportement alimentaire des pucerons. Partenaire du projet projet financé par la fondation Gates.

**Paolo Gabrieli**, Université de Milan, Italie : Transmission de pathogènes par moustique. Hors financement.

**Etienne Herrbach**, Inra, UMR SVQV, Colmar. Localisation des récepteurs d'Ampelovirus chez la cochenille. Hors financement.

**Saskia Hogenhout, et Sam Mugford**, John Innes Centre, Norwich, UK : Effecteurs salivaires/interaction plante-insecte. Hors financement.

**Keith Perry**, Cornell Institute, Ithaca. Récepteurs de virus de plante chez les pucerons.

**Yvan Rahbé**, Inra, Laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Lyon: Entomologie, Peptide Array. Partenaire du projet ANR StylHook.

**Denis Tagu et Gaël Le Trionnaire**, Inra, Rennes : Mutagenèse chez le puceron (CRISPR/Cas9). Projet SPE Inra MutAphid.

**Manuella van Munster**, Inra, Montpellier : Phylogénie des protéines cuticulaires.



# Travaux de recherche

---



## Parcours scientifique

J'ai hésité à relater l'ensemble de mon parcours en recherche depuis mes débuts en tant que technicienne jusqu'à la chercheuse que je suis devenue aujourd'hui, pensant tout d'abord ne présenter que les travaux auxquels j'ai participé depuis le début de ma thèse, pour coller au mieux au schéma habituel du parcours d'un candidat à l'Habilitation à Diriger les Recherches, et ceci malgré un cheminement qu'on pourrait qualifier d'inhabituel ou de singulier. Je pense néanmoins que je suis devenue la chercheuse que je suis, épanouie dans son projet, parce que j'ai eu cette trajectoire atypique, et je me devais d'y consacrer au moins un paragraphe. J'ai débuté ma carrière dans la recherche à l'Inra avec un BTS et un statut de Technicienne de la Recherche en 1990. Après plusieurs affectations, j'ai pu faire une thèse que j'ai soutenue fin 2009, à la suite de quoi, un an plus tard, j'ai passé un concours et obtenu un poste de Chargée de Recherche pour développer un projet dans l'unité dans laquelle je suis actuellement. Chaque étape de mon évolution de carrière a été un défi, avec de nouvelles compétences à acquérir, et un changement dans mes missions. Tout ceci n'a été rendu possible que parce que j'ai eu la chance de côtoyer des chercheurs exceptionnels, qui m'ont fait partager leur connaissances et leur passion pour la science, qui m'ont confié des projets extrêmement motivants et qui m'ont fait confiance pour les mener à bien, et ce dès le début de ma carrière. Ils ont aussi su m'accompagner dans cette « transition » vers le métier de chercheuse. Les projets auxquels j'ai été associée au cours de ces années peuvent être reliés à deux thématiques majeures, la recombinaison illégitime chez les bactéries, et les mécanismes de transmission des virus de plante non-circulants par puceron.

Mes premières années dans le monde de la recherche ont débuté au sein du laboratoire de Génétique Microbienne à l'Inra de Jouy-en-Josas sous la direction de Bénédicte Michel. J'étais alors en appui pour une équipe dont la thématique principale portait sur l'étude de l'instabilité génétique qui conduisait à la recombinaison illégitime chez les bactéries, et qui s'intéressait plus particulièrement aux conséquences des pauses de réplication chez *Escherichia coli*. La transcription était connue pour affecter plusieurs processus comme la réplication, la réparation ou la recombinaison de l'ADN. Nous voulions savoir si elle pouvait être génératrice d'événements de recombinaison. Nos résultats ont montré que, insérées face aux transcrits majeurs, des unités transcriptionnelles influençaient fortement les extrémités de délétion qui ne se faisait plus de manière aléatoire mais se situait, pour 95 % des cas, en deçà du promoteur de transcription, et reliait des régions sans homologie. Un deuxième résultat important était l'apparition d'un point chaud de délétion quand un répresseur était fixé sur un opérateur. L'hypothèse pour expliquer cette répartition était que la fixation d'une protéine sur l'ADN causait probablement une pause ou un arrêt de réplication, générant de l'instabilité et des cassures double brin de l'ADN (DSBs). Les DSBs peuvent avoir des origines exogènes (radiation, agents chimiques) ou endogènes (endonucleases). Nous avons par la suite pu montrer le rôle des hélicases dans la prévention des cassures double brin de l'ADN, et démontrer le rôle central de la voie RecBCD dans la réparation d'ADN linéaire chez *E. coli*. Ces travaux ont fait l'objet des articles 1-5.

J'ai rejoint l'équipe dirigée par Stéphane Blanc en 1999 pour y exercer mes fonctions de technicienne. Cette équipe était localisée dans le laboratoire de Pathologie Comparée de St Christol-les-Alès, puis dans l'UMR BGPI à Montpellier. La thématique principale de l'équipe à ce moment là était l'étude de la transmission de virus de plante non-circulants par puceron. C'est

une thématique dans laquelle je me suis plongée avec enthousiasme, et la compréhension des mécanismes de transmission par vecteur est toujours au cœur de mes projets. J'ai au départ participé à l'ensemble des projets développés par les chercheurs ou étudiants du groupe : caractérisation du complexe transmissible du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) composé des protéines virales non structurales P2 et P3, et de la particule virale ; régulation de sa formation au sein des cellules de plante infectées ; étude du taux de recombinaison du CaMV durant l'infection de la plante hôte. Si j'ai pu leur apporter immédiatement mon soutien et mon expertise en biologie moléculaire, je devais acquérir les compétences aussi bien techniques que théoriques qui me faisaient défaut en virologie végétale, en biologie cellulaire ou bien encore en biochimie. Travailler sur tous ces aspects m'ouvrait également la possibilité d'accéder plus rapidement aux disciplines et concepts, totalement nouveaux pour moi, nécessaires au développement des recherches de l'ensemble de l'équipe. J'ai maintenu cette aide substantielle pendant quelques années tout en développant un projet propre qui m'a été confié dès 2001. J'ai ainsi été associée à plusieurs publications (articles 6, 7, 8, 10, 11, 13) au cours de la période 2001 – 2009.

Les interactions qui régissent la formation d'un complexe transmissible fonctionnel et qui conduisent au succès de la transmission du CaMV par puceron sont multiples et leur régulation probablement très sophistiquée. Pour aller plus avant dans la compréhension de ces interactions et de leur régulation, Stéphane Blanc a souhaité entreprendre l'analyse structurale du complexe transmissible, projet qu'il m'a proposé de développer en collaboration avec des collègues structuralistes, et que j'ai commencé fin 2001 dans le cadre d'un diplôme E.P.H.E. Au cours de cette période, nous avons développé plusieurs approches en parallèle pour étudier la structure des complexes P3:virus, la cristallographie tridimensionnelle (3D) et la cryo-microscopie électronique (cryo-EM). La cristallogénèse de la particule virale nue n'a malheureusement pas aboutie. En revanche, nous avons obtenu les modèles tridimensionnels (3D) du virus nu à 20 Å de résolution ou complexé à la protéine virale P3 à 25 Å de résolution. Ces modèles ont permis de confirmer l'organisation de la capsidie en trois couches concentriques, et de visualiser la protéine P3 dans ce complexe. P3 forme un réseau très régulier de digitations tout autour de la capsidie virale, s'ancre au niveau des pores entre les capsomères et pénètre à l'intérieur de la capsidie. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans mon mémoire E.P.H.E., et une partie de ces résultats sont décrits dans l'article 9.

J'ai poursuivi ces travaux au cours d'une thèse que j'ai soutenue en décembre 2009. Celle-ci était articulée autour de deux volets. Le premier, structural, a principalement consisté à obtenir la structure de la protéine virale P3 par cristallographie 3D. La structure 3D du domaine N-terminal de la protéine P3 a ainsi été résolue à 2,6 Å. Il s'agit du domaine qui est exposé en surface de la capsidie virale sous forme de dimères antiparallèles et qui interagit avec des partenaires tels que la protéine virale P2. Ces résultats ont été publiés dans l'article 15, et la structure déposée à la Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org), PDB ID 3F6N).

Le second volet, totalement nouveau visait à caractériser les récepteurs du CaMV dans les stylets de puceron. Dans ce projet, tout était à « défricher », car il n'y avait pratiquement aucune donnée disponible dans la littérature, que ce soit au niveau de récepteurs de virus, aucun n'ayant encore été caractérisé chez les insectes vecteurs, ou que ce soit au niveau de la composition des pièces buccales de puceron très peu documentée. C'était à la fois extrêmement motivant, mais aussi parfois un peu déroutant. Bref, un bon défi à relever. Au début du programme, j'ai d'abord recherché un dispositif expérimental qui me permettrait de visualiser et de caractériser les interactions virus/stylets. Après quelques mois de tâtonnements, j'ai pu mettre en place un protocole d'interaction *in vitro* entre des stylets de puceron disséqués et la protéine virale P2 responsable de la reconnaissance CaMV/récepteur. Le développement de cet outil a été l'élément déterminant pour la réussite du projet. C'est un dispositif peu coûteux financièrement, mais extrêmement chronophage, puisque la cadence de dissection est d'environ 10 pucerons à

l'heure, et que les travaux que je vous présenterais par la suite ont nécessité la dissection de quelques dizaines de milliers de pucerons. Il a cependant permis des avancées considérables dans cette thématique, n'a pas été supplanté par de nouvelles technologies, et est toujours beaucoup utilisé dans l'équipe, notamment par les étudiants, post-doctorants, ou techniciens que j'ai formés et qui ont brillamment et patiemment pris le relai des expérimentations. Au cours de la thèse, j'ai pu montrer que les récepteurs du CaMV étaient des protéines cuticulaires non glycosylées localisées à l'extrémité distale des stylets maxillaires de puceron sur un organe que nous avons découvert en étudiant l'ultrastructure des stylets et que nous avons appelé acrostyle. Nous avons montré que l'acrostyle contenait des protéines cuticulaires de la famille des CPR, mais nous n'avons pas encore pu identifier le récepteur du CaMV. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à plusieurs publications (articles 12, 14; articles de synthèse 16-18; chapitre d'ouvrage 28; mémoire de thèse).

C'est après avoir réussi un concours externe à l'Inra en décembre 2010, que j'ai été recrutée à Montpellier pour développer un projet de recherche visant à identifier les récepteurs du CaMV, à élargir ces recherches aux récepteurs d'autres virus non-circulants transmis par puceron, tels les Potyvirus et Cucumovirus impliqués dans de nombreuses épidémies virales, et à caractériser l'organe qui porte ces récepteurs – l'acrostyle – d'un point de vue biochimique et fonctionnel. Des financements conséquents ont été successivement obtenus, soit par moi directement (région LR, département SPE Inra, ANR), soit par Stéphane Blanc (Fondation Gates). J'ai alors fédéré et coordonné un consortium pluridisciplinaire de 6 équipes complémentaires (25 personnes) autour d'un « objet » commun, l'acrostyle. C'était une nouvelle étape dans ma carrière, avec un changement de mes missions. Les objectifs fixés étaient ambitieux et sur une fenêtre de temps très courte, 2 ans pour le programme financé par la fondation Gates par exemple. Coordonner ces programmes a été évidemment une période de stress intense, mais tellement stimulante ! Ensemble, nous avons développé de nombreuses approches et obtenu plusieurs résultats remarquables, comme l'identification des premières protéines dans les stylets, parmi lesquelles Stylin-01 potentiellement récepteur du CaMV, le transcriptome des glandes spécialisées dans la synthèse des stylets, l'analyse comparative des protéomes de différentes structures cuticulaires (pattes, ailes, antennes, stylets) ainsi que le tout premier répertoire des protéines de l'acrostyle et des peptides directement accessibles en surface de l'organe. Certains de ces résultats ont déjà été publiés (articles 20, 21, 24, 25, 27; article de synthèse 26). D'autres sont en cours d'écriture, ou nécessitent encore des expériences complémentaires.

C'est tout logiquement dans la poursuite de ce travail de longue haleine que se construit mon projet actuel et celui dans lequel je veux m'investir au cours des prochaines années. J'ai bâti un socle solide de connaissances et de collaborations, et j'ai développé de nombreuses approches dont certaines commencent juste à produire leurs fruits maintenant. Je pense qu'il y a encore beaucoup à faire sur le sujet, notamment pour caractériser le rôle de Stylin-01 dans la transmission de virus non-circulants, ainsi que ses autres propriétés et fonctions. Nous avons la chance d'avoir pu faire partie du programme « MutAphid » pour le développement de méthodes innovantes pour la validation fonctionnelle chez le puceron et nous avons ainsi bénéficié de l'expertise de nos collaborateurs rennais pour générer les premiers pucerons KO Stylin-01. Leurs phénotypes sont en cours de caractérisation au laboratoire. Un effort tout particulier a déjà été fourni depuis le démarrage du programme en 2006 pour identifier les récepteurs des Potyvirus et Cucumovirus, mais nous avons jusqu'à présent essuyé beaucoup d'échecs malgré les investissements financiers et humains que nous avons déployés. Les derniers développements et résultats sur le programme nous permettent cependant d'être plus optimistes sur l'avenir. Nous disposons d'un listing restreint de candidats potentiels, nous bénéficions des connaissances accumulées avec le modèle CaMV et l'utilisation d'approches innovantes devrait permettre de lever des verrous et d'avancer dans la caractérisation des récepteurs de virus d'intérêt

agronomique. Il y a aussi encore beaucoup à faire pour caractériser les fonctions de l'acrostyle en dehors de la transmission virale. Parmi les autres résultats importants, nous montrons que l'acrostyle interagit avec un effecteur contenu dans la salive de pucerons. Cet organe pourrait donc aussi être impliqué dans l'alimentation du puceron et de manière plus large avoir un rôle dans les interactions plante-puceron qui conduisent à l'installation temporaire ou durable de l'insecte sur une plante. Il apparaît maintenant judicieux de s'appuyer sur toutes ces nouvelles données pour commencer à développer des approches, des outils qui permettraient de bloquer ou perturber l'interface acrostyle ou au moins de limiter l'accrochage des virus ou d'interférer avec ces fonctions intrinsèques.

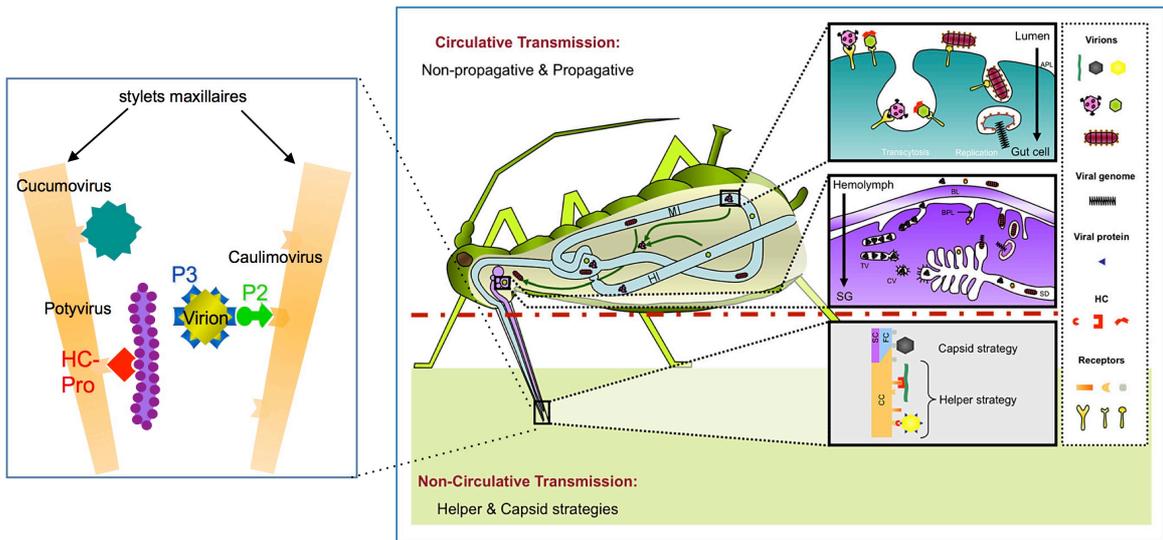
## Contexte de l'étude

Les virus de plantes nécessitent quasiment tous l'intervention d'un vecteur pour assurer leur passage obligatoire d'un hôte à un autre, et leur maintien dans l'environnement. Cette étape de transmission est assurée la plupart du temps par des insectes « piqueurs-suceurs » qui se nourrissent de la sève des végétaux, parmi lesquels les pucerons occupent une place prépondérante. Plus de 5000 espèces de pucerons sont actuellement recensées. Ces insectes possèdent des caractéristiques qui peuvent sans doute expliquer pourquoi ils occupent la première place dans la vection de phytovirus: ils sont capables de se nourrir sur la quasi-totalité des plantes cultivées dans le monde ; ils ont un développement très rapide en raison de leur mode de reproduction qui alterne entre parthénogenèse et reproduction sexuée ; ils ont une grande capacité de dispersion liée à leur plasticité phénotypique et peuvent notamment produire des formes ailées pour couvrir de longues distances vers de nouveaux hôtes en réponse à l'état de la plante, la surpopulation ou bien encore à des stress environnementaux (Tagu et al., 2008); ils ont des pièces buccales particulièrement adaptées et ont un comportement alimentaire très singulier car ils « goutent » les plantes sur lesquelles ils sont, qu'elles soient hôtes ou non-hôtes, en faisant des piqûres d'essais qui sont de brèves ponctions intracellulaires dans les cellules de l'épiderme ou du mésophylle. Ils savent aussi en quelques secondes seulement si la plante est à leur goût ou pas, en d'autres termes s'ils s'installent de manière durable, ou s'ils doivent partir et poursuivre leur recherche de nourriture ailleurs. Dans ce laps de temps très court, ils sont capables d'acquérir certains virus qui infectent tous les tissus de la plante, et sont également capables de les inoculer en quelques secondes, de manière très efficace (Ferreris and Moreno, 2009). Ces virus sont les virus dits non-circulants, car ils sont retenus au niveau des pièces buccales de l'insecte et ne doivent pas, contrairement aux virus circulants, effectuer de passage à l'intérieur du corps de l'insecte pour être de nouveau inoculés (Fig. 1). C'est probablement ce qui en fait les leaders incontestés en matière de transmission de virus non-circulants, responsables à eux-seuls de la transmission de près de 85% des virus non-circulants décrits actuellement (Hogenhout et al., 2008).

