

ÉCOLE DOCTORALE 414

UMR 1131 : Santé de la Vigne et Qualité du Vin

THÈSE présentée par :

Maxime VERDIER

soutenue le : **12 octobre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie des organismes : développement et physiologie

**Manipulation virale, comment les virus de
plante influencent hôte et vecteur pour
favoriser leur transmission ?**

THÈSE dirigée par :

M. DRUCKER Martin

Directeur de Recherche, INRAE - Colmar

Co-encadrée par :

M. CHESNAIS Quentin

Chargé de Recherche, INRAE - Colmar

RAPPORTEURS :

M^{me} VAN MUNSTER Manuella

Chargée de Recherche, INRAE - Montpellier

M. MICHALAKIS Yannis

Directeur de Recherche, CNRS - Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M^{me} BOISSOT Nathalie

Chargée de Recherche, INRAE - Avignon

M^{me} CORTESERO Anne Marie

Professeure, Université de Rennes

M. RITZENTHALER Christophe

Directeur de Recherche, CNRS - Strasbourg

Cette thèse a été financée par l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de l'Université de Strasbourg et l'Agence Nationale de la Recherche (Projet ROME ANR-18-CE20-0017-01).

Elle a été préparée au sein de l'UMR INRAE 1131
Santé de la Vigne et Qualité du Vin.

Centre INRAE, Centre de Colmar
28 Rue de Herrlisheim
68000 Colmar
FRANCE

Table des matières

Remerciements	1
Introduction générale	3
Introduction bibliographique	6
I - La transmission des phytovirus.....	6
A) La transmission verticale.....	6
B) La transmission horizontale	7
II - Les modes de transmission des virus.....	8
A) Les virus propagatifs	10
B) Les stratégies d'interaction avec le vecteur	11
III – Les pucerons, vecteurs de phytovirus.....	12
A) Biologie générale des pucerons	12
B) Influence des symbiotes sur la biologie des pucerons	13
C) Comportement de choix d'une plante hôte	14
D) Anatomie buccale permettant la vexion	17
E) Comportement alimentaire des pucerons et transmission virale	18
III – La manipulation virale par les phytovirus	19
A) Contraintes évolutives liées aux génomes des (phyto)virus.....	22
B) La manipulation du phénotype de la plante hôte.....	23
C) Les aspects les moins étudiés de la manipulation par les phytovirus	26
Description des modèles biologiques utilisés lors de la thèse	28
I – <i>Myzus persicae</i>	28
II – Le cauliflower mosaic virus	29
A) Généralités.....	29
B) Gamme d'hôte, symptomatologie et tropisme tissulaire.....	29
C) Les protéines du CaMV	30
D) Transmission du CaMV.....	33
III – Le turnip yellows virus	34
A) Généralités.....	34
B) Gamme d'hôte, symptomatologie et tropisme tissulaire.....	34
C) Les protéines du TuYV.....	35
D) Transmission du TuYV	37

Chapitre 1 : Effets du CaMV sur le comportement de son vecteur <i>Myzus persicae</i>	38
Résumé du chapitre 1	39
<i>Article 1: Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected Arabidopsis</i>	412
<i>Article 2: The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector <i>Myzus persicae</i> to facilitate transmission</i>	52
Chapitre 2 : Effets du TuYV sur le comportement de son vecteur <i>Myzus persicae</i>	71
Résumé du chapitre 2	72
<i>Article 3 : The turnip yellows virus capsid protein promotes access of its aphid vector to phloem tissues</i>	74
Chapitre 3 : Etude des effets post-acquisitions du TuYV et du CaMV sur <i>Myzus persicae</i>	97
Résumé du chapitre 3	98
<i>Article 4 : Post-acquisition effects on aphid vectors are related to the plant virus transmission mode and correlate with metabolic modifications of the host plant</i>	100
Chapitre 4 : Etude des effets du TuYV et du CaMV sur le transcriptome de <i>Myzus persicae</i> ..	122
Résumé du chapitre 4	123
<i>Article 5: Transcriptome responses of the aphid vector <i>Myzus persicae</i> are shaped by identities of the host plant and the virus</i>	125
<i>Validation fonctionnelle</i>	152
Discussion générale	165
Le CaMV, un virus aux multiples stratégies de manipulation.....	165
Identifications des protéines virales impliquées dans la manipulation par le CaMV.....	165
Les effets manipulateurs des virus semi-persistants.....	166
Les facteurs viraux candidats à la manipulation par le TuYV.....	167
Identifications des protéines virales impliquées dans la manipulation par le TuYV	168
Vers d'autres facteurs viraux impliqués dans la manipulation.....	169
Physiologie des pucerons virulifères.....	172
Vers le métabolome de pucerons virulifère ?	172
Identification des voies de signalisations manipulées par les virus.....	175
Validation fonctionnelle des gènes candidats chez les pucerons	175
Validation fonctionnelle des gènes candidats de plantes	177
Ouverture	180
Bibliographie	183

Annexes	214
Annexe 1 : Contributions scientifiques issues de la thèse	214

Remerciements

Mes plus sincères remerciements à mes deux encadrants de thèse, Martin Drucker et Quentin Chesnais sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir fait confiance lors de ma candidature en stage de M2, merci de m'avoir soutenu et préparé pour le concours de l'École Doctorale, et merci pour ces trois ans d'aventure au cours de la thèse. Martin, je te remercie tout particulièrement pour ton pragmatisme, tes idées éclairées et la grande liberté que tu m'as offerte au cours du projet que tu as écrit, puis que tu m'as confié pour que je me l'approprie. Quentin, je te remercie vivement pour ton optimisme et ta bonne humeur au quotidien, pour tes conseils, et tout le temps que tu m'as accordé afin de m'apprendre le métier de chercheur. Un grand merci à vous deux de m'avoir offert cette chance de faire de la Science.

Je tiens aussi à remercier Véronique Brault pour ses relectures, sa bienveillance, ses recommandations et son temps accordé lors des réunions de laboratoire, malgré ses fonctions de Directrice d'Unité.

Je souhaite remercier Manuella Van Munster, Chargée de Recherche INRAE à Montpellier et Yannis Michalakakis, Directeur de Recherche CNRS à Montpellier, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Anne-Marie Cortesero, Professeure à l'Université de Rennes, Natalie Boissot, Chargée de Recherche INRAE à d'Avignon, et Christophe Ritzenthaler, Directeur de recherche au CNRS à Strasbourg, d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche.

Je remercie également Mylène Ogliastro Directrice de Recherche à Montpellier et Cheffe du département INRAE Santé et Protection des Plantes (SPE), Maëlle Jaouannet Chargée de Recherche INRAE à Montpellier et Philippe Hugueney Directeur de Recherche INRAE à Colmar d'avoir accepté de participer à mon comité de suivi de thèse, et pour leurs conseils avisés.

Je remercie vivement, pour leur temps et leur aide, toutes les personnes qui ont participé activement à l'avancée de cette thèse, Sylvaine Boissinot, Lucie Vonthron, Benoit Hoarau, Raymonde Baltenweck et Philippe Hugueney.

J'adresse un grand merci à tous les membres de l'équipe « Aphid team » que je n'ai pas encore cité, Claire Villeroy, Anabella Heintz, Souheyla Khechmar, Aurélie Marmonier, et Hélène Schlaefli.

Je souhaite remercier tout particulièrement Claire, pour chaque moment passé ensemble, ton humour, ta coupe de cheveux, et ton soutien sans faille. Ces presque quatre ans à Colmar n'auraient pas été les mêmes sans toi, kiwi.

Merci beaucoup à Anabella, Pierre et Yuan pour toutes nos sorties, nos rires et votre patience sur overcooked. Un merci tout particulier à Ana et Pierre qui se sont bien occupé de moi quand j'avais un pied dans le plâtre... Et merci à toi Yuan, pour toutes nos sorties « en ville », à Colmar bien plus qu'ailleurs, la nuit est jeune.

Erwan et Guillaume, ça fait maintenant plus de dix ans que l'on se connaît, je signe pour dix ans supplémentaires. Merci d'avoir été là et d'avoir participé d'une certaine façon à cette thèse.

Bien évidemment je remercie mes parents, qui m'ont toujours soutenu, sur lesquels je peux toujours compter et qui m'ont permis et encouragé à faire des études. Merci Maman, merci Papa, pour tout.

Et enfin merci à toi, ma Clara. J'espère bientôt, pouvoir enfin être proche de toi.

Introduction générale

L'infection virale d'une plante hôte susceptible provoque souvent des altérations physiologiques réduisant l'activité photosynthétique, augmentant la respiration cellulaire, l'accumulation de composés azotés et activant des phénomènes d'oxydation, conduisant à une altération de l'aspect de la plante (Culver & Padmanabhan, 2008; Osterbaan & Fuchs, 2019). Ces modifications phénotypiques (ou symptômes), associés à une perte de rendement des plantes cultivées ont longtemps justifié et monopolisé l'étude des agents pathogènes des plantes.

Historiquement, les symptômes ont été essentiellement considérés comme des conséquences de l'infection de la plante hôte par un virus pathogène. Les symptômes, et plus généralement le phénotype « infectieux », sont maintenant étudiés à travers une vision éco-évolutive, prenant en compte les interactions entre les différentes espèces nécessaires à l'accomplissement du cycle infectieux incluant le phénomène de transmission (a minima, hôte-virus-vecteur).

Des études récentes prennent également en compte des interactions complémentaires pouvant influencer ou intervenir dans la coévolution de ces trois espèces, à savoir, la communication inter-plantes, la présence d'espèces tiers comme des herbivores, pollinisateurs ou prédateurs du vecteur, mais également des stress d'origine abiotique.

Les plantes étant des espèces sessiles, la majorité des virus de plantes sont transmis par le biais d'un vecteur (Bragard et al., 2013). Les modifications phénotypiques chez l'hôte induites par l'infection sont rarement sans conséquence sur le comportement des vecteurs. Le fait que le virus modifie les traits de son hôte et de fait, puisse avoir une incidence sur sa propre transmission, laisse à penser qu'il est très probable que ces phénomènes n'aient pas échappé à la sélection naturelle. Les symptômes peuvent donc être considérés comme des leviers évolutifs permettant aux virus d'améliorer leur transmission. Les symptômes induits par les virus sont pour certains auteurs un très bon exemple de la notion de « phénotype étendu », à savoir la capacité des gènes d'un organisme donné à moduler son environnement en outrepassant la limitation du simple organisme auquel appartient le génome (Dawkins, 1982).