La lutte chimique a longtemps été le moyen de lutte principal pour protéger les cultures. Elle est encore utilisée à l'heure actuelle, malgré les effets nocifs sur l'environnement et la santé humaine. Cependant, ce moyen n'est pas toujours efficace pour limiter la propagation des épidémies virales. Et on comprend bien que ce ne soit par exemple pas du tout adapté pour lutter contre la transmission des virus non-circulants qui seront acquis et transmis en un temps bien inférieur à celui nécessaire à l'action des pesticides. Les finalités des travaux auxquels j'ai été associée depuis mon arrivée dans l'équipe de Stéphane Blanc s'inscrivent totalement dans ce contexte de transition vers des méthodes de lutte alternatives plus spécifiques, plus efficaces, moins nocives pour l'environnement. Ils sont à l'interface virus/puceron et proposent de caractériser très finement les interactions entre partenaires viraux et récepteurs dans les pièces buccales chez l'insecte vecteur. On peut également considérer qu'ils se situent à l'interface d'objectifs fondamentaux car ils ont vocation à produire de connaissances génériques en virologie végétale et en entomologie, et d'objectifs appliqués à moyen terme s'ils conduisent à développer de nouveaux outils pour limiter spécifiquement les interactions virus-vecteurs.

Caulimovirus, Potyvirus et Cucumovirus sont les trois genres viraux principaux transmis selon le mode non-circulant. Ces virus interagissent avec les récepteurs dans l'insecte soit via la capsid

virale (Cucumovirus), soit par l'intermédiaire d'une protéine virale appelée protéine « helper » qui crée un lien moléculaire entre la particule virale et le récepteur (Potyvirus et Caulimovirus) (Fig. 1). J'utilise principalement le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) dans mes travaux pour caractériser les mécanismes moléculaires de la transmission par puceron. Ce n'est pas un virus inquiétant d'un point de vue purement agronomique, il présente cependant un intérêt fondamental majeur, car il est un modèle d'étude incontournable chez les virus de plante. Il est étudié depuis longtemps dans l'équipe de Stéphane Blanc. C'est le modèle d'étude avec lequel j'ai développé toutes les approches pour caractériser les récepteurs de virus non-circulants.



**Figure 1. Schématisation de la transmission circulante et non-circulante par puceron.**

Dans la transmission non-circulante, les virus sont retenus dans les stylets via la capsid virale (stratégie capsidique comme c'est le cas pour les Cucumovirus), soit via une protéine codée par le virus, la protéine helper HC-Pro pour les Potyvirus ou P2 pour le *Cauliflower mosaic virus* (stratégie helper).

# Chapitre 1 – Etude structurale du complexe transmissible du *Cauliflower mosaic virus*

L'étude structurale du complexe transmissible du CaMV et de chacun de ses composants est un projet qui a été entrepris dans l'équipe depuis quelques années, et ceci en **collaboration** avec **Christian Dumas** (CBS, Montpellier) et l'équipe de **Patrick Bron** (CBS, Montpellier). Elle a nécessité et nécessite toujours des efforts soutenus car au-delà de la compréhension fine des interactions des partenaires du complexe, les enjeux sont de définir les domaines ou les acides aminés directement responsables de l'interaction avec le récepteur chez l'insecte, ou qui, indirectement, pourraient être en partie responsable de la conformation qu'adopte la protéine helper P2 quand elle interagit avec son récepteur. De telles données permettraient d'envisager le développement de molécules compétitrices visant à bloquer de manière spécifique les interactions virus-puceron pour limiter au maximum la transmission des virus. Cette étude se heurte cependant à des problèmes techniques récurrents liés aux propriétés des protéines et des complexes que nous étudions, difficultés rencontrées à toutes les étapes du processus, et que nous avons malgré tout pour certaines surmontées.

## Le complexe transmissible du CaMV

---

Le CaMV est un virus à symétrie icosaédrique de 50 nm de diamètre, de la famille des *Caulimoviridae*, genre *Caulimovirus*, qui infecte principalement les *Brassicaceae* et les *Solanaceae*. Il possède un génome à ADN double brin d'environ 8 kb répliqué à partir d'un ARN de taille génomique par une étape de transcription inverse (Guilley et al., 1983 ; Hull and Covey, 1983 ; Pfeiffer and Hohn, 1983) qui comporte 8 cadres de lecture ouverts. Seulement 6 protéines ont jusque là été retrouvées en plante, parmi lesquelles la protéine structurale P4 qui code pour la protéine de capsid, et les protéines non structurales P2 et P3, toutes trois impliquées dans le complexe dit « transmissible » P2:P3:virus. La protéine virale P2 joue le rôle de helper et peut-être acquise séparément (Blanc et al., 1993a). Par contre la formation du complexe P3:virus est un prérequis au succès de la transmission par puceron (Drucker et al., 2002).

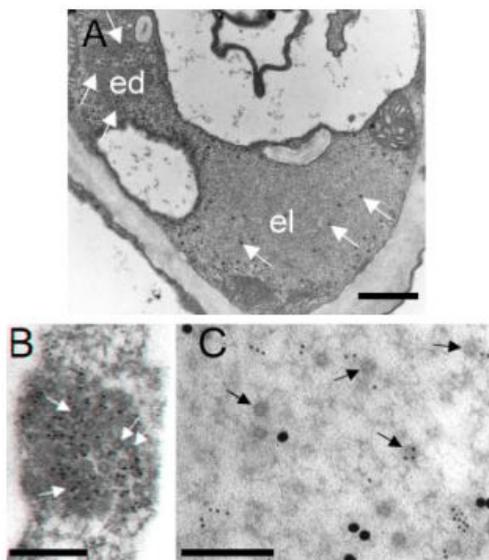
P2 est une protéine de 159 acides aminés, qui est globalement basique. Les prédictions de structure secondaire montrent une organisation en deux domaines distincts séparés par une région repliée au hasard, un domaine N-terminal plutôt replié en feuillets  $\beta$  et une région C-terminale structurée en deux hélices  $\alpha$  (Modjtahedi et al., 1985) qui sont impliquées dans l'oligomérisation de la protéine (Hebrard et al., 2001). P2 a d'autres propriétés comme la propension à s'auto-assembler en structures paracrystallines (Blanc et al., 1993b ; Hebrard et al., 2001) ou à interagir avec les microtubules des cellules d'insectes dans lesquelles la protéine est produite au laboratoire (Blanc et al., 1996).

P3 est une protéine de 129 AA qui posséderait deux domaines fonctionnels. La région C-terminale contient un motif riche en lysine et proline, connu pour interagir avec les acides nucléiques. Le domaine N-terminal est prédit en hélice  $\alpha$  susceptible de former des coiled-coils, et les 33 acides aminés N-terminaux sont impliqués dans l'oligomérisation de la protéine en tétramère (Stavolone et al., 2001).

La protéine de capsid P4 est produite sous forme d'un précurseur de 57 kDa qui subit plusieurs clivages en N- et C-terminus pour donner des produits de 37 à 44 kDa (Mesnard et al., 1993). La

proportion relative de ces différents produits de clivage est très variable d'une purification virale à une autre. La protéine P4 a un motif de liaison à l'ADN. Un modèle 3D de la particule virale du CaMV à basse résolution avait été construit à partir d'expériences de diffusion de neutron et d'images de cryo-EM. Ce modèle montrait que la capside avait une symétrie de type T=7, et qu'elle était organisée en trois couches concentriques (Cheng et al., 1992).

La formation de ce complexe fait appel à des mécanismes précis. Des travaux antérieurs ont montré que la protéine virale P2 était exclusivement retrouvée au niveau d'une structure appelée « corps à transmission » quasiment dépourvue des complexes P3:virus qui eux sont concentrés au niveau des usines virales (Drucker et al., 2002) (Fig.2). Au cours de ces 15 dernières années, Martin Drucker et son équipe ont démontré que la piqûre du puceron induisait un changement drastique de localisation des éléments de complexes qui se retrouvaient très vite redistribués sur le réseau de microtubules corticaux, optimisant ainsi les chances d'être prélevés par le au cours des brèves ponctions intracellulaires (Martiniere et al., 2013; Martinière et al., 2009 ). Les interactions entre les différents partenaires du complexe sont multiples, et les mêmes zones des protéines P2 et P3 sont impliquées dans l'auto-assemblage des protéines en oligomères P2:P2 ou P3:P3, mais également dans les interactions entre protéines hétérologues P2:P3. Par ailleurs P3 interagit aussi avec la protéine de mouvement P1 (Stavolone et al., 2005). Cette protéine est donc impliquée à la fois dans des interactions avec la protéine P2, ce qui favorise la migration longue distance inter hôte par puceron, et dans des interactions avec la protéine de mouvement P1, ce qui oriente le virus vers une migration plus proximale au sein du même hôte. Tout cela suggère que P3 pourrait jouer un rôle central dans le cycle du virus. Le fait que les mêmes domaines protéiques soient impliqués dans différentes interactions suggère l'existence d'un mécanisme de régulation qui pourrait contrôler à la fois où et quand P2 et P3 interagissent pour former le complexe transmissible absorbé par le puceron.



**Figure 2. Répartition des composés du complexe transmissible à l'intérieur d'une cellule de mésophylle d'un navet infecté par le CaMV.**

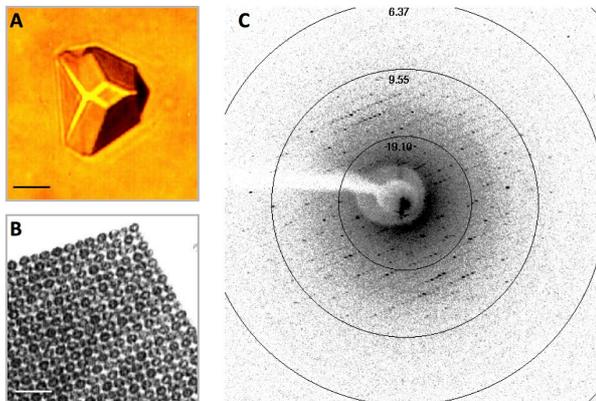
Vue générale de la cellule infectée. Usines virales (ed), corps à transmission (el). Double marquage avec des usines virales (B), et des corps à transmission (C) avec anti P3 (billes de 10 nm) et anti-P2 (billes de 30 nm). Les particules virales sont retrouvées dans les deux compartiments, mais en grande majorité dans les usines virales. La protéine P2 est retrouvée exclusivement dans le corps à transmission. La protéine P3 est retrouvée dans les deux compartiments.

Comme dans toute étude structurale, le premier facteur limitant dans la détermination de la structure 3D à haute résolution d'un objet biologique est l'objet étudié lui-même. Concentration et pureté sont deux critères auxquels la qualité de la purification doit répondre. Mon rôle dans ce projet a été de mettre au point les conditions optimales de purification et de production des protéines et des particules virales, de trouver les conditions pour reconstituer les complexes, et de produire des données biochimiques et biologiques nécessaires à l'interprétation des modèles structuraux. J'ai aussi participé activement à la cristallogénèse de la particule virale à une

époque (pas si lointaine) où le criblage des conditions de cristallisation et l'observation de l'apparition des cristaux n'étaient pas encore automatisés.

## Etude structurale de la particule virale

Au cours de mon diplôme EPHE, nous avons évalué la faisabilité de l'approche cristallographie 3D sur les particules virales purifiées. Les essais de cristallogenèse de la particule virale paraissaient au départ très prometteurs. Nous avons défini un nouveau protocole de purification qui permettait d'éliminer la protéine P3 en surface des particules virales et d'obtenir des solutions virales qui répondaient aux critères de pureté et de concentration requis pour cette approche. Nous avons réussi à obtenir des conditions dans lesquelles nous obtenions des cristaux de taille suffisante pour être utilisés pour la collecte de données (de 100 à 250  $\mu\text{m}$  de long, exemple montré Fig. 3A). L'obtention d'un premier cliché de diffraction à 7  $\text{\AA}$  de résolution restera un moment mémorable (Fig. 3C). Malheureusement, un tel cliché n'a pu être obtenu qu'une seule fois, la plupart des cristaux diffractant mal les rayons X. Nous avons tout de même obtenu quelques cristaux et quelques clichés diffractant les rayons X aux alentours de 15  $\text{\AA}$  de résolution. Ils nous ont appris que l'agencement des particules virales à l'intérieur des cristaux était tel qu'il faudrait acquérir des centaines de clichés pour obtenir les coordonnées atomiques de la capsid virale entière. Cette particularité, ajoutée à la difficulté d'obtenir des cristaux de taille suffisante qui diffractent les rayons X, et à l'impossibilité d'acquérir plusieurs clichés à partir d'un même cristal nous laissent envisager la résolution de la structure 3D du CaMV aux environs de 2100, ce qui ne semblait assurément pas raisonnable... Nous avons donc abandonné cette approche pour la particule virale.

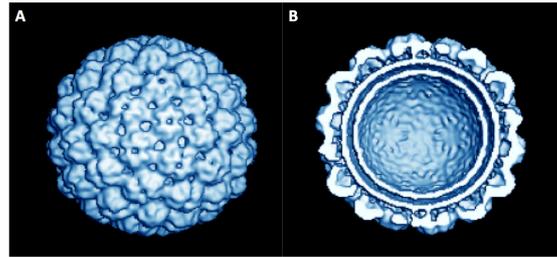


**Figure 3. Cristallogenèse de la particule virale du CaMV.**

(A) Cristaux obtenus avec une solution purifiée de CaMV. La barre d'échelle représente 25  $\mu\text{m}$ . (B) Coupe d'un cristal de CaMV observé en coloration négative. La barre d'échelle représente 250 nm. (C) Cliché de diffraction d'un cristal de CaMV obtenu sur la ligne FIP avec photodétecteur MarResearch, E.S.R.F. Grenoble. Les anneaux concentriques indiquent les résolutions. Nous voyons ici des taches sombres, significatives, aux alentours de 7  $\text{\AA}$  de résolution.

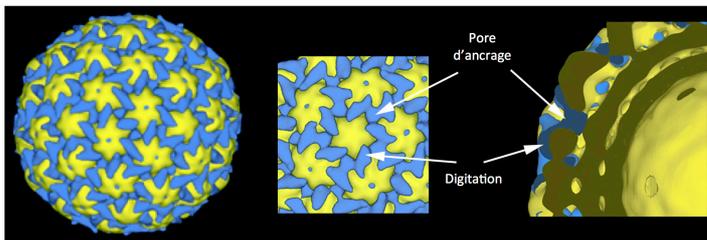
Ces premiers écueils nous ont amené à nous tourner vers l'étude structurale de la particule virale par cryo-EM, les virus étant purifiés selon le protocole défini précédemment. Les données acquises ont permis de reconstruire un modèle 3D de la particule virale du CaMV à 20  $\text{\AA}$  de résolution (Fig. 4A). Nos données ont confirmé le modèle obtenu en 1992 (Cheng et al., 1992). La particule virale a un diamètre de 520  $\text{\AA}$ , avec une symétrie icosaédrique  $T = 7$ . De plus la capsid présente 3 couches concentriques autour d'une cavité remplie de solvant (Fig. 4B). La résolution cependant était encore trop faible pour avoir plus de détails comme les acides aminés en surface de la capsid par exemple. En comparaison des données déjà disponibles dans la littérature ce gain pouvait donc paraître minime. Il était cependant suffisant pour espérer visualiser P3 à la surface des virions, c'est donc fort de ce constat que nous nous sommes lancés dans la reconstitution des complexes P3:virus et de leur analyse structurale.

**Figure 4. Reconstruction 3D du CaMV à partir d'images obtenues en cryo-EM.**  
 (A) Représentation de la particule virale entière à 20 Å de résolution.  
 (B) Particule virale vue en coupe.



## Etude structurale des complexes P3:virus

Pour reconstituer les complexes P3:virus, j'ai tout d'abord déterminé les conditions de saturation de la capsid avec la protéine virale, afin d'acquérir des images qui soient le plus homogènes possible. J'ai alors reconstitué les complexes P3:virus *in vitro* et un nouveau jeu de données a été collecté. Celui-ci a permis de reconstruire un modèle 3D du complexe à 26 Å de résolution, sur lequel apparaissent clairement des densités supplémentaires. La comparaison des cartes de densité électronique des particules virales nues ou décorées de P3 montrent que la protéine P3 forme un réseau très régulier de digitations tout autour de la capsid, s'ancre au niveau des pores entre les capsomères et pénètre à l'intérieur de la capsid (Fig. 5).



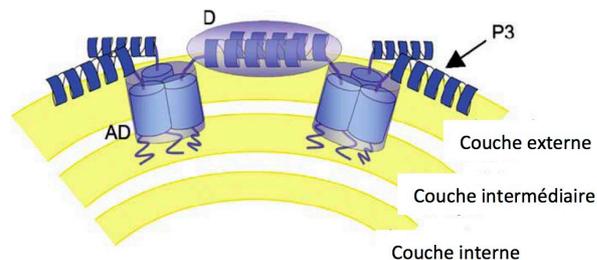
**Figure 5. Modèle 3D des complexes P3:virus.**

Les densités supplémentaires sont représentées en bleu. Au centre, visualisation d'un pentamère entouré d'hexamères. A droite, vue en coupe. Les digitations en surface et pores d'ancrage sont indiqués.

Nos données biochimiques montraient par ailleurs que seul le domaine N-terminal de la protéine P3 était accessible sur les complexes P3:virus. Nous avons déduit une stœchiométrie P3:protéine de capsid établie à 1:1, et nous avons proposé le modèle d'interaction P3:virus présenté ci-après (Fig. 6): 3 molécules de P3 pénétreraient la capsid au niveau de pôles d'ancrage. Les domaines C-terminaux seraient enfouis à l'intérieur de la capsid, et pourraient ainsi interagir avec l'ADN situé au niveau des couches médiane et interne de la capsid virale. Deux domaines N-terminaux de P3 se retrouveraient en surface dans chaque digitation.