La modification par un virus du phénotype de l'hôte et/ou du comportement du vecteur favorisant la transmission est un concept évolutif nommé « *host and vector manipulation by plant viruses* » (Mauck et al. 2012), faisant écho à un concept plus général de « manipulation parasitaire » accepté dans la littérature (Poulin 1994; 2010).

Le concept de manipulation parasitaire est redéfini en 1995 avec la parution d'un article de Poulin (1995) qui traite de la distinction parfois complexe entre de réels phénomènes adaptatifs ayant été sélectionnés et de simples dérivés de l'infection. Il donne notamment une liste de bonnes pratiques et de critères permettant de confirmer l'aspect adaptatif de traits observés et de les discriminer des potentiels sous-produits de l'infection qui pourraient aléatoirement influencer certains paramètres de la transmission. Le dernier point abordé étant l'identification d'un ou des facteurs (génétique, protéique ou métabolomique) responsable(s) du phénomène dit de manipulation. Dès le début de la discipline, la nécessité d'obtenir et

de décrire les mécanismes apportant des preuves de l'existence des phénomènes de manipulation avait été annoncée. Rapidement, des travaux de recherche et de revue ont émergé dans le domaine (Hurd, 2003; Lefèvre et al., 2006) validant le terme de manipulation parasitaire ainsi que ses conséquences écologiques (Lefèvre et al., 2009). Les modèles de ces études étaient alors essentiellement des vecteurs hématophages transmettant des pathologies humaines. Par exemple, il a été montré que le plasmodium (*Plasmodium chabaudii*), responsable du paludisme, modifie les odeurs de son hôte pour attirer les moustiques vecteurs lors d'un stade clé de l'infection (De Moraes et al., 2014). Des effets similaires ont été découverts chez les flavivirus tel que les virus Zika ou la Dengue (Zhang et al. 2022). Pour ces derniers, le mécanisme très complexe et élégant a été partiellement identifié. Le virus réduit la production de peptide antimicrobien de son hôte, ce qui modifie la composition de son microbiote cutané. La prolifération de bactéries commensales du genre *Bacillus spp.*, productrices d'acétophénone, va ensuite favoriser l'attraction des moustiques (Zhang et al. 2022).

Malgré le transfert de ces concepts vers le règne végétal dans les années 1990 (Blua & Perring, 1992), ce n'est au cours des années 2010 que les domaines de la biologie et virologie végétale commencent à s'intéresser à l'étude du comportement du vecteur en réponse à l'infection, et son impact sur la transmission. Avec au départ, comme pour l'émergence du terme de « manipulation parasitaire », des auteurs précautionneux sur le réel caractère adaptatif de ce qui sera appelé par la suite en anglais « *host and vector manipulation by plant viruses* » (Mauck et al. 2012; Mauck, De Moraes, and Mescher 2014).

On peut considérer trois mouvements qui se sont rapidement succédés (et chevauchés). Avec dans un premier temps des études, restant généralement descriptives, mettant en évidence des comportements du vecteur modifiés lorsque la plante hôte est infectée. Le premier article en ce sens date de 1960 (Baker 1960) et ne traite que de descriptions purement agronomiques. Bien plus tard, des études bien qu'encore descriptives, lient les observations réalisées à la transmission virale (Fiebig et al., 2004; Mauck et al., 2010; Musser et al., 2003; Shapiro et al., 2012). Avec notamment l'article de Mauck et al. (2012) qui en effectuant un travail de revue, montrent que les modifications comportementales induites par les virus ne sont pas identiques pour tous les virus, mais convergent pour des pathogènes ayant les mêmes modes de transmission, et ce malgré une distance phylogénétique importante au sein des virus constituant ces groupes. Cette observation est un argument de poids appuyant l'hypothèse que les modifications comportementales induites par les virus sont adaptatives. Rapidement, des travaux de modélisation ont pris en compte ces modifications comportementales en les implémentant dans des modèles épidémiologiques, et ont montré des effets majeurs sur la dynamique de la transmission virale (Eigenbrode & Gomulkiewicz, 2022; Gandon, 2018; Roosien et al., 2013). Parmi les facteurs influençant la dynamique de transmission virale, on peut souligner les choix d'hôte différentiels des vecteurs en fonction des plantes saines ou infectées, ou des changements de préférences d'hôte en fonction du statut du vecteurs (porteur ou non du virus) (Ingwell et al., 2012; Medina-Ortega, Bosque-Pérez, et al., 2009; Rajabaskar et al., 2014). Enfin, des travaux holistiques beaucoup plus récents commencent à décrire les mécanismes mis en œuvre par les virus pour modifier le comportement du vecteur. Ils identifient par exemple les composés perçus par le vecteur induisant la modification de son comportement, ou encore les interactants et voies de signalisation impliquées à la fois dans l'hôte et dans le vecteur (Guo et al., 2023; Li et al., 2023; Zhao et al., 2022).

Les travaux rapportés dans cette thèse de doctorat ont pour ambition de faire progresser la compréhension des mécanismes de manipulation parasitaire par les phytovirus évoqués ci-dessus et cherchent à identifier les facteurs génétiques de la relation tripartite Plante-Virus-Vecteur.

Le premier objectif de la thèse était de mettre en évidence des phénomènes éventuels de manipulation virale pour le cauliflower mosaic virus (CaMV) et le turnip yellows virus (TuYV), deux virus au biologie et mode de transmission bien différents. Pour cela, plusieurs mesures comportementales ont été réalisées sur leur vecteur commun, le puceron *Myzus persicae*, communément appelé puceron vert du pêcher (Chapitre 1, 2, et 4). Le deuxième objectif était d'identifier les facteurs protéiques viraux responsables des mécanismes sous-jacents pour chacun des virus (chapitres 1 et 2). Le troisième objectif a été d'étudier les modifications de comportement qui sont effectives après l'acquisition virale et qui peuvent impacter les phénomènes suivants d'inoculation (i.e., effets post-acquisitions) (Chapitre 3). C'est notamment lors de ce chapitre de thèse, que nous avons mis en perspective les effets comportementaux observés en fonction des avantages et contraintes évolutives inféodées au type de transmission propre à chacun des virus employés. Enfin, dans le dernier chapitre, nous nous sommes intéressés aux gènes de pucerons potentiellement détournés à des fins de manipulation, en les identifiant dans un premier temps par RNAseq, puis en cherchant à valider empiriquement leur implication dans les modifications de comportement précédemment observées (Chapitre 4).

Introduction bibliographique

I - La transmission des phytovirus

Dans ce travail de thèse je me suis uniquement intéressé à la transmission virale par l'intermédiaire d'un insecte vecteur (*vecteur-borne transmission*). Ce type de transmission est majoritaire dans la nature et se décline sous différentes formes à travers une grande diversité d'espèces vectrices. Pourtant, elle n'est pas le seul moyen de transmission employé par les virus de plantes pour infecter de nouveaux hôtes. Je commencerai donc par décrire succinctement les types de transmissions verticales de la mère vers la fille, puis les types de transmissions horizontales, qu'ils soient mécaniques ou par vecteurs.

A) La transmission verticale

Par la graine

Plus d'une centaine de virus de plante sont transmis d'une plante parentale vers des descendants via les graines (Johansen et al., 1994; Stace-Smith & Hamilton, 1988). Cependant, les techniques récentes de détection virale dans les semences suggèrent que ce nombre est sous-estimé (Pagán, 2022). Lors de ce mode de transmission, le virus est quasiment uniquement porté par l'embryon à l'exception de quelques rares exemples de contamination de la surface de la graine comme c'est observé pour le tobacco mosaic virus (TMV, Famille : *Virgaviridae*, genre : *Tobamovirus*). L'efficacité de la transmission virale est généralement peu élevée. Cependant, la persistance d'une faible proportion de plantes infectées à la génération suivante peut être suffisante pour maintenir une population virale conséquente au niveau du paysage, lorsque l'on prend en compte d'autres moyens de transmission (comme la transmission par vecteur) pour disséminer le virus en question à partir de ce faible effectif de départ. Il est intéressant de noter que Pagán et al. (2014) ont montré que le cucumber mosaic virus (CMV, famille : *Bromoviridae*, genre : *Cucumovirus*) lors de passages successifs par la graine, perdait en virulence, s'accumulait moins dans l'hôte *Arabidopsis*, mais le taux de transmission par la graine d'une génération à l'autre augmentait en comparaison d'une population virale ayant évolué par passages horizontaux lors d'inoculations mécaniques. Cet exemple témoigne de l'importance cruciale du mode de transmission dans l'adaptation d'un virus à son hôte.

Par le pollen

Plusieurs dizaines de taxons viraux sont transmis par le pollen, notamment des cucumovirus (famille : *Bromoviridae*) ou plus généralement les virus transmis par la graine (Mink, 1993). La transmission peut être verticale du pollen vers la graine mais également horizontale d'une plante à une autre. Des travaux récents montrent que le CMV influence fortement le comportement d'insectes pollinisateurs comme les bourdons (Groen et al., 2016; Murphy et al., 2023). Les plantes infectées par le CMV sont plus attractives pour les pollinisateurs que les plantes non-infectées. La visite des bourdons augmentant significativement la fitness des plantes infectées, à la fois par transport du pollen, mais également par « buzzing » (fortes vibrations produites par le bourdon favorisant l'autofécondation). Cette meilleure reproduction relative des plantes infectées par le CMV permettrait d'outrepasser les effets délétères de l'infection et ainsi de maintenir des allèles susceptibles à l'infection dans la population végétale (Groen et al., 2016). Le même groupe de recherche a également démontré que la préférence des

bourdons pour les plantes infectées était inversée une fois qu'ils avaient visité une plante infectée. Le biais en faveur des plantes saines est ensuite équivalent à un facteur 10 (Murphy et al., 2023). Ces quelques travaux indiquent donc que les interactions virus-hôte-pollinisateurs ont des conséquences évolutives importantes encore largement inexplorées. Ainsi, l'implication des insectes dans les phénomènes d'adaptation des virus à leur hôte ne se limite pas seulement aux insectes vecteurs « conventionnels » (i.e., acquérant les virus par l'ingestion de particules virales).