**Figure 6. Modèle d'organisation de la protéine P3 dans la capsid virale.**

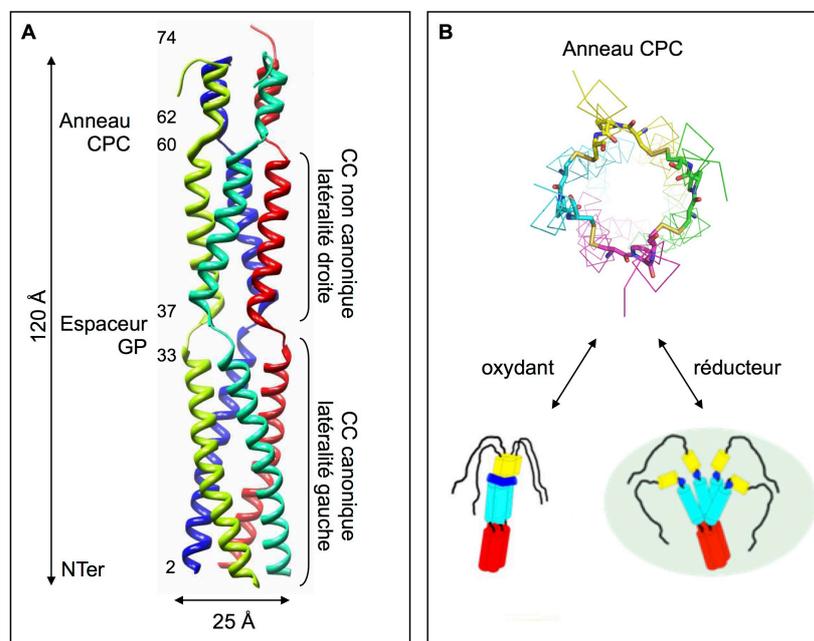
P3 forme des dimères en surface de la capsid (D). 3 molécules de P3 pénètrent la capsid au niveau des pores d'ancrage et traversent les couches externe et intermédiaire.



Cette organisation, qui favoriserait les échanges avec différents partenaires viraux (comme avec la protéine P2 du CaMV) ou cellulaires, est complètement différente de celle de la protéine P3 seule en solution qui forme des tétramères parallèles (Leclerc et al., 1998). Plusieurs conformations de cette protéine P3 existent donc. La résolution de la structure de la protéine P3 était donc indispensable pour valider le modèle de ce complexe P3:virus. Ce projet a été développé au cours de ma thèse.

## Etude structurale de la protéine P3

Nous avons commencé la cristallogénèse de cette protéine au cours de ma thèse. L'obtention de cristaux de qualité satisfaisante diffractant les rayons X a nécessité beaucoup de mises au point, tant au niveau de la purification de la protéine, qu'à l'étape de cristallisation. C'est finalement l'addition d'un oligonucléotide de 14 paires de base dans le tampon de cristallisation qui a été déterminant et a permis d'obtenir des cristaux avec un fort pouvoir diffractant. L'analyse des clichés de diffraction a permis d'établir la structure 3D du domaine N-terminal de la protéine (AA 2-74) à 2,6 Å de résolution. C'est le domaine exposé en surface de la capsid virale et qui interagit avec la protéine virale P2 dans le complexe transmissible. Les AA C-terminaux (75-129) sont eux absents de cette reconstruction. Ils sont soit désordonnés, soit absents du cristal suite à une protéolyse partielle. La protéine P3 a cristallisé en un faisceau d'hélices à quatre brins parallèles. La structure présente un enchaînement de 2 coiled-coils (CC) de latéralité opposée (Fig. 7A, et 7B en rouge et bleu clair). Les domaines N-terminaux de la protéine P3 s'organise sous forme de dimères antiparallèles à la surface de la particule virale (Fig. 8).

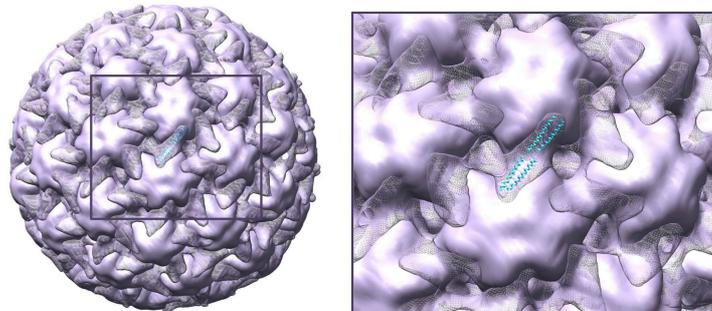


**Figure 7. Structure des 74 acides aminés N-terminaux de la protéine P3 du CaMV..**

P3 cristallise sous forme de tétramère parallèle (A) et 3 sous-domaines : un premier coiled-coil (CC) canonique de latéralité gauche (rouge en B), suivi d'un second CC de latéralité droite moins stable (bleu clair en B), et une petite hélice (jaune en B). Ces sous-domaines sont séparés par GP linker et un motif CPC (carrés bleu foncé en B), possible senseur redox, formant un anneau de ponts disulfures inter-chaînes en conditions oxydantes.

La grande singularité de cette structure réside probablement dans le motif CPC (Fig. 7B, carrés bleu foncé) qui est susceptible de former quatre ponts disulfures inter-chaînes selon l'état redox du milieu ambiant. En conditions oxydantes, cet anneau de cystéines verrouillerait littéralement le second CC (Fig. 7B, en bleu clair), et maintiendrait les molécules de P3 sous forme d'un faisceau tétramérique cylindrique très stable masquant l'accès de l'interface accessible aux solvants et partenaires éventuels. Un environnement réducteur déstabiliserait potentiellement l'association des 4 chaînes au niveau du second CC, ce qui favoriserait les interactions avec d'autres molécules. Nous avons ainsi proposé que la protéine P3 interagirait dans le corps à transmission sous forme réduite. Lors des piqûres d'essai des pucerons, P3 pourrait réagir aux signaux de stress émis par la plante et changer de conformation, passant à l'état oxydé qui est incompatible avec toute interaction, et par là-même libérant P2 qui pourrait se relocaliser sur les microtubules.

Cette hypothèse avait été testée par Manuella van Munster dans l'équipe. Elle avait construit des virus avec un motif CPC muté, l'attendue étant une diminution de la redistribution de P2, et donc une diminution de la transmission des virus par puceron. Cela n'a pas été observé, et l'hypothèse de P3 comme senseur-redox n'a jamais été validée.



**Figure 8. Organisation de P3 sous forme de dimère antiparallèle à la surface de la capsid virale**

---

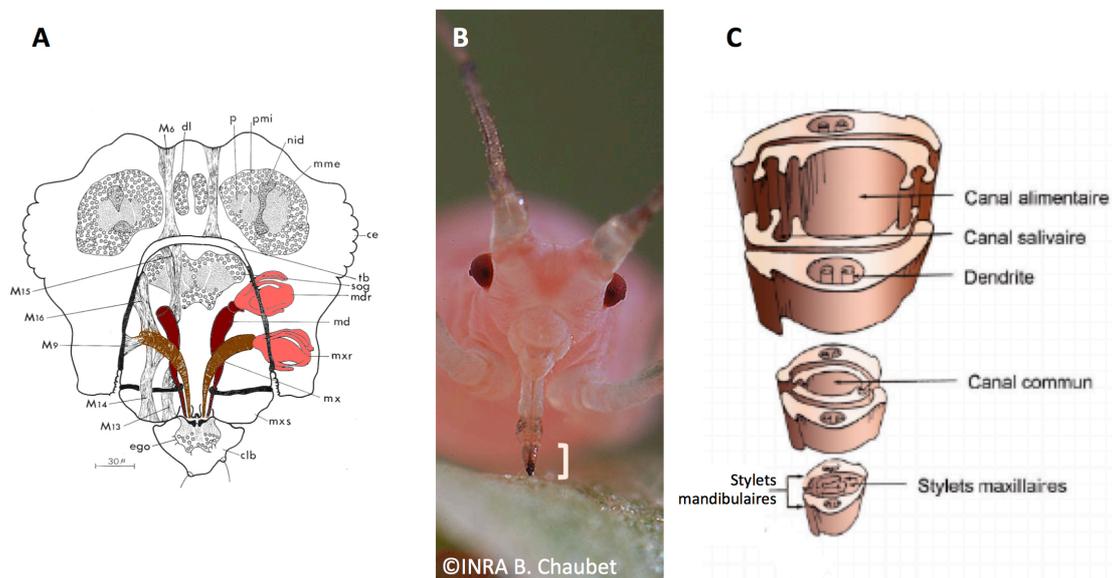
Ces travaux sont présentés dans mon mémoire E.P.H.E. et mon mémoire de thèse. Ils figurent dans 3 articles, et deux articles de synthèse:

- Drucker M, et al. (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2422-2427.
- Plisson C, Uzest M, et al. (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 346, 267-77.
- Hoh F, Uzest M, et al. (2010). Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. *J Virol* 84, 4706-13.
- Braut V, et al. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333, 524-38.
- Uzest M, Drucker M, Blanc S. (2011). La transmission d'un complexe : pas si simple. Cas du virus de la mosaïque du chou-fleur. *Virologie* 15 (3), 192-204.

## Chapitre 2 – Découverte de l'acrostyle, caractérisation de sa composition protéique et détermination du listing de candidats récepteurs

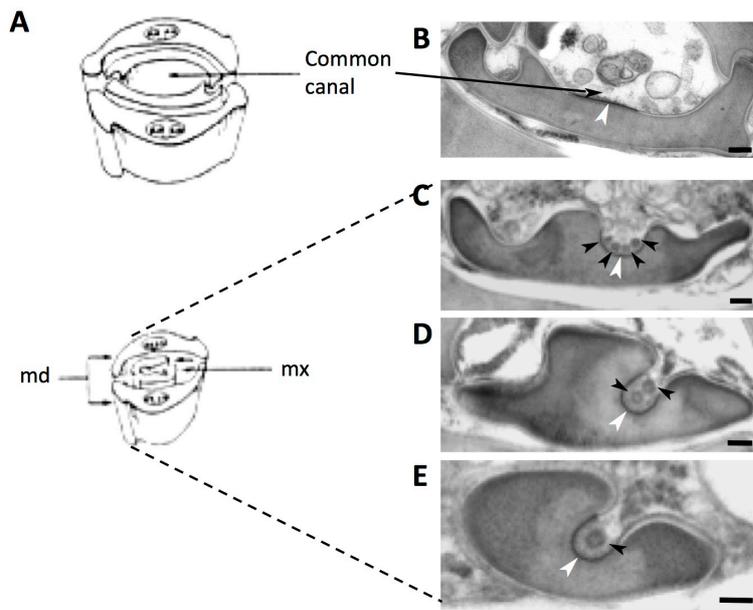
### Contexte de l'étude

Très peu de données étaient établies côté vecteur lorsque j'ai démarré ma thèse en 2006, aucun récepteur n'ayant été caractérisé ou identifié. *A fortiori*, ni la nature chimique, ni la localisation précise d'aucun récepteur n'avaient encore été déterminées. Il existe par contre de très belles planches décrivant l'anatomie des stylets, et des glandes appelées « retort » qui synthétisent les stylets à chaque mue (Ponsen, 1972) (Fig. 9A). Les stylets sont quatre longues aiguilles de chitine. Deux stylets mandibulaires externes entourent deux stylets maxillaires internes. Les stylets maxillaires sont asymétriques. Ils sont coaptés sur la quasi-totalité de leur longueur et leur architecture très particulière définit un grand canal (alimentaire) et un petit canal (salivaire) qui se rejoignent à l'extrémité distale en un seul canal commun (Fig. 9C), une zone qui mesure environ 5  $\mu\text{m}$  de long chez *Acyrtosiphon pisum* soit moins de 1% de la longueur totale des stylets chez l'adulte. C'est dans ce canal commun, que les récepteurs étaient supposés être localisés car ces virus étant relargués par la salivation, leurs sites de rétention devaient être localisés sur le trajet de la salive lorsqu'elle est éjectée par le puceron (Martin et al., 1997 ; Moreno-Lozano et al., 2005; Powell, 2005 ).



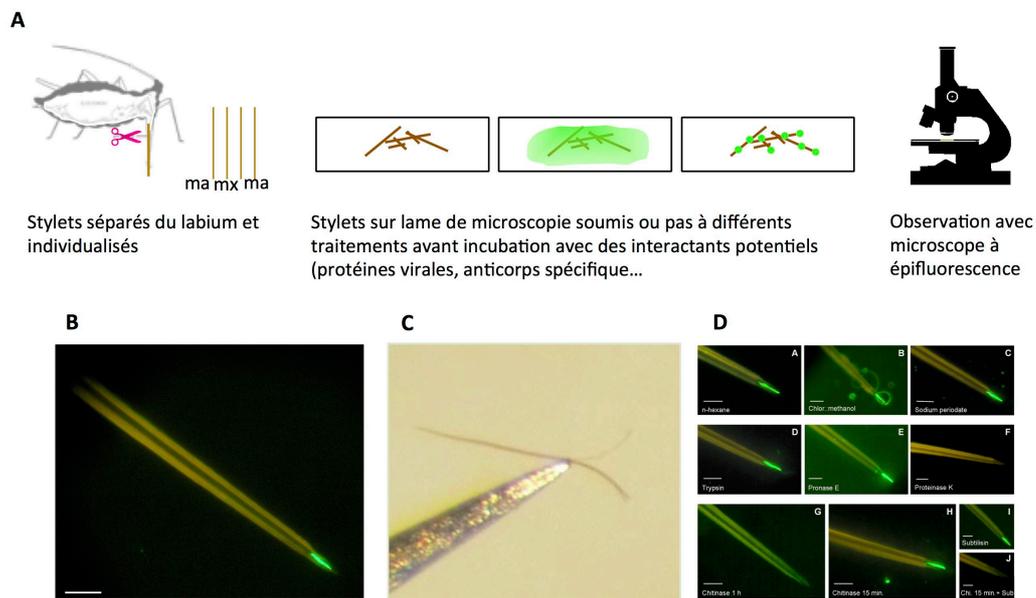
**Figure 9. Schématisation du faisceau de stylets et glandes retortiformes.**

(A) 2 stylets mandibulaires et 2 stylets maxillaires (marron et bordeaux, respectivement) sont synthétisés à chaque mue par les glandes retortiformes (rose). D'après Ponsen, 1972. (B) Tête de *A. pisum*. Le crochet montre la zone du faisceau de stylet schématisé en C. (C) Schématisation du faisceau de stylets du puceron. Les stylets maxillaires internes renferment les canaux alimentaire et salivaire. Ces canaux fusionnent à la pointe des stylets en un seul canal commun, zone dans laquelle les récepteurs de virus non-circulants étaient supposés être localisés. D'après (Taylor and Robertson, 1974).



**Figure 10. Visualisation du CaMV dans les stylets de puceron.**

(A) Schématisation de la zone où sont retrouvés les virus. (B-E) Visualisation d'un stylet maxillaire sur les sections transversales. Des particules virales (têtes de flèche noires) sont observées dans le canal commun au niveau d'une zone distincte dense aux électrons à la surface des stylets (tête de flèche blanche).  
Barre d'échelle : 200 nm.



**Figure 11. Tests d'interaction *in vitro* sur stylets disséqués et individualisés.**

(A) Schématisation du protocole d'interactions sur stylets disséqués. (B) Visualisation d'un stylet maxillaire de *A. pisum* incubé avec la protéine P2 du CaMV fusionnée à la GFP en microscopie à épifluorescence. La protéine virale est exclusivement retenue au niveau du canal commun. (C) Faisceau de stylets entier sur une minutie. Les 4 stylets n'ont pas encore été séparés. (D) Différents traitements ont été appliqués avant incubation des stylets avec P2-GFP. Certains agissent sur le récepteur. La protéine virale ne peut plus s'accrocher. Barre de mesure : 5 μm.

En dehors de ces données, les seules informations sur la composition des stylets étaient qu'ils contenaient des fibres de chitine et probablement des protéines cuticulaires, des lipides et des cires. Aucune information sur l'identité de ces protéines n'était connue. La difficulté de travailler avec les pièces buccales d'insectes piqueur-suceurs, ou celle d'extraire les composants de la cuticule expliquait sans doute l'absence de données sur le sujet.

## Pucerons utilisés

---

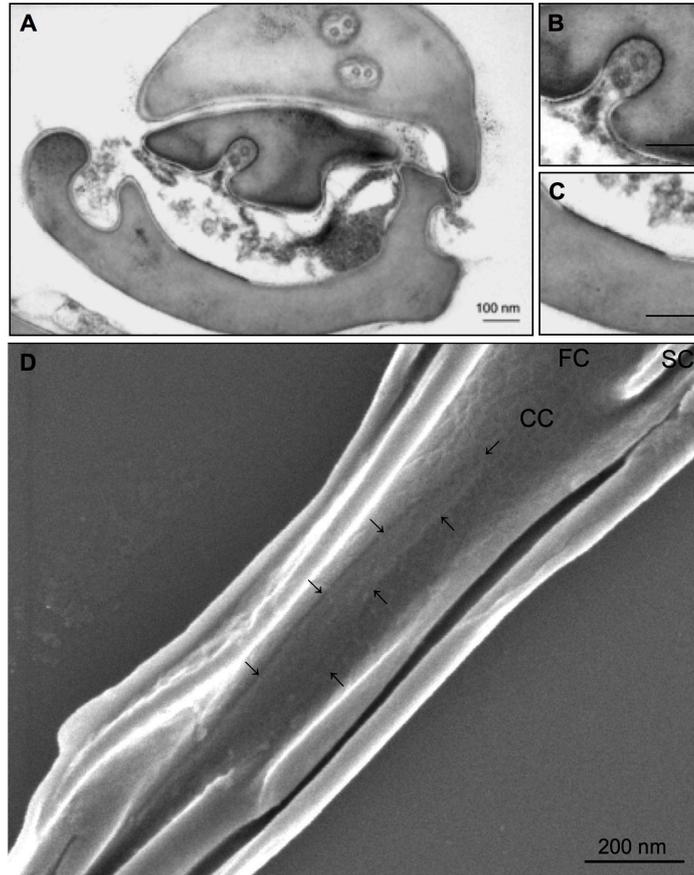
Nous élevons au laboratoire plusieurs espèces de pucerons vectrices du CaMV. Nous utilisons l'une ou l'autre de ces espèces en fonction des questions de recherche ou des expériences à réaliser. Chacune a des caractéristiques particulières. Ainsi l'espèce *Myzus persicae* est très utilisée pour les tests de transmission de virus car elle est polyphage, et peut donc s'alimenter sur de nombreuses plantes différentes. *M. persicae* est aussi connu pour être bon vecteur d'un grand nombre de virus, il est facilement manipulable, et dès qu'on le met sur une plante, il va vouloir s'alimenter très vite. Sa petite taille le fait par contre passer au second plan lorsqu'il s'agit d'expérience de dissection, et nous lui préférons de loin l'espèce *A. pisum*, avec des individus beaucoup plus gros. *A. pisum* est quant à lui un petit insecte un peu « caractériel », avec un régime alimentaire très spécialisé, et qui est particulièrement sensible à toute forme de stress. A manipuler donc avec la plus grande douceur si on veut travailler avec des pucerons vivants. *Brevycoryne brassicae*, connue pour retenir plus longtemps le virus dans les stylets (Moreno-Lozano et al., 2005), sera privilégiée dans les expériences de microscopie électronique à transmission (MET) pour visualiser des particules virales dans les stylets

## Localisation des récepteurs du CaMV dans les stylets de puceron

---

J'ai bénéficié de l'expertise de **Daniel Gargani**, microscopiste dans notre équipe, pour la recherche du CaMV dans les stylets du puceron par MET. Nous avons nourri des pucerons sur des navets infectés par le CaMV. Nous avons pu visualiser des particules virales principalement au niveau de l'extrémité distale des maxillaires dans une zone où le canal commun forme une gouttière très étroite qui ne peut abriter qu'une seule particule virale, comme nous pouvons le voir sur la figure 10. Des particules virales ont été aussi observées dans la zone élargie du canal commun. Par contre, nous n'en avons pas trouvé ailleurs, que ce soit au niveau du canal alimentaire ou du canal salivaire.