Par multiplication végétative

Les phytovirus se transmettent également par des propagules végétatives telles que les tubercules, les rhizomes, les stolons, les cormes, les bulbes et les bourgeons (Sastry, 2013). Ce type de transmission impacte des cultures d'importance économique telles que le manioc, la pomme de terre, la canne à sucre, la banane, la patate douce, et la majorité des plantes fruitières et ornementales. La transmission virale du porte-greffe vers le greffon chez des plantes pluriannuelles comme la vigne, par exemple, impacte les rendements et cause la diffusion de virus habituellement non recherchés par les organismes de quarantaine (Demian et al., 2020). Cette problématique a amené au développement de l'identification virale à l'échelle du virome de plante par séquençage haut débit (Maree et al., 2018; Massart et al., 2017).

B) La transmission horizontale

La transmission virale horizontale peut s'effectuer mécaniquement (par blessure) ou par l'intermédiaire d'un vecteur. La transmission par vecteur permet à la fois d'abroger efficacement la distance séparant deux plantes hôtes normalement infranchissable pour un virus, mais également de délivrer des particules virales dans des cellules encore vivantes. Ces caractéristiques expliquent sa prépondérance chez les virus de plante. C'est en effet le type de transmission le plus répandu chez les phytovirus (environ 75% (Hogenhout et al. 2008; Hohn 2007)). La première observation de ce phénomène a été réalisée au Japon en 1893 en transmettant le rice dwarf virus (RDV, famille : *Sedoreoviridae*, genre : *Phytoreovirus*) par la cicadelle *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Famille : *Cicadellidae*).

Les vecteurs sont représentés par une très grande diversité d'espèces (Bragard et al., 2013) comportant des arthropodes (Blanc and Gutiérrez 2015), des nématodes (Brown et al., 1995), des zoospores flagellés (Adams, 1991; Rochon, 2009) ou même des plantes parasites comme les cuscutes (Bhat and Rao 2020; Hartenstein, Albert, and Krause 2023). Cependant, la majorité des espèces vectrices appartiennent à des taxons d'insectes phytophages, principalement des membres de l'ordre des hémiptères tels que les pucerons (famille : *Aphididae*) et les aleurodes (famille : *Aleyrodidae*) (Hogenhout et al., 2008; Ng & Perry, 2004). Leur comportement alimentaire de piqueurs-suceurs ainsi que la structure anatomique de leurs pièces buccales (stylets) permettant une intrusion dans les tissus végétaux sans dommage, font des hémiptères de véritables « seringues volantes ».

Le processus de transmission vectorielle comporte plusieurs étapes successives. L'acquisition désigne l'ensemble des différents comportements conduisant à la rétention des particules virales dans le corps du vecteur (internalisation ou rétention superficielle) lors de l'alimentation de ce dernier sur une plante infectée. L'inoculation a lieu lors d'une alimentation ultérieure sur une plante hôte non-infectée. Les durées nécessaires aux phénomènes d'acquisition et d'inoculation diffèrent selon le tropisme tissulaire du virus dans la plante mais également selon le type d'interaction avec le vecteur (paragraphe suivant).

Enfin la période de latence est le laps de temps séparant le moment où le vecteur devient virulifère (i.e., porteur du virus) et le moment où il devient infectieux (i.e., capable de transmettre). Ces deux statuts peuvent être atteints de façon concomitante ou consécutive, comme c'est le cas pour le tomato spotted wilt virus (TSWV, famille : *Tospoviridae*, genre : *Orthotospovirus*) qui est acquis uniquement par les stades larvaires des thrips (famille : *Thripidae*) mais inoculé par les stades adultes (Roselló et al., 1996). Ces différents modes d'acquisition, de rétention et d'inoculation ont permis d'établir plusieurs classifications de stratégies de transmission comme décrit ci-après.

II - Les modes de transmission des virus

Plusieurs classifications ont été proposées afin de catégoriser les différents virus de plante selon leurs modes de transmission. La plus ancienne, datant de 1939 (Watson & Roberts, 1939), classe les virus selon un critère observationnel, le temps de rétention dans le vecteur. Les virus dits persistants perdurent dans le vecteur durant des semaines ou des mois. Ils nécessitent souvent une longue période d'acquisition sur les plantes infectées. Les virus classés non-persistants sont à l'inverse des virus pouvant être acquis ou inoculés par le vecteur en quelques minutes voire secondes (le temps nécessaire pour effectuer une piqûre intracellulaire de test dans la plante), mais ne peuvent être transmis que durant les minutes ou heures suivant l'acquisition. Ils sont également perdus si le vecteur mue. Enfin, les virus semi-persistants possèdent des caractéristiques intermédiaires avec un temps d'acquisition similaire aux virus non-circulants mais étant retenus dans le vecteur durant plusieurs heures, voire quelques jours.

La deuxième classification, plus fine, se base sur l'observation des particules virales dans le corps des vecteurs (Kennedy, Day & Eastop 1962) (Figure 1). Elle distingue les virus circulants des virus non-circulants. Les virus circulants sont internalisés dans l'insecte. Pour cela ils doivent interagir avec des récepteurs spécifiques dans le tube digestif et franchir la membrane intestinale pour atteindre l'hémolymphe. Les particules virales doivent ensuite pénétrer les glandes salivaires de l'insecte afin de pouvoir être inoculées dans un nouvel hôte lors des phases de salivation. Certains virus circulants se répliquent dans leur vecteur, on les dénomme circulants propagatifs. Les virus non-circulants quant à eux n'interagissent que superficiellement avec l'insecte en s'accrochant à la cuticule des stylets et/ou l'intestin antérieur sans être internalisés.