En parallèle, j'ai développé des tests d'interaction sur stylets disséqués, au départ sur l'espèce *A. pisum* (Fig. 11A). J'ai pu montrer que la protéine virale P2 seule ou fusionnée à la GFP s'accrochait exclusivement à la pointe des stylets maxillaires de puceron dans le canal commun (Fig11B). Nous avons vérifié qu'un mutant non transmissible du helper, la protéine P2Rev5 (Moreno et al., 2005), n'interagissait pas avec les stylets, et la protéine P2 sauvage ne s'accrochait pas non plus sur les stylets de l'espèce non vectrice *Acyrtosiphon lactucae*. L'ensemble de ces données confirme ainsi l'hypothèse énoncée quelques années plus tôt sur la localisation de récepteurs dans le canal commun. Au cours de ce travail, nous avons utilisé différents traitements visant à affecter le récepteur et nous avons montré que le récepteur du CaMV était une protéine cuticulaire (Fig. 11D).



**Figure 12. Découverte de l'acrostyle.**

(A-C) Observation d'une coupe transversale de stylets de puceron nourri sur plante infectée par le CaMV en MET. Sur la coupe, 2 stylets maxillaires et 1 stylet mandibulaire sont visualisés (A). les stylets sont légèrement décalés à la pointe. Deux particules virales sont visibles dans le stylet supérieur (A-B). On distingue très nettement au niveau des 2 stylets maxillaires une zone en surface dense aux électrons (B-C). (D) Observation de la pointe d'un stylet maxillaire en MEB. Au niveau du canal commun (CC), les flèches indiquent montrent l'acrostyle, une zone en forme de virgule qui apparaît différente du reste de la cuticule. Canal alimentaire (FC) et canal salivaire (SC) sont indiqués. Barres de mesure : 100 nm (A-C), 200 nm (D).

## Découverte de l'acrostyle, organe qui porte les récepteurs du CaMV

Afin de comprendre ce qui caractérise précisément la zone très limitée dans laquelle nous retrouvons les récepteurs du CaMV, anatomie et/ou composition particulière, nous avons mené deux approches en parallèle :

- une étude de l'ultrastructure des stylets par microscopie électronique (transmission MET, et balayage MEB), réalisées en **collaboration** avec **Chantal Cazevielle** (Plateau MRI-COMET, Montpellier), et **Didier Cot** (Institut Européen des Membranes, Montpellier). Cette étude a effectivement montré que l'ultrastructure de la cuticule au niveau du canal commun était différente du reste de la cuticule des stylets. Par MET, nous avons visualisé une zone distincte à la surface de la cuticule qui apparaît car plus dense aux électrons (Fig.12 A-C). Cette zone est visible sur les 2 stylets maxillaires et aussi bien au niveau de la gouttière que de la zone élargie. Par MEB, nous voyons très clairement une zone anatomique distincte, avec une forme bien particulière qui correspond à ce qui était visualisé en épifluorescence avec la protéine P2-GFP (Fig. 12D). Cette structure anatomique, territoire cuticulaire, ou organe selon les définitions, constitue donc un support physique dont le CaMV a su exploiter les propriétés pour être transporté d'un hôte à un autre, a été dénommé « acrostyle ».

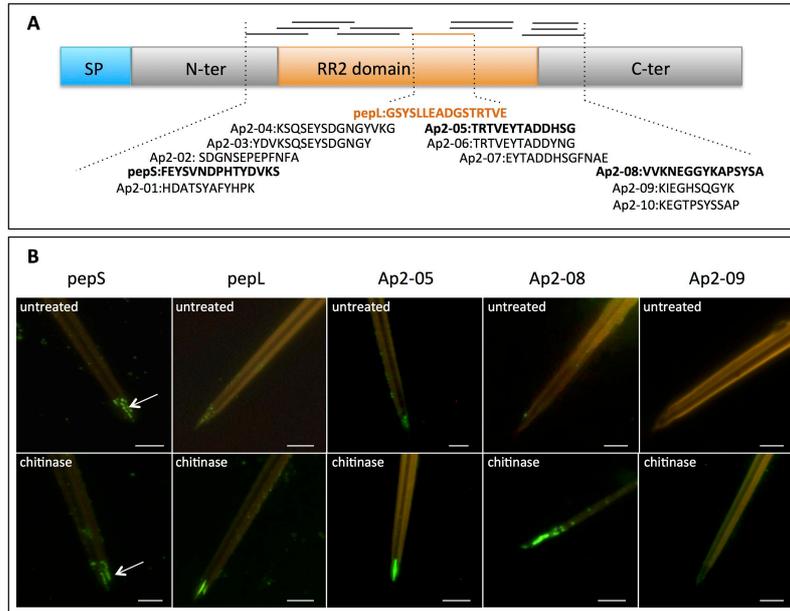
- une approche immunologique visant à mieux définir quelles protéines pouvaient être présentes au niveau de l'acrostyle. Les protéines cuticulaires qui contiennent des motifs de liaison à la chitine ont été ciblées en priorité. Certains de ces motifs sont particulièrement bien conservés notamment dans le domaine de liaison à la chitine (pour revue voir (Willis, 2010)), et la famille des CPR est de loin la plus abondante chez tous les arthropodes, c'est le cas également chez le puceron (Table 1). Ces protéines possèdent un motif en acide aminé nommé RR, et selon la séquence du motif, sont classées parmi les RR-1, RR-2 et RR-3.

**Table 1: Classification des 150 protéines cuticulaires annotées chez le puceron *A. pisum*.**

Famille_sousfamille	CPAP1	CPAP3	CPCFC	CPF	CPR_RR-1	CPR_RR-2	Tweedle
Total génome	11	8	1	2	15	110	3
Dans les stylets	0	3	0	0	4-5	8-30	0

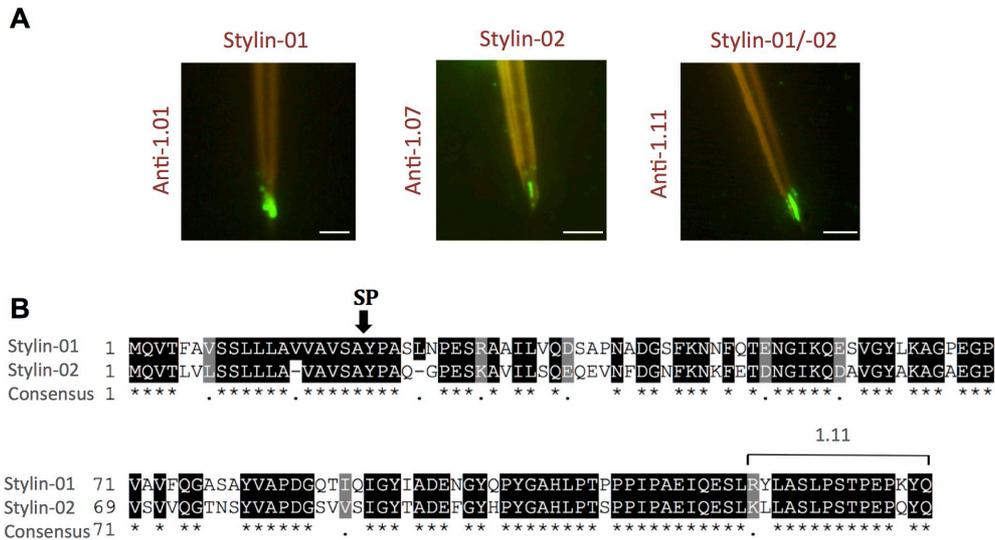
J'ai tout d'abord produit des anticorps contre un peptide très conservé du domaine RR-2, le peptide pepL (Fig. 13A). Cet anticorps marque la pointe des stylets maxillaires, et très fortement l'acrostyle si les stylets subissent au préalable une digestion partielle de quelques minutes à la chitinase (Fig. 13B). L'acrostyle contient donc des protéines CPR\_RR-2, mais le motif pepL n'est pas directement accessible en surface.

Le canal commun abrite donc bien une structure unique dans les stylets dont la composition en surface est différente du reste de la cuticule.



**Figure 13. Identification dans l'acrostyle de peptides présents dans des protéines cuticulaires CPR\_RR-2.**

(A) Représentation schématique de la localisation des peptides utilisés pour produire des anticorps. Le signal peptide (SP), le domaine de liaison à la chitine (RR-2) sont indiqués. Les séquences des peptides identifiés dans l'acrostyle sont indiquées en gras. (B) Immunomarquage des stylets avec les anticorps dirigés contre les peptides. Les stylets été soit non traités (untreated) soit traités à la chitinase avant incubation. Barre de mesure : 5µm.



**Figure 14. Identification de deux protéines CPR\_RR-1 dans l'acrostyle..**

(A) Les protéines Stylin-01 et Stylin-02 ont été identifiées par immunomarquage avec des anticorps ciblant des peptides uniques chez chacune de ces protéines (anti-1.01 et anti-1.07, respectivement). Les peptides sont retrouvés au niveau de l'acrostyle. L'anticorps anti-1.11 marque fortement l'acrostyle en surface des stylets. Cet anticorps reconnaît les 2 protéines Stylin-01 et Stylin-02. (B) Alignement des séquences des protéines Stylin-01 et Stylin-02 (*A. pisum*). Les résidus identiques sont en noir, les résidus similaires sont en gris. Le site de coupure du peptide signal (SP) est indiqué. Barre de mesure : 5µm.

## Identification des premières protéines dans les stylets de puceron

---

Nous avons poursuivi de manière constante, systématique et assidue l'approche immunologique. Cette approche était relativement coûteuse à mettre en œuvre et aussi lourde dans la mesure où elle nécessitait la production de nombreux anticorps et la dissection de stylets à une plus large échelle, mais elle s'est avérée extrêmement pertinente et efficace pour identifier et localiser des protéines dans les stylets de puceron. Ce volet a fait l'objet du post-doctorat de **Craig Webster**.

Grâce à des moyens financiers supplémentaires (Région LR, ANR, Fondation Gates), nous avons commencé la production d'une petite collection d'anticorps dirigés contre des peptides de protéines cuticulaires, contre les protéines CPR\_RR-2 dans un premier temps. Nous avons ainsi, par une approche « peptide walking », identifié trois autres peptides au niveau de l'acrostyle, tous font partie du domaine de liaison à la chitine, et ils sont tous peu accessibles en surface (Fig. 13). Comme ces peptides sont conservés et présents dans plusieurs protéines CPR\_RR-2, nous n'avons pas pu identifier précisément de protéines. Par ailleurs, en raison de la redondance de séquences dans les domaines N- et C-terminus de ces protéines, et la répétition de certains acides aminés (notamment Proline, Alanine, Tyrosine, Serine), il sera difficile par cette approche d'aller jusqu'à l'identification de protéine.

Nous avons élargi cette collection d'anticorps aux autres protéines cuticulaires du puceron en fonction des résultats obtenus, ou de données complémentaires apportées par l'équipe de **Keith Perry** (Université de Cornell, Ithaca, USA). J'ai aussi eu l'appui de **Manuella van Munster**, qui a effectué une étude de génomique comparative des protéines cuticulaires de 2 espèces de puceron, et a contribué ainsi au design des peptides pour production d'anticorps. Nous avons réussi à identifier les deux premières protéines des stylets d'insecte, présentes dans l'acrostyle, les protéines Stylin-01 et Stylin-02 qui appartiennent à la famille des CPR\_RR-1 (Fig. 14). Ces deux protéines sont très similaires, mais distinguables grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre l'une ou contre l'autre. Cette étude nous a permis d'identifier un peptide directement accessible en surface de l'acrostyle, le peptide reconnu par l'anticorps anti-1.11. Ce peptide est présent chez les deux protéines.

Nous avons montré qu'il y avait *in vitro* compétition entre l'anticorps anti-1.11 et la protéine virale P2 pour l'accrochage sur l'acrostyle. Ces résultats indiquent que le peptide 1.11 pourrait bien être impliqué dans l'interaction avec P2. Les deux protéines sont des candidates sérieuses récepteurs de virus. Leur caractérisation biologique et structurale est en cours (voir chapitres 3 et projet actuel).

Ces données ont montré que l'acrostyle contenait au moins 2 types de protéines, les CPR\_RR-1 et CPR\_RR-2. Nous avons démarré plusieurs approches globales haut-débit (transcriptomique et protéomique), afin de définir le répertoire le plus exhaustif possible des protéines des stylets de puceron, parmi lesquels sont les récepteurs des virus non-circulants.

# Répertoire des protéines de l'acrostyle

---

## Analyse transcriptomique des glandes rétortiformes

Cette analyse a été principalement prise en charge par mes **collaborateurs** dans le cadre du programme ANR que je coordonne (**Yvan Rahbé** et **Natalia Guschinskaya**, Inra Lyon ; l'équipe de **Philippe Bulet**, Biopark Archamps) et a été faite sur l'espèce *A. pisum*.

Les glandes rétortiformes sont des organes spécialisés, entièrement dédiés à la production de cuticule et à la synthèse des stylets avant chaque mue. Une analyse histologique approfondie a été réalisée pour localiser précisément ces glandes à l'intérieur de la tête des insectes et pouvoir séparer, après dissection, les glandes spécialistes de la synthèse des stylets mandibulaires (MDR) de celles des maxillaires (MXR). Le pic d'expression des protéines cuticulaires a été évalué au cours du dernier stade larvaire, le stade L4, en mesurant les niveaux d'expression de gènes contrôles comme *stylin-01* et *stylin-02*, et la collecte des glandes a été effectuée au moment du pic d'expression des protéines cuticulaires, quelques heures avant la mue.

Les données obtenues reflètent une composition des stylets complexe. En effet, les transcrits des 150 protéines cuticulaires annotées ont été identifiés dans les échantillons. Contrairement à nos attentes, il n'y a pas eu de différence significative d'expression entre les deux types de glandes que ce soit au niveau des transcrits des protéines cuticulaires ou des autres transcrits. La seule différence notable étant un transcrit codant pour trois neuropeptides pyrokinin-like, plus exprimé dans les glandes mandibulaires. La famille de neuropeptides PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide)/pyrokinin est impliquée dans la régulation du développement de l'insecte et la reproduction (pour revue voir (Choi and Vander Meer, 2012)). Ces peptides ont probablement aussi un rôle pléiotrope chez le puceron. Leur rôle éventuel sur la formation des stylets a été testé en injectant les peptides synthétiques dans les pucerons au stade L4 avant la mue. Cela a entraîné une surmortalité des pucerons. Les stylets des pucerons morts observés en MEB ne présentaient pas de phénotype particulier. En revanche, un grand nombre de pucerons morts étaient des individus sans tête.

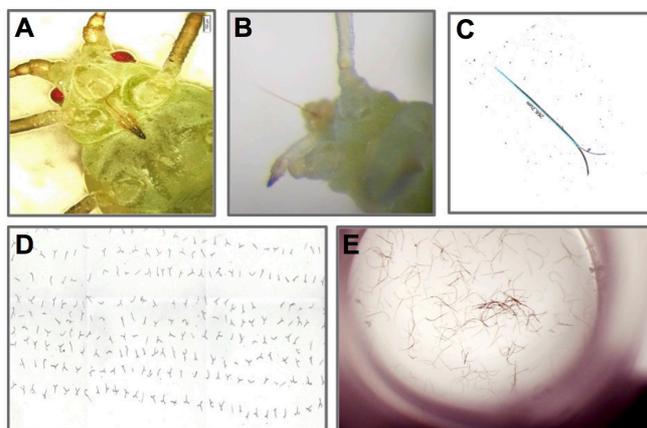
Ces données nous ont appris que les trois transcrits majoritaires représentant à eux seuls 22% des transcrits totaux codent pour des protéines CPR\_RR-2. De manière intéressante, on retrouve dans le Top 20 une grande proportion de transcrits de protéines CPR\_RR-1, et une protéine CPAP3. Les transcrits *stylin-01* et *stylin-02* sont retrouvés respectivement au 12<sup>e</sup> et 14 rang des expresseurs,

## Analyse protéomique des stylets de puceron

En plus des **collaborateurs** cités ci-dessus, et de **Craig Webster** en post-doc dans l'équipe, cette étude est partie intégrante du premier volet de la thèse de **Maëlle Deshoux**, et a bénéficié de l'appui de personnels CDD recrutés dans le cadre du projet financé par la fondation Gates.

Pour mener à bien cette étude, nous avons d'abord optimisé la méthode d'extraction des protéines de la cuticule des pucerons et évalué la quantité de stylets qui serait nécessaire (essais réalisés sur des mues, sur d'autres structures cuticulaires comme les pattes, les ailes ou les antennes, sur plusieurs échantillons de 200 stylets) (Masson et al., 2018). Nous avons mis en place un protocole adapté de la collecte de faisceaux de stylets (Fig. 15). Il a fallu par exemple s'affranchir du problème d'électricité statique, car nous nous étions rendus compte que les stylets « disparaissaient » des outils de dissection beaucoup plus rapidement que le temps consacré à la dissection elle-même. Ce protocole nous a donné pas mal de fil (ou de stylets) à retordre. Nous avons dû utiliser des outils adaptés en tungstène, des lames conductives (lames ITO, Indium Tin Oxide), des tubes spécialement usinés pour cette collecte. Nous étions trois personnes pour la collecte de trois échantillons indépendants de 500 faisceaux chacun, et cela

nous a pris plusieurs semaines. Les protéines ont été extraites puis digérées à la trypsine, avant d'être analysées en spectrométrie de masse par NanoLC-MS/MS.

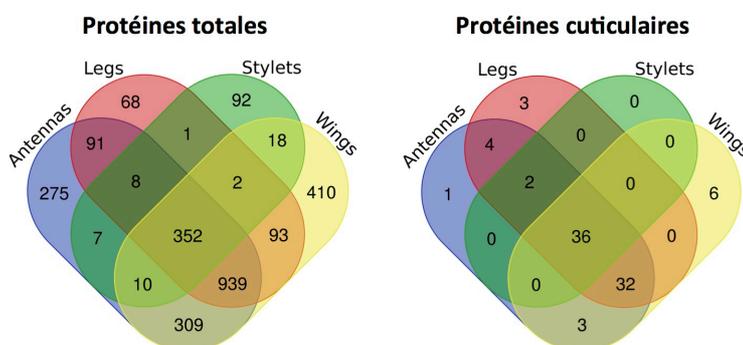


**Figure 15. Collecte de faisceaux de stylets pour analyse protéomique.**

(A) Etude réalisée sur l'espèce *A. pisum*. Le faisceau de stylets est sorti du rostre, son organe protecteur (B), puis séparé de la tête (C), et déposé sur lame ITO (D). Une fois que les 500 faisceaux ont été accumulés sur lame, ils sont déposés au fond d'un tube en verre (E).

Puisque nous avons collecté différentes structures cuticulaires (pattes, antennes, ailes, stylets), nous voulions réaliser une analyse comparative de leur protéome pour définir le « protéome cœur » des cuticules de puceron et déterminer éventuellement les signatures protéiques spécifiques de chacune. Ces données sont encore en cours d'analyses à l'heure actuelle. Mais ce que nous savons déjà, c'est que nous n'avons pas identifié de protéines cuticulaires qui soient spécifiques des stylets (Fig. 16).

**Figure 16. Analyse comparative des protéomes de 4 structures cuticulaires du puceron *A. pisum*.** Diagramme de Venn du protéome total des antennes, pattes, stylets et ailes à gauche, et du « cuticulome » de ces 4 structures à droite.

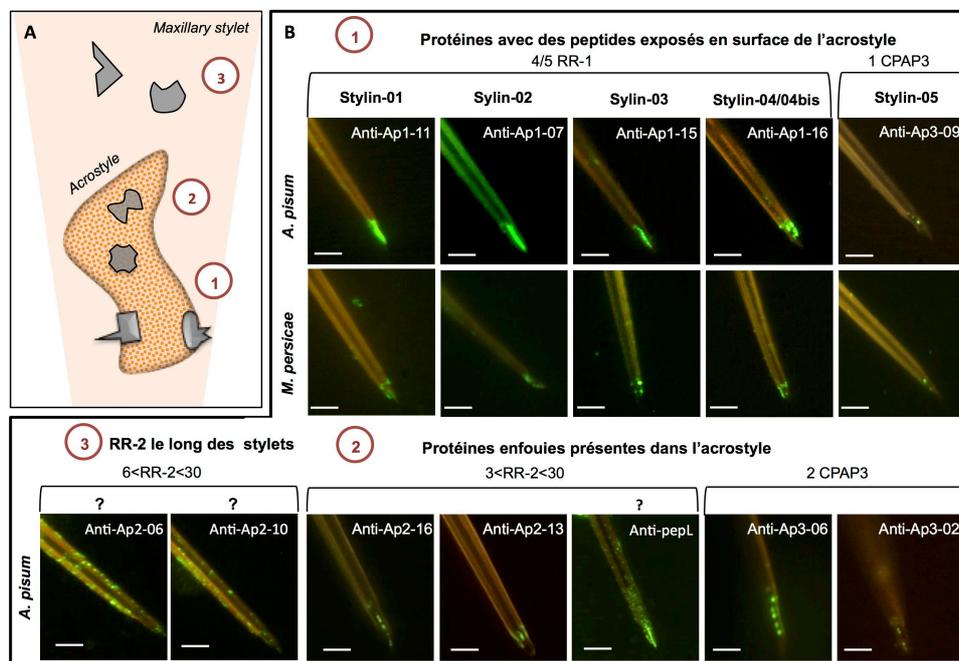


Nous avons pu définir le « cuticulome » des stylets (le répertoire des protéines cuticulaires). En plus des protéines Stylin-01 et -02 retrouvées dans les échantillons, nous avons identifié entre 13 à 36 protéines cuticulaires. Comme nous l'avons déjà évoqué, les protéines de la famille des CPR sont très similaires, en conséquence, l'assignation de certains peptides n'a pu être faite avec précision. Ce sont des peptides dits « partagés » par opposition aux peptides « uniques ». C'est le cas du peptide « GSYSLLEADGSTR » qui a lui seul est présent dans 18 protéines différentes. Il est donc impossible pour ce peptide d'assigner une protéine unique. Le nombre minimal de protéines pouvant expliquer la totalité des peptides cuticulaires identifiés dans les stylets par l'analyse spectrométrie de masse (ce que j'appellerais la « short list » de « master proteins ») est de 15 protéines appartenant à 2 familles différentes, les CPR (4 CPR\_RR-1, 8 CPR\_RR-2), et les CPAP3 (3 protéines). Le listing exhaustif comporte 23 protéines cuticulaires additionnelles parmi lesquelles 1 CPR\_RR-1 et 22 CPR\_RR-2 (voir Table 1).

Afin de vérifier la présence de ces protéines dans les stylets, et pour les localiser précisément, nous avons produit des anticorps qui ciblent chacune des protéines Master, et réalisé des immunomarquages de stylets disséqués. Ce travail a nécessité environ 400 lames d'échantillons pour un total de plus de 16000 stylets disséqués. Nous avons obtenu des marquages contre chacune des protéines de cette liste. Tous les peptides CPR\_RR-2 pour lesquels des anticorps étaient disponibles ont été retrouvés enfouis dans la cuticule, parfois tout le long des stylets, mais aussi au niveau de l'acrostyle (Fig.17).

Au niveau de l'acrostyle nous avons clairement identifié deux protéines CPR\_RR-2 grâce à des anticorps dirigés contre des peptides uniques, toutes les protéines CPR\_RR-1 (soit 4 à 5 protéines, deux partageant 96 % d'identité, et aucun anticorps ne permettant de les distinguer clairement), et toutes les protéines CPAP3. De façon remarquable, toutes les protéines CPR\_RR1 ont au moins 1 peptide directement accessible en surface de l'acrostyle. Ce sont les protéines que nous appellerons Stylin-01 à -04. Elles sont toutes candidates récepteurs de virus et sont à ce titre en train d'être caractérisées. A celles-ci s'ajoute une protéine CPAP3 pour laquelle nous obtenons un marquage ponctué de l'acrostyle en surface (Fig. 17). Il faudrait réaliser des expériences supplémentaires et produire d'autres anticorps pour voir si d'autres peptides de cette protéine CPAP3 sont plus accessibles ou mieux répartis en surface de l'acrostyle, car nous n'avons couvert qu'une faible proportion de sa séquence avec les deux anticorps produits. Cette protéine est nommée Stylin-05 et sera aussi caractérisée dans le futur.

Comme cela avait été suggéré par l'analyse transcriptomique, la composition des stylets est effectivement complexe, et non homogène. Il y a une territorialisation des protéines cuticulaires très claire, et pour l'instant nous voyons une sur-représentation des protéines CPR\_RR-1 à l'interface cuticule/fluide (sève, ou salive) à la pointe des stylets maxillaires.



**Figure 17. Cartographie des protéines cuticulaires dans les stylets et identification des peptides en surface de l'acrostyle.**

(A) Schématisation de la pointe des stylets de puceron. Les protéines cuticulaires sont figurées en gris. Les numéros renvoient au résumé des marquages (B) faits chez l'espèce *A. pisum* et *M. persicae*. (B) Les images représentatives des marquages avec certains anticorps apparaissent sous chaque famille/sous-famille de protéines cuticulaires. Les anticorps ciblant des peptides « partagés » sont indiqués par un point d'interrogation. Barres de mesure : 5µm.

---

Certains de ces travaux sont présentés dans mon mémoire de thèse. Ils ont aussi fait l'objet de 5 articles et 7 articles de synthèse, et 2 articles soumis ou en préparation:

- Uzest M., et al. (2007). A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17959-64.
- S. Blanc, et al. (2008). Une protéine clé pour la transmission d'un virus de plante à la pointe des stylets de l'insecte vecteur. *Virologie* 12 (1), 70-2.
- Uzest M., et al. (2010). The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 39, 221-9.
- Brault V., et al. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333, 524-38.
- Blanc S., Uzest M., Drucker M. (2011). New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Curr Opin Microbiol.* 14:483-491.
- Uzest M., Drucker M., Blanc S. (2011). La transmission d'un complexe : pas si simple. Cas du virus de la mosaïque du chou-fleur. *Virologie* 15 (3), 192-204.
- Blanc S., Drucker M., Uzest M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:403-25.
- Uzest M., Blanc S. (2016). Molecular mechanisms involved in non-circulative virus-vector Interactions. In Brown J. (ed.). Vector-mediated transmission of plant pathogens. San Diego, USA: Academic Press. p59-72
- Webster C.G., et al. (2017). Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions. *Insect Sci.* 2017 Apr 19. doi: 10.1111/1744-7917.12469.
- Mathers TC, et al. (2017). Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biol.* 2017 Apr 4;18(1):63. doi: 10.1186/s13059-017-1202-6.
- Webster C.G., et al. (2018). Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *J Virol.* 2018 May 16. pii: JVI.00432-18. doi: 10.1128/JVI.00432-18.
- Deshoux M., Monsion B., Uzest M. Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Curr Opin Virol.* 2018 Dec;33:137-143. doi: 10.1016/j.coviro.2018.07.015.

Il y a actuellement un autre article soumis, et un autre en préparation :

- Gushinskaya N., Ressenkoff D., Arafah K., Voisin S., Bulet P., **Uzest M.**, Rahbé Y. (*submitted*). Insect mouthpart transcriptome unveils [extensive] novel cuticular proteins and complex organization.
- Masson V., Deshoux M., Arafah K., Voisin S., Gushinskaya N., Rahbé Y., Cayrol B., Webster C.G., van Munster M., Blanc S., Bulet P., **Uzest M.** (*in prep*). Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the surface of the acrostyle.



## Chapitre 3 – Vers l'identification du récepteur du CaMV

Il s'est passé un laps de temps de deux ans et demi entre la découverte de la première protéine des stylets, Stylin-01, suivie quelques mois plus tard de la protéine Stylin-02, et l'établissement d'une liste plus exhaustive de candidats récepteurs en surface de l'acrostyle. Nous avons donc commencé à développer des approches de validation fonctionnelle avec ces deux stylines bien avant les autres. Ces approches sont transposées peu à peu à l'ensemble des candidates. Mais les résultats les plus aboutis ont été obtenus avec Stylin-01.

### Interaction P2-CaMV/Stylin

---

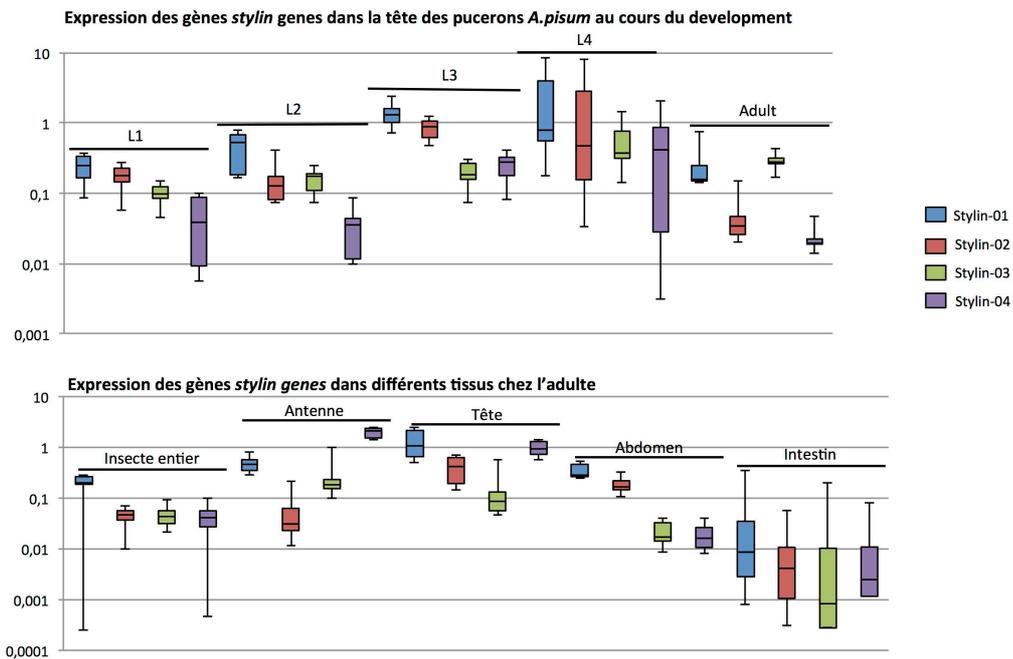
Ces travaux ont principalement été réalisés dans le cadre des post-doctorats de **Baptiste Monsion** et **Caroline Hemmer**. Je tenais à en parler, même s'ils n'ont pas abouti, car nous y avons consacré beaucoup d'énergie et de moyens.

Nous avons développé de nombreuses approches de biochimie classique, d'interactions protéines-protéines, de co-immunoprécipitation, de co-expression dans différents systèmes hétérologues (bactérie, levure, plante, cellules d'insectes), ceci afin caractériser l'interaction directe entre la protéine virale P2 et les protéines Stylin-01 et Stylin-02.

Nous avons également développé une approche Peptide Array en collaboration avec **Yvan Rahbé** (Inra, Lyon) pour tester des interactions entre des peptides issus des protéines cuticulaires de la famille des CPR et des protéines virales ou tout autre molécule susceptible d'interagir avec l'acrostyle. Nous avons généré deux types de lames contenant chacune 384 peptides chevauchant qui couvraient la totalité des séquences des protéines CPR\_RR-1 et CPR\_RR-2 du puceron *A. pisum*. L'idée était de pouvoir incuber ces lames avec des protéines virales, des virus, ou tout autre interactant potentiel des protéines cuticulaires. Pour cette approche, comme pour les autres, nous n'avons pas réussi à démontrer d'interaction entre la protéine virale P2 et une Styline. Nous pouvons évoquer plusieurs raisons probables:

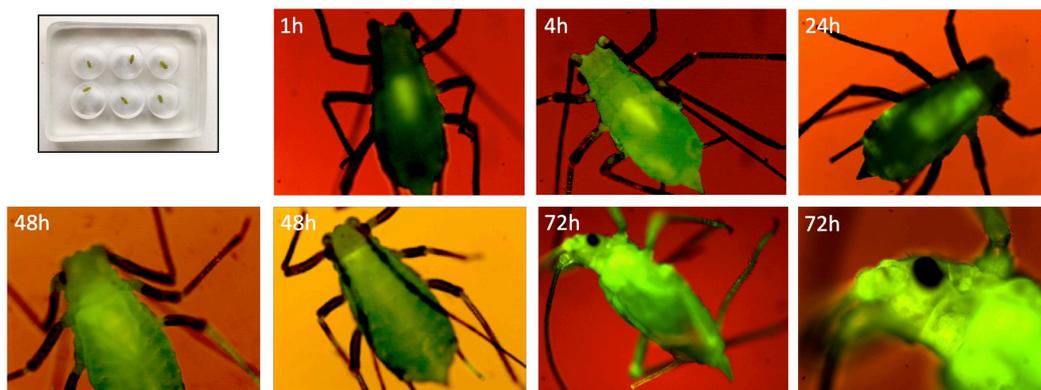
- il n'y a pas d'interaction car le récepteur du CaMV n'est ni Stylin-01 ni Stylin-02, ni aucune protéine CPR,
- la protéine virale P2 a tendance à s'agréger et précipiter et n'est soluble qu'à forte concentration saline ce qui peut être un problème pour les conditions d'interactions,
- nous n'avons pas réussi à recréer *in vitro* des conditions favorables à une interaction P2-Styline,
- les protéines cuticulaires sont totalement déstructurées après production en système hétérologue, leur repliement sous une forme active nécessitant probablement un contexte proche de l'environnement stylet que nous n'avons pas su reproduire pour le moment *in vitro* malgré une **collaboration** étroite avec les équipes de **Patrick Bron** (CBS, Inserm, Montpellier) structuraliste, et **Laurent David** (Université Lyon 1), spécialiste de l'ingénierie des biopolymères composites, qui nous a fourni des oligomères de chitine et chitosane avec des caractéristiques très particulières comme adjuvants dans nos expérimentations.

Nous avons en parallèle initié les approches de validation fonctionnelle par RNA interférant.



**Figure 18. Niveaux d'expression des gènes *stylin* chez *A. pisum* au cours du développement de l'insecte et dans différents tissus.**

L'expression des gènes *stylin* est normalisée par rapport à la moyenne de 2 gènes de ménage (actine et EF1a). Chaque box plot représente 4 pools de 10 individus ou 10 tissus. Dans cette représentation 1 représente le niveau d'expression des gènes de ménage.



**Figure 19. Suivis cinétiques de l'ingestion de siRNA marqués par le puceron *A. pisum*.**

Les pucerons sont nourris dans des petits abreuvoirs individuels (en haut à gauche) avec une solution sucrée contenant des siRNA fluorescents. Des individus sont prélevés à différents temps et observés sous microscope à épifluorescence. Malgré l'autofluorescence du puceron, on arrive à visualiser la diffusion progressive des molécules dans le corps de l'insecte, passant de l'intestin vers les autres tissus. Clichés E. Pichon.

## Approche RNAi – silencing des gènes *stylin-01* et *stylin-02*

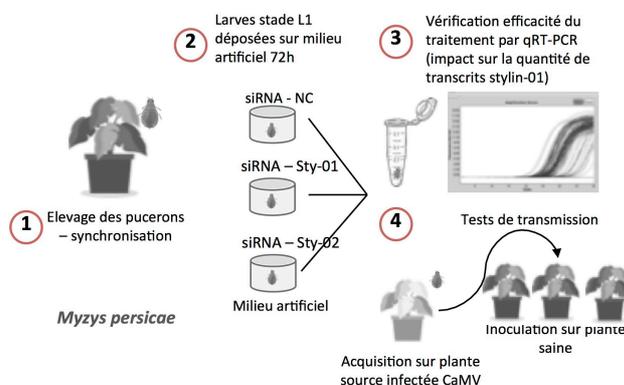
Cette approche a été réalisée en collaboration avec **Federica Calevro** (INSA, Lyon), **Alberto Fereres** (CSIC, Madrid). L'enjeu étant particulièrement important, il a mobilisé de nombreuses personnes de l'équipe depuis la découverte des stylines, dont **Craig Webster** et **Baptiste Monsion** (post-doctorat), et **Maëlle Deshoux** (Master 2 et thèse).