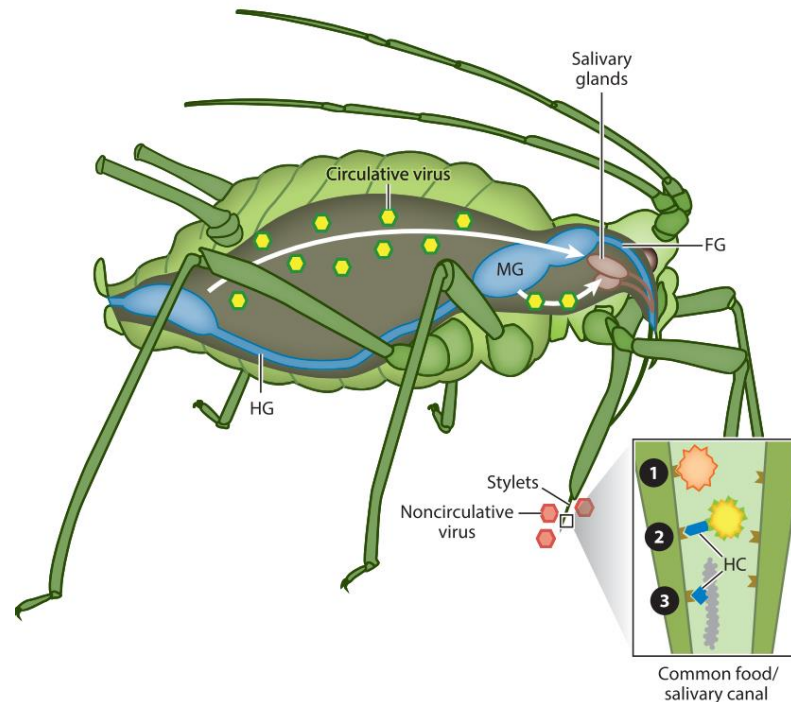


Figure 1 : Différents types d'interactions des virus de plantes avec un puceron vecteur. L'intestin du puceron est représenté en bleu et les glandes salivaires en brun. Les flèches blanches représentent l'internalisation des virus circulants (hexagones jaunes) à l'intérieur du corps du puceron, à travers l'épithélium intestinal vers l'hémolymphe et/ou d'autres organes, et finalement vers les glandes salivaires. Les virus non circulants (non persistants) sont représentés en interaction avec l'extrémité des stylets maxillaires. Abréviation : FG, intestin antérieur ; HG, intestin postérieur ; MG, intestin moyen. Le grossissement de l'extrémité des stylets en bas à droite représente le canal commun. Les virus non circulants interagissent avec des récepteurs partiellement identifiés situés dans la cuticule des stylets. L'adhésion des particules virales peut être effectuée par (1) l'interaction directe de la capsid ou bien par (2-3) l'intermédiaire de protéines virales supplémentaires désignées sous le nom de "facteur assistant de la transmission" ou « helper component » (HC ; représentés en bleu). D'après (Blanc, Drucker, and Uzest 2014).

La dernière classification prend en compte le site de rétention des particules virales. Les virus dits « *cuticula-borne* » (Harris et al., 1996) correspondent aux virus non-intériorisés et n'interagissant qu'avec la cuticule interne de l'appareil buccal et du début du tube digestif de l'insecte. Cette catégorie est divisée en deux avec les virus « *stylet-borne* » et les « *foregut-borne* » qui sont respectivement retenus dans les stylets et l'intestin antérieur. Enfin, les virus « *salivary gland-borne* » correspondent aux virus intériorisés qui nécessitent d'être sécrétés à partir des glandes salivaires de l'insecte.

Ces trois nomenclatures peuvent être regroupées dans une classification plus récente, exhaustive et cohérente avec celles précédemment proposées. Elle se compose de 4 catégories. (i) Les virus non-circulants non-persistants (NCNP), (ii) Les virus non-circulants semi-persistants (NCSP), (iii) Les virus circulants persistants non-propagatifs (CPNP), et (iv) les virus circulants persistants propagatifs (CPP) (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des différents modes de transmission de phytovirus par vecteur d'après (Herrbach & Chesnais, 2021).

Virus Mode	Non-circulant		Circulant	Circulant propagatif
	Non-persistant	Semi-persistant	Persistant non-propagatif	Persistant propagatif
Temps d'acquisition	Secondes à minutes	Minutes à heures	Heures à jours	Heures à jours
Sites d'acquisition	Epiderme	Epiderme et phloème	Phloème	Phloème
Temps de latence	Aucun	Aucun	Heures à jours	Jours
Temps de rétention	Minutes à heures	Heures à jours	Semaines à vie	Vie entière
Temps d'inoculation	Secondes à minutes	Minutes à heures	Heures à jours	Heures à jours
Persiste lors de la mue	Non	Non	Oui	Oui
Réplication dans le vecteur	Non	Non	Non	Oui
Passage transovarien	Non	Non	Non	Possible pour certains virus
Spécificité du vecteur	Etendue	Etendue	Restreinte	Restreinte

Afin d'éviter des répétitions avec les descriptions des classifications précédentes, seul le caractère propagatif ainsi qu'une sous division au sein des virus non circulants seront abordés au sujet de cette dernière classification.

A) Les virus propagatifs

Les virus propagatifs sont des virus de plantes se répliquant à la fois dans la plante et dans le vecteur. Le tropisme tissulaire dans le vecteur est très varié selon les familles virales et peut permettre une transmission verticale trans-ovarienne (Honda et al., 2007; Huo et al., 2014). Les rhabdovirus peuvent, par exemple, infecter la quasi-totalité des tissus de leur insecte vecteur malgré un tropisme tissulaire important pour le système nerveux (Ammar & Hogenhout, 2008), alors que le tomato spotted wilt virus (TSWV, famille : *Tospoviridae*, genre : *Orthotospovirus*) n'est pas détecté dans l'hémolymphe (Ullman, 1995). Ce dernier semble se répliquer uniquement dans l'intestin moyen, les muscles avoisinants et les glandes salivaires (Nagata et al., 1999). Les virus propagatifs sont essentiellement étudiés chez les thrips, les cicadelles et les fulgores (Hogenhout et al., 2008). Les descriptions de virus propagatifs chez les pucerons sont rares, et sont limitées à la famille des *Rhabdoviridae* (Bhat et al., 2020; Christie et al., 1974; Lightle & Lee, 2014). Basé sur la découverte de nombreux rhabdovirus chez les arthropodes à travers des études de métagénomiques et d'analyses phylogénétiques, il a été suggéré que les rhabdovirus infectant les plantes pourraient être à l'origine des virus d'insectes (Whitfield et al., 2018). Le virus animal *Aphis citricidus* picornavirus (AcPV, famille : *Picornavirales*) infectant le puceron brun des agrumes (*Aphis citricidus*) peut être transmis d'un puceron à l'autre par l'intermédiaire de la plante hôte sur laquelle s'est nourri un puceron infecté (An et al., 2023). Pour autant, le AcPV ne se réplique pas dans la plante. Cet exemple d'intermédiaire de transmission entre un virus animal transmis uniquement verticalement, et un virus de plante propagatif suggère que certains virus animaux ont pu s'adapter pour se répliquer également dans des hôtes végétaux. De plus, du point de vue de la manipulation virale, le contact très étroit entre le vecteur et un virus propagatif permet de faire l'hypothèse de manipulations plus importantes et/ou plus fines par l'interaction directe du virus avec le système nerveux, reproductif, ou plus généralement, le comportement de l'insecte.

B) Les stratégies d'interaction avec le vecteur

Les virus non circulants peuvent être classés en deux catégories selon leurs stratégies d'interaction avec la cuticule du vecteur (Figure 1). Les premiers sont les virus dont la protéine de la capsid (CP) interagit directement avec le vecteur. Ce type de transmission est très répandu pour les virus non-enveloppés, à savoir une forte majorité des virus de plante. Pour quelques virus NC, les bases structurales d'interaction de la capsid avec le vecteur sont connues. Par exemple, la résolution de la structure atomique de la particule virale du cucumber mosaic virus (CMV) ainsi que des travaux de mutagénèse dirigée ont permis d'identifier le domaine d'interaction avec le vecteur, une structure en boucle β H- β I permettant la liaison à des ions métalliques (Liu et al., 2002; Smith et al., 2000). Le second groupe correspond aux virus requérant un facteur assistant de la transmission (HC pour « Helper Component ») pour l'interaction avec leur vecteur (i.e., une protéine formant un pont protéique entre le virion et le vecteur). Ce type de mécanisme a été particulièrement caractérisé pour les potyvirus ainsi que les caulimovirus. Le facteur assistant des potyvirus est la protéine HC-Pro de 50 kDa. Elle comprend un motif conservé nécessaire à l'interaction avec le vecteur (KITC) ainsi que le motif PTK permettant l'interaction avec un motif conservé (DAG) de la CP (Blanc et al. 1997; 1998). Chez les Caulimovirus, la P2 (18 kDa) est le facteur assistant la transmission, et a essentiellement été étudiée à travers le cauliflower mosaic virus (CaMV). La région N-terminale de P2 se lie aux stylets des pucerons (Moreno et al., 2005), tandis que les hélices α de l'extrémité C-terminale s'engagent dans des interactions de type coiled-coil avec les hélices α de l'extrémité N-terminale de la protéine P3 associée au virion (Leh, 1999; Plisson et al., 2005). La localisation du récepteur de P2 chez le vecteur (Uzest et al., 2007), son identification (Webster et al., 2018), ainsi que sa fonction putative (Deshoux et al., 2022) ont été décrites. Il s'agit d'un récepteur protéique appartenant aux stylines (notamment la Styline-1) qui est enchâssée dans la chitine cuticulaire interne des stylets du puceron. Physiologiquement, cette protéine semble pouvoir permettre au puceron de retenir et relarguer l'effecteur salivaire Mp-10 (Bos et al., 2010), modulant son comportement alimentaire (Deshoux et al., 2022). La compétition entre l'effecteur Mp-10 et la P2 du CaMV pour les sites de fixation aux stylines pourrait altérer le comportement alimentaire du puceron et ainsi affecter la transmission virale. L'apparition de la stratégie HC dans plusieurs taxons distincts suggère un avantage évolutif à ce type de stratégie. Une des hypothèses avancées serait que l'utilisation d'un facteur intermédiaire entre les particules virales et le vecteur permettrait de limiter le goulot d'étranglement lors du passage dans le vecteur (Pirone & Blanc, 1996). Notamment par des phénomènes de transcomplémentation, avec l'adhésion de particules virales effectuée par des HC codés par d'autres variants viraux, permettant ainsi à un plus grand nombre de variants d'être transmis par des populations de vecteurs différents. Il est intéressant de remarquer que des HC ont également été décrit pour deux virus circulants, le rice stripe virus (RSV, famille : *Phenuiviridae*, genre : *Tenuivirus*) et le faba bean necrotic stunt virus (FBNSV, famille : *Nanoviridae*, genre : *Nanovirus*) respectivement impliqués dans l'endocytose au niveau de la barrière intestinale (Lu et al., 2019) et le transfert dans l'hémolymphe (Di Mattia et al., 2020). Une particularité du segment N, le facteur assistant du FBNSV (Grigoras et al., 2018), est qu'il peut être acquis après les particules virales (Di Mattia et al., 2022). Alors que jusque-là tous les systèmes décrits nécessitaient que l'acquisition du facteurs assistants précède ou soit simultanée avec l'acquisition des particules virales (Blanc, Drucker, and Uzest 2014; Drucker et al. 2002).