Le silencing chez le puceron est difficile à mettre en place. L'efficacité est extrêmement variable d'un gène à l'autre, d'une approche à l'autre, d'un laboratoire à l'autre. Et même au sein d'un même laboratoire, avec des protocoles expérimentaux similaires, les résultats ne sont pas toujours reproductibles. L'efficacité varie aussi énormément d'une expérience à l'autre, rendant très complexe l'interprétation des résultats. Il n'est pas rare, même, de sur-exprimer les gènes ciblés au lieu de les éteindre. Cela a été rapporté par de nombreux collègues et dans la littérature (Christiaens et al., 2014; Kanakala and Ghanim, 2016 ; Mulot et al., 2018 ). Nous avons nous aussi été confronté à ce problème, et nous le sommes toujours de manière récurrente. Une autre contrainte dans notre étude est que nous devons diminuer l'expression d'un gène lors de sa production dans les glandes qui synthétisent les stylets avant la mue de l'insecte, pour voir un impact éventuel sur les stylets néo-synthétisés. Nous ne pourrions pas vérifier l'efficacité du traitement au niveau des tissus que nous souhaiterions cibler, les glandes retortiformes, ni même l'impact sur la quantité de protéines dans les stylets.

Nous avons caractérisé les profils d'expression des gènes *stylin-01*, *-02*, *-03*, *-04* dans différents organes, au cours des différents stades de développement de *A. pisum* et *M. persicae*. Les tendances sont les mêmes chez les 2 espèces. Nous observons une grande variabilité des niveaux d'expression des gènes cuticulaires (Fig. 18). Cette variabilité pose évidemment des problèmes dans l'interprétation des résultats, et il n'est pas toujours facile de pouvoir conclure clairement sur l'efficacité des traitements. Nous voyons aussi que *stylin-01* est le gène le plus exprimé des 4.

Nous avons testé plusieurs techniques différentes pour délivrer les ARN double brin (utilisation de long dsRNA, de siRNA, délivrés par injection, par ingestion sur milieu artificiel ou sur plantes transgéniques), et la phase de mise au point a été assez longue. Au cours de cette phase, nous avons notamment utilisé des siRNA marqués avec des fluorochromes pour suivre la diffusion dans l'insecte lors des phases d'ingestion ou d'injection pour s'assurer que les molécules pouvaient atteindre la tête des pucerons (Fig. 19).

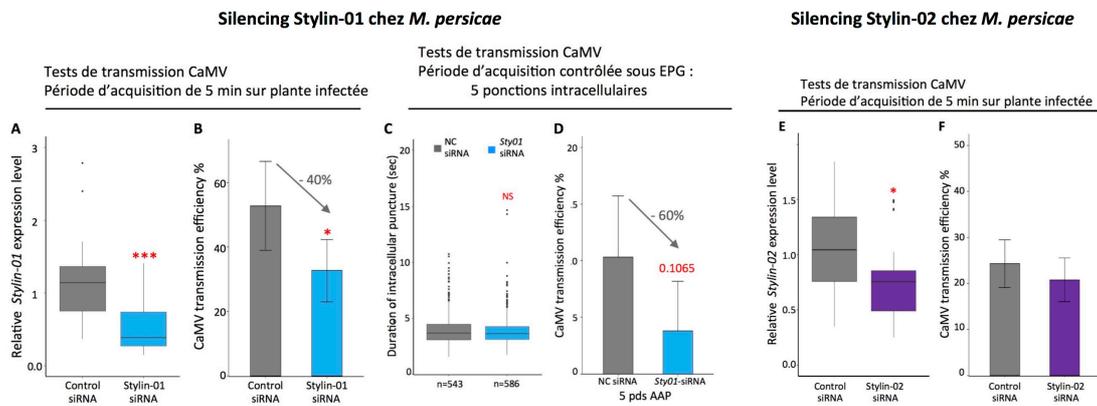
Nous avons réussi à trouver des conditions dans lesquelles les niveaux de silencing étaient satisfaisants et nous avons alors commencé à regarder les phénotypes, et notamment l'impact de la diminution d'expression sur la capacité à transmettre le CaMV (protocole Fig. 20).



**Figure 20. Protocole expérimental tests de transmission du CaMV par des pucerons silencés.**

Les pucerons sont synchronisés pour avoir des individus du même âge (1). Les larves sont mises en acquisition 72h sur milieu artificiel contenant des siRNA (contrôles NC, ou siRNA ciblant les *stylines* (2). Après traitement, des individus sont prélevés pour effectuer des analyses qPCR (3). Les autres sont mis en acquisition sur plantes infectées par CaMV pendant 5 minutes, puis transférés sur des plantules saines (4).

Nous avons montré qu'une diminution des transcrits de Stylin-01 de 50% était corrélée à une diminution significative de la transmission du CaMV de l'ordre de 40% (Fig. 21A-B). Nous n'avons pas observé cette diminution lorsque nous avons silencé le gène *stylin-02* (Fig. 21E-F). Les expériences ont été reproduites sous contrôle EPG pour laisser tous les pucerons opérer un même nombre de ponctions intracellulaires qu'ils soient silencés ou traités avec un contrôle négatif, et ainsi vérifier que le phénotype observé n'était pas dû à une altération du comportement du puceron lors des phases précoces d'acquisition du virus (Fig. 21C-D). Aucune différence de comportement n'a été observée entre les pucerons contrôles et silencés, alors que le taux de transmission était une nouvelle fois réduit. Nous pouvons donc conclure que Stylin-01 est impliquée dans la transmission du virus. Par contre, nous ne pouvons pas affirmer que cette protéine est le récepteur du CaMV. Nous n'avons pas pu démontrer une interaction directe entre P2 et Stylin-01. En fait, nous ne pouvons pas exclure que le traitement affecte l'ultrastructure de l'acrostyle et de manière indirecte l'accrochage du virus. Des expérimentations complémentaires sont actuellement en cours pour confirmer le rôle majeur de Stylin-01 dans la transmission du virus grâce à des mutants KO pour Stylin-01 que nous avons récemment générés (voir chapitre suivant).



**Figure 21. Impact du silencing de Stylin-01 ou Stylin-02 sur la transmission du CaMV.**

(A-D) Silencing Stylin-01. (E-F) Silencing Stylin-02. (A, E) Box plots représentant l'expression relative des gènes *stylin* comparée à celle des gènes de ménage (actine et EF1a). Les valeurs en (A) sont issues de 27 lots de 10 pucerons, les valeurs en (E) sont issues de 18 lots de 10 pucerons. (C) Moyenne du temps d'une ponction intracellulaire en seconde. 543 mesures effectuées pour les pucerons contrôle, 582 pour les pucerons nourris sur siRNA-Sty01. (B, C, F) Proportion de plantes infectées par le CaMV à partir de transmission réalisées avec des pucerons contrôles ou nourris sur milieu artificiel. 2 pucerons par plante (B, F) ou 1 puceron par plante (D) ont été utilisé dans les tests.

Les valeurs obtenues pour les pucerons nourris sur milieu artificiel contrôle sont en gris, ceux nourris sur siRNA-Sty-01 sont en bleu, ceux nourris sur siRNA-Sty02 sont en violet.

Ces résultats sont décrits dans 1 article et 1 article de synthèse déjà cités dans le chapitre 2 :

- Webster C.G., et al. (2018). Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *J Virol.* 2018 May 16. pii: JVI.00432-18. doi: 10.1128/JVI.00432-18.
- Deshoux M., Monsion B., Uzest M. Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Curr Opin Virol.* 2018 Dec;33:137-143. doi: 10.1016/j.coviro.2018.07.015.

## Projet actuel et développements futurs

---



## Projet actuel et développements futurs

L'identification de récepteurs de virus non-circulants chez le puceron et la caractérisation fine des interactions virus-puceron est un projet qui a mis du temps à se mettre en place, avec des verrous techniques conséquents à chacune des étapes, et pour lesquels l'obtention de résultats est très sporadique. Nous pensions que la réussite du projet passerait par le développement de nombreuses approches en parallèle, car nous nous doutions que beaucoup ne permettraient pas de lever ces verrous, et nous ne savions pas lesquelles seraient les plus pertinentes. Il fallait donc assurer un apport financier conséquent pour déployer les forces humaines nécessaires et démarrer des approches diverses et parfois coûteuses comme la banque d'anticorps. C'est ce que nous avons fait au cours des 10 dernières années. Même si les échecs ont été au rendez-vous bien des fois, avec pour conséquences l'abandon d'approches après de longs mois d'efforts, (cas par exemple de la préparation de plantes transgéniques exprimant les dsRNA qui a mobilisé des forces pendant plus de deux ans), on peut dire que c'est une stratégie qui s'est avérée payante, puisqu'elle a permis des avancées importantes dans cette thématique, et les nouveaux outils développés ouvrent désormais des perspectives probablement plus sereines. Le consortium mis en place notamment au travers du projet financé par la fondation Gates et du projet ANR a aussi été le garant du bon déroulement du programme. Nous devons capitaliser sur ces acquis solides et sur notre réseau de collaborations mis en place pour poursuivre ces travaux.

Je compte, au cours des prochaines années, compléter la caractérisation des stylines et comprendre le rôle de chacune dans la transmission des virus, l'intégrité de la cuticule ou les interactions plante-puceron. L'identification des récepteurs d'autres virus non-circulants sera bien sûr une priorité. Cibler l'acrostyle et trouver un moyen de bloquer sa surface est un objectif que nous affichons depuis que nous avons découvert cet organe. Avec l'identification des protéines cuticulaires en surface et les dernières données structurales que nos collaborateurs sont en train d'obtenir, nous avons maintenant matière à développer cette question de recherche. A ce programme, je souhaiterais ajouter une composante « annexe » (non prioritaire mais très « rafraîchissante »), et voir si nos données pourraient trouver un écho chez d'autres modèles vecteurs de virus de plante, ou même vecteurs de virus animaux.

## Mutagenèse chez le puceron et lignées stables KO *Stylin-01*

---

J'ai démarré en 2016 une collaboration avec **Gaël Le Trionnaire** et ses collègues (Inra de Rennes) pour générer des lignées de pucerons stables dépourvues du gène *stylin-01*. Ces mutants KO sont les premiers à avoir été obtenus chez le puceron en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. La caractérisation de ces lignées fait partie de la thèse de **Maëlle Deshoux**, du stage de master I de **Thibault Kosuth**, et bénéficie de l'appui de personnel technique.

La technologie CRISPR/Cas9 a été déployée chez quelques insectes, comme la drosophile, le moustique ou bien encore le ver à soie (Taning et al., 2017). Cependant sa mise en place chez le puceron nécessitait des ajustements notamment pour l'induction de la reproduction sexuée et l'obtention d'œufs. Ceux-ci devaient être injectés dans une fenêtre de temps réduite (4h post ponte) au stade une seule cellule germinale. Une autre contrainte était la diapause obligatoire de près de 3 mois. Le protocole complet pour obtenir des mutants potentiels nécessite 7 mois au total. Il a été réalisé sur l'espèce *A. pisum*. Plusieurs croisements ont été essayés et plusieurs séries d'injection avant d'arriver au protocole résumé ci-après (Fig. 22) qui nous a permis de générer des mutants stables.

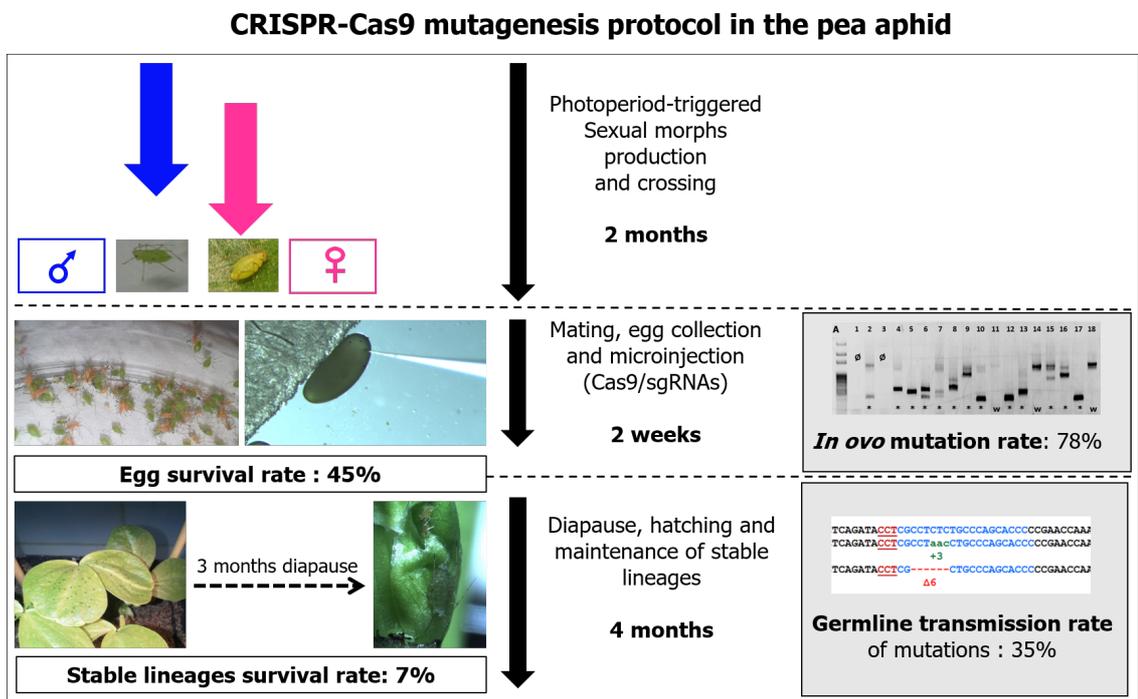


Figure 22. Protocole de mutagenèse CRISPR/Cas9 chez le puceron du pois.

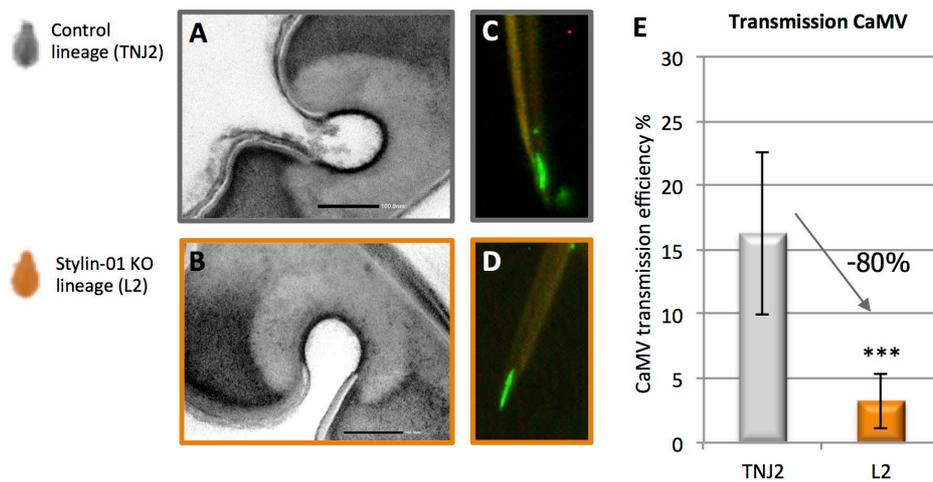


Figure 23. Les mutants KO Stylin-01 sont affectés dans leur capacité à transmettre le CaMV.

(A-B) Observation de l'acrostyle de pucerons KO (lignée L2) et de pucerons contrôle (lignée TNJ2) en MET. L'acrostyle des mutants (B) apparaît toujours très dense aux électrons. (C-D) Incubation des stylets des lignées L2 et TNJ2 avec la protéine virale P2 fusionnée à la GFP. (E) Proportion de plantes infectées par le CaMV à partir de transmission réalisées avec 2 pucerons par plante test. Barres de mesure : 200 nm (A-B).

Après le processus de mutagenèse, nous avons attendu l'émergence des fondatrices, puis que celles-ci produisent des descendants pour pouvoir caractériser les génotypes. Nous avons au final obtenu 6 lignées mutantes à partir de 500 œufs injectés. Toutes ces lignées mutantes sont maintenues au laboratoire avec des lignées sœurs non injectées, dans un confinement de niveau 3. Toute expérimentation dans ces conditions est lourde à mettre en place, et là aussi nous avançons doucement, d'autant plus que *A. pisum* est un puceron spécialiste qui se nourrit sur légumineuses, et qu'il faut donc aussi adapter les protocoles pour tester la transmission de virus qui passent sur brassicacées comme c'est le cas du CaMV.

Nous avons deux lignées particulièrement intéressantes, la lignée L2 obtenue par injection de 4 guides ARN différents ciblant 4 régions du gène *stylin-01*, et dont les deux allèles portent des mutations multiples qui conduisent à un KO complet du gène ; et la lignée L14, obtenue par injection d'un seul guide ARN ciblant uniquement la fin du gène, mutée dans la région reconnue par l'anticorps anti-1.11. Nous avons mis en place ces deux protocoles différents, car nous craignons que les mutants KO soient létaux.

Nous avons commencé la caractérisation de la lignée L2 qui ne produit plus du tout de Stylin-01. Les données ici sont très préliminaires. Nous avons dans un premier temps regardé les niveaux d'expression des autres stylines et comparé avec une lignée non mutée, la lignée TNJ2. Nous n'avons pas noté de différence notable, aucune ne semble surexprimée ou au contraire réprimée. Nous ne voyons pas non plus de différence notable de l'aspect de l'acrostyle en MET avec les premières images que nous avons acquises, mais nous devons approfondir cette étude (Fig. 23A-B). Nos observations indiquent aussi que la protéine virale P2-GFP s'accroche toujours *in vitro* sur les stylets de la lignée L2 (Fig. 23C-D). Par ailleurs, nous avons pu mettre en place un protocole pour effectuer des tests de transmission du CaMV sur navets. Et là nos données préliminaires sont très encourageantes. Elles indiquent que la transmission du CaMV est drastiquement affectée dans la lignée L2 (Fig. 23E) avec une diminution de 80% des cas de transmission. Nous avons aussi des données préliminaires qui indiquent que cette baisse ne serait pas due à un défaut de comportement alimentaire lors des phases précoces d'acquisition des virus. Tout ceci reste évidemment à confirmer bien sûr, et ce sera la priorité pour cette année.

La caractérisation approfondie de la lignée L2 va se poursuivre. Une des prochaines étapes sera de mettre en place le silencing d'autres stylines, Stylin-02 en priorité, pour voir si nous pouvons abolir totalement la transmission du CaMV. Il sera aussi intéressant de voir l'impact sur l'ultrastructure des stylets et sur les autres traits d'histoire de vie comme la survie, le nombre de descendants produits ou bien encore la biomasse ou encore le comportement alimentaire. Parallèlement, nous mettrons en place des expérimentations pour tester le rôle de Stylin-01 dans la transmission d'autres virus non-circulants. Pour les Potyvirus, nous utiliserons le *Turnip mosaic virus* ou TuMV (Potyvirus) qui infecte aussi le navet, et pour lequel nous appliquerons donc le protocole mis en place pour tester la transmission du CaMV. Pour le *Cucumber mosaic virus* (Cucumovirus), nous devons par contre trouver des conditions expérimentales appropriées qui n'ont pas encore été définies et notamment une plante hôte du CMV sur laquelle *A. pisum* pourrait se nourrir le temps nécessaire à l'acquisition ou au relargage du virus.

Nous n'avons pas encore eu le temps de réaliser des expérimentations avec les 5 autres lignées mutantes obtenues. La lignée L14 sera intéressante à caractériser car elle ne présente des mutations qu'en C-terminus. Une première étape sera de voir si nous détectons bien la protéine dans les pucerons mutés, et si nous pouvons la localiser dans l'acrostyle. Nous devons également vérifier si le peptide muté est toujours accessible en surface en produisant des anticorps spécifiques de ce domaine. Par contre, nous n'envisageons pas pour l'instant de caractériser les 4 autres lignées. Nous n'avons réussi à séquencer qu'un seul des 2 allèles et nous avons vu qu'il était muté, mais nous n'avons pas réussi à amplifier, cloner et séquencer le 2<sup>o</sup> allèle pour des raisons que nous ne savons pas expliquer. Nous pourrions réaliser des auto-

croisements afin d'obtenir des lignées descendantes homozygotes mutées, mais les auto-croisements sont peu fertiles, et ce serait un processus long et lourd à mettre en place, qui n'est pas prioritaire.

Bien évidemment, la mise en place de la mutagenèse dirigée chez le puceron ouvre des perspectives prometteuses pour caractériser la fonction d'autres stylines, et nous envisageons très sérieusement de produire d'autres mutants. L'idéal serait d'avoir des mutants KO de chacune des stylines. Nous savons que ce n'est pas réaliste à l'échelle de notre équipe dans une fenêtre de temps raisonnable, car l'obtention des lignées mutées, le maintien des élevages et la caractérisation phénotypique avales sont lourds à mettre en œuvre et nécessitent des moyens humains et aussi des infrastructures que nous n'avons pas actuellement. Nous devons donc définir quel serait le candidat le plus pertinent, une protéine impliquée dans la transmission de Potyvirus ou de Cucumovirus serait une priorité absolue.

## Récepteurs d'autres virus non-circulants

---

Elargir nos travaux de recherche à des virus d'intérêt agronomique aussi transmis sur le mode non-circulant fait partie intégrante de mon projet depuis le début de ma thèse. Nous avons choisi deux modèles principaux déjà évoqués dans ce rapport, le TuMV (Potyvirus) qui infecte principalement les brassicacées, et le CMV (Cucumovirus) qui possède un large spectre d'hôtes et qui peut infecter plus de 1200 espèces végétales (mono- et dicotylédones, herbacées, arbustes et arbres). Le TuMV est transmis selon la stratégie Helper. C'est la protéine HC-Pro qui interagit avec le récepteur chez le puceron (Pirone and Blanc, 1996). Des études sont actuellement en cours pour déterminer la structure 3D de HC-Pro (collaboration équipe de **Patrick Bron**, CBS, Inserm, Montpellier). Le CMV est transmis selon la stratégie capsidale, c'est-à-dire qu'il interagit directement via la capsidale avec le récepteur dans les stylets du puceron. La structure 3D de la particule virale a été résolue (Smith et al., 2000). Certaines boucles, exposées en surface, sont susceptibles d'interagir avec le vecteur, mais rien n'a été formellement démontré (Bricault and Perry, 2013). Ces deux virus sont transmis par un grand nombre d'espèces de puceron. Leur site de rétention probable est la pointe des stylets maxillaires (Martin et al., 1997 ; Powell, 2005).

Nous avons développé de nombreuses approches, notamment au cours du Master 2 de **Maëlle Thillier**, des post-doctorats de **Craig Webster** et **Baptiste Monsion**, et maintenant de la thèse de **Maëlle Deshoux**, mais beaucoup n'ont pas abouti. Nous avons tenté depuis 2006 de mettre en place des tests d'interaction in vitro sur stylets disséqués sans y arriver, et ne pas bénéficier de cette approche a été jusque là un grand frein pour caractériser les récepteurs de ces virus. Quelques-unes des expériences résumées ci-après nous portent à penser qu'il y aurait plusieurs récepteurs de virus non-circulants dans les stylets.

- En MET, nous avons observé le TuMV et le CMV principalement à l'extrémité distale, dans le canal alimentaire, proche de l'acrostyle. En ce qui concerne le CMV, du matériel dense aux électrons, marqué spécifiquement par un anticorps dirigé contre la protéine de capsidale du CMV, est aussi retrouvé sur l'acrostyle. En ce qui concerne le TuMV, il est difficile de conclure que les récepteurs de ce virus ne sont pas du tout dans le canal commun. C'est un virus filamenteux contrairement aux deux autres modèles étudiés, et il n'est pas exclu que le protocole utilisé affecte les virus dans une zone plus accessible aux solvants, ou aux fixateurs utilisés lors du traitement des échantillons.
- Nous avons réalisés des tests de compétitions (collaboration **Alberto Fereres**, CSIC, Madrid et **Rodrigo Almeida**, UC Berkeley, California) avec des virus qui sont acquis soit

au cours d'un même repas, soit au cours de repas séquentiels. Ces tests montrent que le CaMV et le TuMV n'interfèrent pas l'un avec l'autre, ce qui est plutôt en faveur de deux récepteurs différents. Les résultats sont par contre difficiles à interpréter clairement dans le cas du CMV car contradictoires selon le design expérimental utilisé.

- Nous n'avons pas réussi à démontrer une interaction entre les stylines et HC-Pro ou la protéine de capsid du CMV quelles que soient les approches utilisées. En parallèle à nos travaux, une étude chinoise publiée en 2017 a cependant montré que la protéine de capsid du CMV interagissait en levure avec une protéine du puceron *M. persicae* nommée MPCP4 qui n'est autre que Stylin-01 (Liang and Gao, 2017). Le rôle de Stylin-01 dans la transmission du CMV n'a cependant pas encore été établi.

Même si les données que nous avons n'indiquent pas clairement que le TuMV est retenu sur l'acrostyle, nous programmons de regarder si une des stylines que nous avons identifiées joue un rôle dans la transmission de ce virus, tout comme nous allons le tester pour le CMV. Nous utiliserons pour cela les lignées KO-stylin-01. Nous silencerons également les autres stylines par RNAi.

## Rôle de l'acrostyle dans les interactions plante/insecte

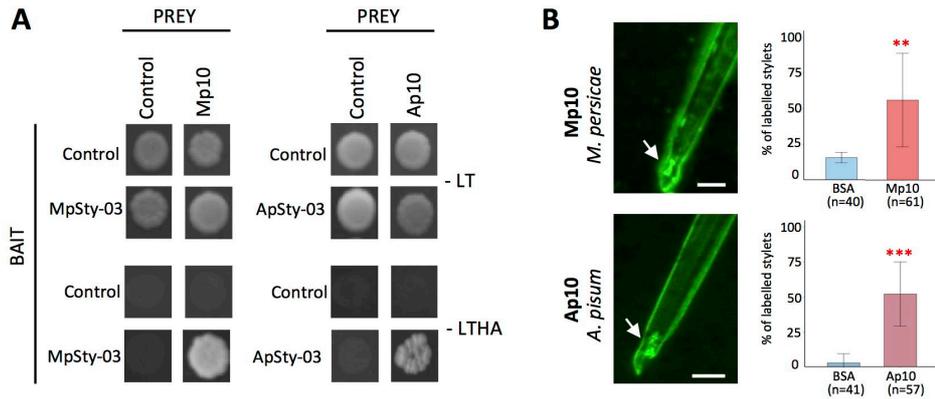
---

J'ai commencé à étudier cette question pendant la thèse de **Maëlle Deshoux** que j'encadre, et ceci en collaboration avec les équipes d'**Alberto Ferreres** (CSIC, Madrid, Espagne) et **Saskia Hogenhout** (JIC, UK).

L'acrostyle a forcément un rôle pour le puceron en dehors de toute transmission de pathogènes. Il se trouve à la pointe des stylets maxillaires, à la confluence des canaux alimentaire et salivaire, au contact direct du contenu des cellules de la plante ou de la sève, et de la salive du puceron. La propriété de rétention/relargage mise en évidence avec les virus, pourrait être la fonction primaire de l'acrostyle avec la rétention de composés provenant du puceron ou de la plante, et il jouerait ainsi un rôle au moment où l'insecte entre en contact avec la plante qu'elle soit hôte ou non hôte, peut-être en régulant l'ingestion ou l'éjection de composés qui favorisent l'alimentation du puceron. On sait que la plante met en place des défenses locales ou systémiques lorsqu'elle est attaquée par un insecte. On sait qu'en plus d'éliciteurs, la salive du puceron contient des effecteurs capables de bloquer la mise en place de ces défenses (Jaouannet et al., 2014 ; Kaloshian and Walling, 2016 ; Rodriguez and Bos, 2013), dont certains commencent à être caractérisés (Cui et al., 2019 ; Pitino et al., 2011; Rodriguez et al., 2017 ; Wang et al., 2015). L'acrostyle pourrait jouer un rôle de « concentrateur » de molécules utiles à son installation sur la plante, ou un rôle de « filtre » de molécules nocives.

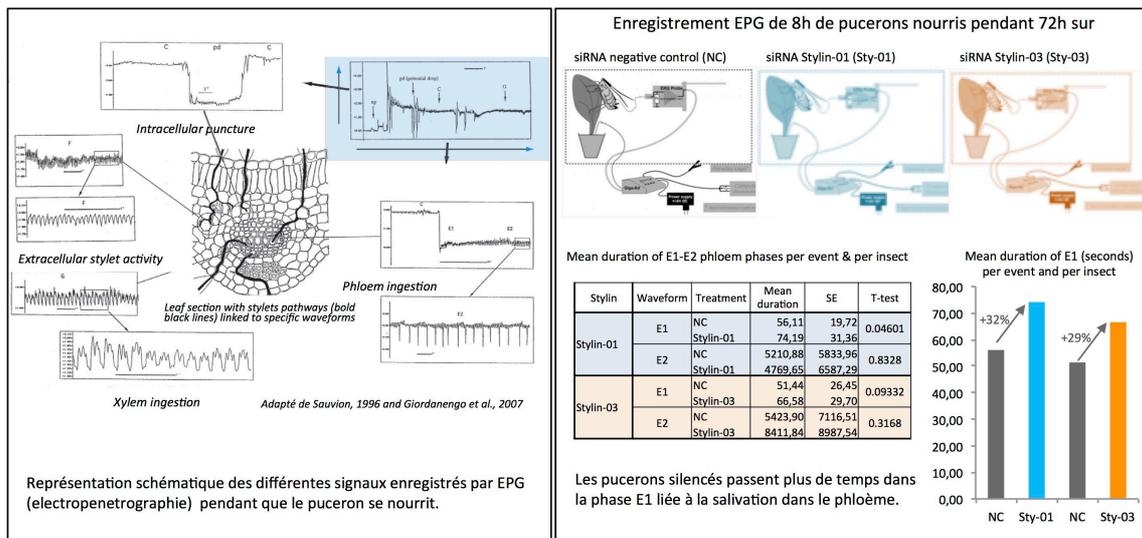
Ce qui nous intéresse ici c'est de montrer que l'acrostyle interagit avec des composés autres que viraux, ce qui apporterait des informations sur le rôle de cet organe. Nous voudrions également voir si nous pouvons impacter l'alimentation ou l'installation du puceron sur une plante en perturbant la surface de l'acrostyle (changement de sa composition en diminuant la quantité de stylines par exemple).

La première hypothèse que nous avons testée était que l'acrostyle pouvait interagir avec des effecteurs contenus dans la salive de puceron. Les premières données obtenues vont effectivement dans ce sens. Nous avons commencé à rechercher des interactions en système double hybride chez la levure avec les effecteurs les mieux caractérisés au début de la thèse de Maëlle. Nous avons vu que l'effecteur Mp10 interagissait avec la protéine Stylin-03 en levure (Fig. 24A). Cet effecteur est un des premiers décrits chez le puceron (Bos et al., 2010).



**Figure 24. L'effecteur Mp10 interagit avec la protéine Stylin-3 et s'accroche sur l'acrostyle *in vitro*.**

(A) L'effecteur Mp10 (*M. persicae*) ou son orthologue Ap10 (*A. pisum*) interagissent avec la protéine Stylin-3 en système double hybride chez la levure. (B) Mp10 et Ap10 ont été produites chez *E. coli* et purifiées puis couplées chimiquement à un fluorochrome. Ces protéines ont été incubées sur stylets disséqués. Plus de 50% de stylets étaient marqués au niveau de l'acrostyle. En revanche, la protéine BSA utilisée en contrôle interagit peu avec les stylets de puceron. Barres de mesure : 5 µm.



**Figure 25. Impact du silencing *stylin-01* ou *stylin-03* sur l'alimentation du puceron.**

(A) Représentation schématique des phases enregistrées par électropénétrographie quand le puceron se nourrit. (B) La durée des phases d'alimentation liées au phloème sont indiquées pour les pucerons contrôles ou silencés *stylin-01* (en bleu), ou *stylin-03* (en orange). Seule la phase de salivation est allongée chez les pucerons silencés. La phase d'ingestion (E2) n'est pas impactée.

De manière intéressante, la protéine Mp10, clonée et produite chez *E. coli*, interagit avec l'acrostyle. Cette expérience a été réalisée avec deux espèces de puceron différentes *A. pisum* et *M. persicae*, en incubant les stylets disséqués avec une solution protéique purifiée couplée à un fluorochrome (Fig. 24B). En comparaison, peu de stylets étaient marqués dans les mêmes conditions d'incubation lorsque la protéine BSA était utilisée en contrôle. Il faudra confirmer cette interaction en regardant par exemple si Mp10 s'accroche toujours sur les stylets de pucerons silencés Stylin-03. Par ailleurs, des expériences d'interaction Mp10-Stylin-03 *in vitro* ont été démarrées. Nous nous confrontons une nouvelle fois aux mêmes problèmes que ceux évoqués avec Stylin-01 et P2-CaMV que nous n'avons pas réussi à surmonter ici.

En parallèle, le comportement de pucerons silencés a été analysé par électropénétrographie (EPG). Nous avons vu que diminuer l'expression de *stylin-01* ou de *stylin-03* impactait deux phases d'alimentation liées à la salivation: les ponctions intracellulaires (pds), et la phase E1 liée à la salivation dans les tubes criblés (Fig. 25). Il semblerait que les pucerons silencés salivent plus longtemps.

L'hypothèse du rôle de l'acrostyle dans la régulation de l'éjection d'effecteurs salivaires prend du poids, et nous allons poursuivre ces travaux. Nous testerons notamment la capacité de l'acrostyle à interagir avec d'autres effecteurs. Actuellement, nous mettons au point la production et la purification de trois autres effecteurs, certains présents dans la salive aqueuse, d'autres retrouvés dans la salive gélifiée (Mugford et al., 2016). Nous étudierons le comportement des pucerons KO Stylin-01. Nous évaluerons aussi l'impact du silencing de Stylin-02 et Stylin-04 sur l'alimentation du puceron, pour voir si l'effet observé avec Stylin-01 et Stylin-03 est spécifique ou généralisable à toutes les protéines en surface de l'acrostyle. Il faudra pour cela améliorer l'efficacité de silencing de ces stylines qui est encore plus variable et plus faible que ce que nous obtenons avec Stylin-01 ou Stylin-03. Un protocole récent décrit une amélioration conséquente de l'efficacité de silencing chez *A. pisum* par pré-exposition des insectes à des ARNdb exogènes (Ye et al., 2019). C'est une piste à explorer et nous consacrerons quelques essais prochainement pour voir si nous pouvons adapter ce protocole au laboratoire avec l'injection de siRNA, et si nous pouvons aussi obtenir un effet similaire en délivrant les ARN par voie orale. Nous évaluerons aussi la pertinence de générer des mutants KO Stylin-03.

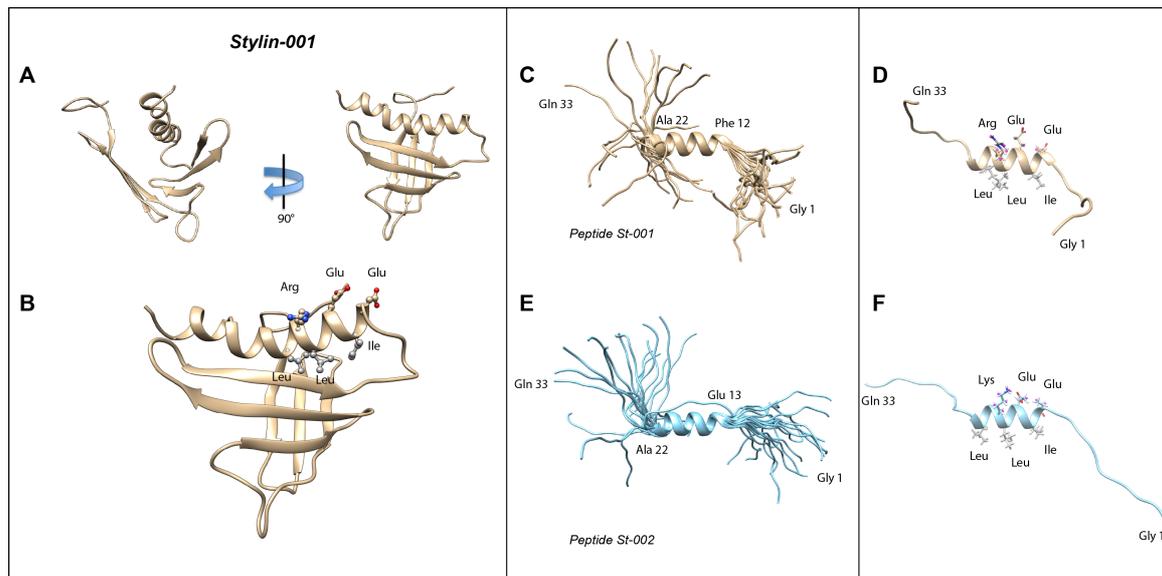
## L'acrostyle, un organe à cibler

---

Nos données indiquent que l'acrostyle joue un rôle dans la transmission de virus non-circulants, et probablement aussi dans l'alimentation du puceron. Cibler cet organe et masquer ces sites actifs ou limiter ses fonctions paraît donc doublement intéressant. Nous avons accumulé un certain nombre de données qui permettent d'envisager certaines pistes, mais je pense que nous devons d'abord poursuivre nos efforts pour caractériser encore plus finement l'interface acrostyle-virus ou acrostyle-effecteur et obtenir des informations structurales, avant de nous lancer pleinement dans cette question.

Nous pouvons envisager des approches sans *a priori* pour rechercher des molécules qui seraient très affines pour les stylines. L'approche phage display a été utilisée par d'autres groupes avec succès pour identifier des peptides pouvant bloquer la transmission de virus (Liu et al., 2010). Il faudrait dans ce cas utiliser les peptides ou domaines exposés en surface de l'acrostyle et les protéines entières. On peut aussi envisager d'utiliser des chimiothèques par exemple. Cependant, nous devons d'abord trouver un moyen de produire des stylines qui soient correctement repliées. Avec nos collaborateurs structuralistes et chimistes, nous essayons toujours de trouver le moyen de favoriser ce repliement. Pour le moment, les analyses

structurales de Stylin-01 et Stylin-02 ont été réalisées *in silico* en utilisant le serveur Raptor X (Fig. 26 A-B). Comme attendu, les modèles sont très similaires. Ils prédisent que les extrémités N- et C-terminales sont localisées sur la même face de la protéine. Les feuilletts centraux qui correspondent au domaine RR forment un beta-sandwich orthogonal sur lequel viendrait se positionner une hélice  $\alpha$  qui correspond au domaine C-terminal. Pour chacune des deux stylines, un peptide de 33 acides aminés contenant la zone exposée en surface a été synthétisé et sa structure résolue par résonance magnétique nucléaire (RMN). La structure obtenue confirme le modèle prédit (Fig. 26C-F). Cette structure montre aussi que les 10 derniers résidus sont très flexibles. Cela pourrait faciliter les interactions avec les partenaires viraux, ou d'autres composés. Il serait intéressant à l'avenir de voir si on peut modéliser l'interaction avec la protéine virale P2.



**Figure 26. Structure tridimensionnelle de Stylin-01 et Stylin-02.**

(A-B) Modèle 3D de Stylin-01 obtenu avec RaptorX. La protéine adopte une conformation avec un B-sandwich orthogonal avec une hélice positionnée au sommet. (C-D) Structures 3D des 33 acides aminés C-terminaux de Stylin-01 et (E-F) Stylin-02 résolues par RMN. Chaque peptide forme une hélice amphipathique avec 3 résidus hydrophobes sur une face, et 3 résidus chargés sur la phase opposée. Deux régions désordonnées entourent cette hélice.

Une autre piste serait d'utiliser des interactants connus de l'acrostyle et de produire des peptides dérivés qui serait capables de venir saturer l'acrostyle et de limiter ainsi l'accrochage d'autres molécules. La protéine virale P2 est justement un bon candidat puisqu'elle se fixe de manière homogène à la surface de l'acrostyle. Comme c'est la protéine du CaMV qui interagit avec le récepteur, obtenir sa structure 3D a été un leitmotiv non seulement pour moi depuis que je travaille sur ce projet, mais avant moi celui de Stéphane Blanc (notamment au travers de la thèse de Eugénie Hébrard), et de nos collaborateurs. Cette protéine possède la particularité de polymériser sous forme de paracrystaux, ce qui rend difficile sa purification. Eugénie a néanmoins défini des conditions de purification de cette protéine qui lui permettait d'obtenir une solution biologiquement active mais faiblement concentrée, ce point étant un frein pour une analyse structurale aval (Hébrard et al., 2001). La production de la protéine P2 entière et sa purification posant un certain nombre de problèmes techniques, nous avons décidé de cloner et produire des versions partiellement tronquées de la protéine qui préserverait le domaine N-terminal de P2 fortement suspecté d'être en interaction avec le récepteur (Moreno et al., 2005).

Une protéine tronquée que nous appelons P2C a cristallisé en fines aiguilles et certains cristaux ont diffracté de manière suffisante pour permettre l'obtention d'un modèle 3D à 1,7 Å de résolution. Ce modèle est toujours en cours d'analyse par nos collaborateurs **François Hoh** et **Patrick Bron** et ne sera pas montré ici. Il apporte des informations cruciales sur les acides aminés qui pourraient être impliqués dans l'interaction avec le récepteur. Pour valider nos hypothèses, nous devons dans un futur proche générer des mutants de P2 et voir si nous affectons la capacité à se lier à l'acrostyle. Nous réaliserons également des virus mutants pour vérifier si nous diminuons la transmission de plante à plante par puceron quand nous changeons les acides aminés prédits pour interagir avec le récepteur.

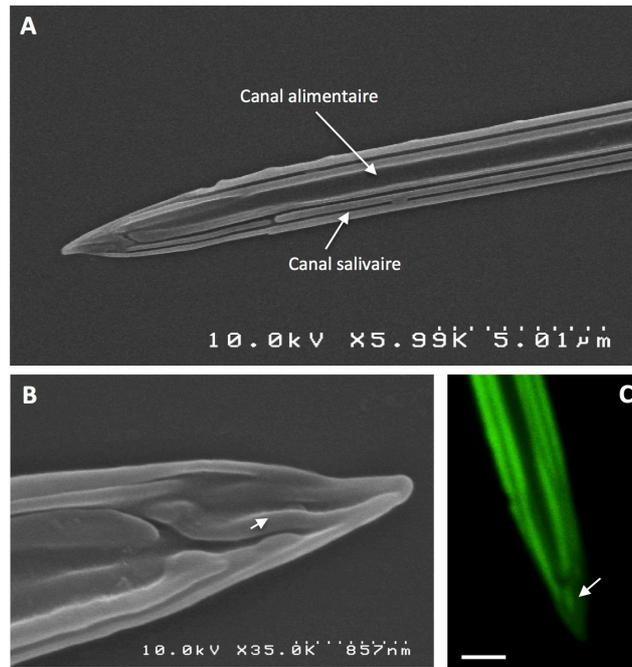
Cette étude est le reflet même de tout le programme, un travail de longue haleine, un travail collaboratif et qui conduit, si on est patient, à de beaux résultats. Il aura fallu tout de même 20 ans pour obtenir cette belle structure !

## L'acrostyle est-il une singularité du puceron ?

---

A quelques exceptions près très peu décrites dans la littérature, les pucerons sont responsables à eux-seul de la quasi totalité des cas de transmission de virus non-circulants dont les récepteurs sont situés au niveau des stylets (stylet-borne viruses). Ayant maintenant connaissance de l'existence de l'acrostyle, on peut se demander si c'est cet organe qui est la cause de la suprématie des pucerons pour la transmission des virus non-circulants. Il serait intéressant de voir si une structure similaire existe chez d'autres insectes piqueurs-suceurs vecteurs de pathogènes de plante ou même de pathogènes animaux, et voir dans quelle mesure nos travaux pourraient être transférés vers d'autres modèles. Ce ne sera pas le cœur de mon projet futur, mais je suis très intéressée par ce parallèle éventuel, j'ai déjà investi un peu de temps sur cette question et je compte le faire autant que possible au cours des prochaines années.

Je vous présente brièvement les premières investigations que nous avons réalisées sur cette question. L'acrostyle a été retrouvé pour le moment chez toutes les espèces dans lesquelles je l'ai recherché. Mais cette recherche reste toutefois dans des proportions très modestes (0,5% des espèces de pucerons décrites), et a regroupé principalement des espèces de la sous-famille des *Aphidinae*, dans laquelle on retrouve la quasi-totalité des espèces vectrices connues. Il y a quelques temps, nous avons aussi observé des stylets de cicadelles (*Cicadulina mblila*) et d'aleurodes (*Bemisia tabaci*) en MET. Nous n'avons pas pu voir de structure qui ressemblerait à l'acrostyle. Nous avons aussi visualisé en MEB les stylets de la cochenille *Phenacoccus aceris*, notamment vecteur d'Ampelovirus et de Vitivirus sur vigne. Cette étude a été faite dans le cadre de la thèse **d'Antoine Alliaume** au travers d'une collaboration avec **Etienne Herrbach** (Inra, Colmar) pour notamment rechercher les sites d'accrochage éventuels des virus dans les stylets. Nous n'avons pas observé d'acrostyle à la pointe des stylets maxillaires et il ne semble pas y avoir de canal commun où salive et sève pourraient être en contact (Fig. 27). Par contre, il y a une arête à la pointe des stylets. En raison de sa forme particulière et de sa connexion avec le canal salivaire, nous avons émis l'hypothèse qu'elle puisse jouer un rôle de valve qui ouvrirait ou fermerait le canal salivaire alors que les stylets pénètrent les tissus pendant les phases d'alimentation de l'insecte. Cela pourrait faciliter ou optimiser le mélange salive/sève lors de l'ingestion de nourriture.



**Figure 27. Stylets maxillaires de *Phenacoccus aceris*.**

(A-B) Observation de la pointe d'un stylet maxillaire en microscopie électronique à balayage. Une arête est visible à l'extrémité distale (flèche blanche en B) dans la zone où l'acrostyle est observé chez le puceron. (C) Cette arête est aussi observable en microscopie confocale. Barres de mesure : (A-B) indiquées directement sur l'image, (C) 2  $\mu$ m.

Pour clôturer ce tour d'horizon, je voulais brièvement signaler que j'ai démarré très récemment une collaboration avec **Paolo Gabrieli** (Université de Milan, Italie) qui étudie les interactions hôte/pathogène/vecteur chez le moustique, au travers de deux appels à projets auxquels nous venons tout juste de répondre, notamment pour comprendre et comparer la biogenèse des stylets de puceron et du proboscis des moustiques au cours du dernier stade de développement des insectes, et caractériser les interactions salive-proboscis chez le moustique.

Nous voyons au travers de ces quelques études que la pointe des stylets maxillaires est un matériau tout à fait exceptionnel doté de propriétés mécaniques, telles que la souplesse pour se faufiler entre les cellules, ou la résistance pour pénétrer les tissus, et de propriétés de surface uniques -au moins chez le puceron- comparé au reste de la cuticule des stylets qui lui permet d'interagir avec des molécules endogènes ou exogènes. Au-delà de mon projet centré sur l'acrostyle en lien avec la propagation d'épidémies virales ou les interactions durables avec la plante hôte, les connaissances que nous avons accumulées au cours de ce travail sont reprises par certains de mes collaborateurs pour caractériser les propriétés physiques ou mécaniques de l'acrostyle, un micro-organe qui recèle sans doute d'autres propriétés intéressantes.

---

Certains résultats présentés dans ce chapitre sont publiés :

- Alliaume A., et al. (2018). Mouthparts morphology of the mealybug *Phenacoccus aceris*. *Bulletin of Insectology*. 71 (1):1-9.
- Le Trionnaire G., et al. (*in press*). An integrated protocol for targeted mutagenesis with CRISPR-Cas9 system in the pea aphid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*.

## Références bibliographiques

- Blanc, S., Cerutti, M., Chaabihi, H., Louis, C., Devauchelle, G., Hull, R., 1993a. Gene II product of an aphid-nontransmissible isolate of cauliflower mosaic virus expressed in a baculovirus system possesses aphid transmission factor activity. *Virology* 192, 651-654.
- Blanc, S., Schmidt, I., Kuhl, G., Esperandieu, P., Lebeurier, G., Hull, R., Cerutti, M., Louis, C., 1993b. Paracrystalline structure of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor produced both in plants and in a heterologous system and relationship with a solubilized active form. *Virology* 197, 283-292.
- Blanc, S., Schmidt, I., Vantard, M., Scholthof, H.B., Kuhl, G., Esperandieu, P., Cerutti, M., Louis, C., 1996. The aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus forms a stable complex with microtubules in both insect and plant cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 93, 15158-15163.
- Bos, J.I.B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M.E., Win, J., Hogenhout, S.A., 2010. A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet* 6, e1001216.
- Bricault, C.A., Perry, K.L., 2013. Alteration of intersubunit acid-base pair interactions at the quasi-threefold axis of symmetry of Cucumber mosaic virus disrupts aphid vector transmission. *Virology* 440, 160-170.
- Cheng, R.H., Olson, N.H., Baker, T.S., 1992. Cauliflower mosaic virus: a 420 subunit (T = 7), multilayer structure. *Virology* 186, 655-668.
- Choi, M.Y., Vander Meer, R.K., 2012. Molecular Structure and Diversity of PBAN/pyrokinin Family Peptides in Ants. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 32.
- 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.
- Cui, N., Lu, H., Wang, T., Zhang, W., Kang, L., Cui, F., 2019. Armet, an aphid effector protein, induces pathogen resistance in plants by promoting the accumulation of salicylic acid. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374, 20180314.
- Drucker, M., Froissart, R., Hebrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Esperandieu, P., Mani, J.C., Pugniere, M., Roquet, F., Fereres, A., Blanc, S., 2002. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2422-2427.
- Fereres, A., Moreno, A., 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res* 141, 158-168.
- Guilley, H., Richards, K.E., Jonard, G., 1983. Observations concerning the discontinuous DNAs of cauliflower mosaic virus. *Embo J* 2, 277-282.
- Hébrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T., Uzest, M., Froissart, R., Strub, J.-M., Sanglier, S., van Dorsselaer, A., Padilla, A., Labesse, G., Blanc, S., 2001. Biochemical Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus. *J. Virol.* 75, 8538-8546.
- 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.
- Hull, R., Covey, S.N., 1983. Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA forms isolated from infected turnip leaves. *Nucleic Acids Res* 11, 1881-1895.
- Jaouannet, M., Rodriguez, P.A., Thorpe, P., Lenoir, C.J.G., MacLeod, R., Escudero-Martinez, C., Bos, J.I.B., 2014. Plant immunity in plant-aphid interactions. *Frontiers in plant science* 5, 663.
- Kaloshian, I., Walling, L.L., 2016. Hemipteran and dipteran pests: Effectors and plant host immune regulators. *J Integr Plant Biol* 58, 350-361.
- Kanakala, S., Ghanim, M., 2016. RNA Interference in Insect Vectors for Plant Viruses. *Viruses* 8.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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, 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.
- Martinière, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S., Drucker, M., 2009. A Role for Plant Microtubules in the Formation of Transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant J* 58, 135-146.
- Masson, V., Arafah, K., Voisin, S., Bulet, P., 2018. Comparative Proteomics Studies of Insect Cuticle by Tandem Mass Spectrometry: Application of a Novel Proteomics Approach to the Pea Aphid Cuticular Proteins. *Proteomics* 18.
- Mesnard, J.M., Mougeot, J.L., Geldreich, A., Lebourier, G., 1993. Characterization of different electrophoretic forms of cauliflower mosaic virus virions (strain Cabb-S). *Biochimie* 75, 645-649.
- Modjtahedi, N., Volovitch, M., Mazzolini, L., Yot, P., 1985. Comparison of the predicted secondary structure of aphid transmission factor for transmissible and non-transmissible cauliflower mosaic virus strains. *FEBS Letter* 181, 223-228.
- 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.
- Moreno-Lozano, A., Palacios, I., Blanc, S., Fereres, A., 2005. Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of Cauliflower mosaic virus by its major vectors, *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. *Annals of the Entomological Society of America* In press.
- Mugford, S.T., Barclay, E., Drurey, C., Findlay, K.C., Hogenhout, S.A., 2016. An Immuno-Suppressive Aphid Saliva Protein Is Delivered into the Cytosol of Plant Mesophyll Cells During Feeding. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 29, 854-861.
- Mulot, M., Monsion, B., Boissinot, S., Rastegar, M., Meyer, S., Bochet, N., 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.
- Pfeiffer, P., Hohn, T., 1983. Involvement of reverse transcription in the replication of Cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33, 781-789.
- Pirone, T., Blanc, S., 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 227-247.
- 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.
- Ponsen, M.B., 1972. The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, *Myzus persicae*: an anatomical study. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 72, 1-147.
- Powell, G., 2005. Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses. *J Gen Virol* 86, 469-472.
- Rodriguez, P.A., Bos, J.I.B., 2013. Toward understanding the role of aphid effectors in plant infestation. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 26, 25-30.
- Rodriguez, P.A., Escudero-Martinez, C., Bos, J.I.B., 2017. An Aphid Effector Targets Trafficking Protein VPS52 in a Host-Specific Manner to Promote Virulence. *Plant physiology* 173, 1892-1903.

- Smith, T.J., Chase, E., Schmidt, T., Perry, K.L., 2000. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cowpea chlorotic mottle virus. *J Virol* 74, 7578-7586.
- Stavolone, L., Herzog, E., Leclerc, D., Hohn, T., 2001. Tetramerization is a conserved feature of the virion-associated protein in plant pararetroviruses. *J Virol* 75, 7739-7743.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., Hohn, T., 2005. A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6219-6224.
- Tagu, D., Klingler, J.P., Moya, A., Simon, J.C., 2008. Early progress in aphid genomics and consequences for plant-aphid interactions studies. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 701-708.
- Taning, C.N.T., Van Eynde, B., Yu, N., Ma, S., Smagghe, G., 2017. CRISPR/Cas9 in insects: Applications, best practices and biosafety concerns. *Journal of Insect Physiology* 98, 245-257.
- Taylor, C.E., Robertson, W.M., 1974. Electronmicroscopy evidence for the association of tobacco severe etch virus with the maxillae of *Myzus persicae* (Sulzer). *Phytopathol. Z.* 80, 257-266.
- Wang, W., Luo, L., Lu, H., Chen, S., Kang, L., Cui, F., 2015. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. *Scientific reports* 5, 8885.
- Willis, J.H., 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 189-204.
- Ye, C., Jiang, Y.-D., An, X., Yang, L., Shang, F., Niu, J., Wang, J.-J., 2019. Effects of RNAi-based silencing of chitin synthase gene on moulting and fecundity in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Scientific reports* 9, 3694.