III – Les pucerons, vecteurs de phytovirus

A) Biologie générale des pucerons

Les pucerons sont des petits insectes millimétriques appartenant à l'ordre des Hemiptera et au sous-ordre des *Sternorrhyncha* comprenant également les cochenilles, aleurodes, psylles et dont le taxon frère est les *Auchenorrhyncha* (cigales, cicadelles, fulgore etc...). La super-famille des *Aphidoidea* se compose de plus de 4 700 espèces dont environ 450 colonisent des plantes cultivées et représentent une menace majeure pour l'agriculture (Ramaudière & Ramaudière, 1997). La plupart des pucerons sont adaptés à une gamme d'hôte très restreinte, limitée à un ou quelques taxons très proches, à peine 1 % des pucerons (dit pucerons généralistes ou polyphages) peuvent se nourrir sur de nombreuses plantes appartenant à des familles taxonomiques distinctes (Loxdale et al., 2019; Peccoud et al., 2010). C'est par exemple le cas des espèces *Myzus persicae* et *Aphis gossypii*, cette dernière peut notamment s'alimenter sur au moins 912 espèces appartenant à 116 familles différentes (Inaizumi 1980). Les pucerons ont une grande diversité de cycle de vie. Lorsque l'entièreté du cycle est réalisée sur le même hôte, l'espèce de puceron est dite monoécique, alors qu'à l'inverse, un puceron hétéroécique alterne entre un hôte primaire durant la période hivernale et un hôte secondaire à partir du printemps (Blackman and Eastop, 2000). Cette alternance d'hôte au cours des saisons est pratiquée par approximativement 10 % des espèces de pucerons et témoigne de leur grande capacité adaptative (Shih et al., 2023). Lors de la saison automnale, la baisse des températures et le raccourcissement de la photopériode va favoriser la production de femelles gynopares par les femelles virginipares, qui vont retourner vers l'hôte primaire (Colizzi et al., 2023). Les femelles gynopares vont ensuite produire des mâles et des femelles ovipares par parthénogenèse deutérotoques (i.e., les femelles donnent naissance à la fois à des femelles et des mâles). Les mâles et femelles vont alors s'accoupler et générer des œufs (forme diapausante des pucerons), résistants aux conditions défavorables de l'hiver. Au printemps, l'éclosion des œufs donne des femelles parthénogénétiques ailées dites « fondatrices ». Un grand nombre de générations de reproduction parthénogénétiques thélytoques (i.e., les femelles produisent uniquement des femelles) se succèdent jusqu'au retour de l'automne suivant et de la prochaine phase annuelle de reproduction sexuée. Ce type particulier de reproduction comporte donc une croissance de population très élevée via une production exponentielle d'individus femelles identiques génétiquement (Dixon, 1987 ; Dixon, 1992) et une phase de reproduction sexuée permettant la production de nouveau génomes. Ces deux caractéristiques sont particulièrement adaptées aux environnements cultivés qui sont définis par une distribution spatiale très uniforme (monoculture) et des instabilités périodiques fortes, que représentent les traitements phytosanitaires (Simon and Peccoud 2018). A ce jour, plus d'un millier de cas de résistances aux insecticides ont été documentés chez les pucerons notamment pour les espèces *Myzus persicae* et *Aphis gossypii*, les espèces les plus nuisibles au champ (Bass & Nauen, 2023). Ils impliquent une grande variété de mécanisme permettant de surmonter ou d'éviter l'effet toxique des insecticides (Bass et al., 2014). Ceci associé à la capacité des pucerons à produire des femelles parthénogénétiques ailées pouvant accroître la dispersion d'un même clone, font des pucerons des ravageurs de cultures très difficiles à contrôler (Irwin et al., 2007).

B) Influence des symbiontes sur la biologie des pucerons

Les associations symbiotiques pucerons – bactéries (i.e., symbiontes) ne sont pas le sujet de cette thèse de doctorat mais ont fortement influencé les processus évolutifs des pucerons et participent activement à de nombreuses adaptations écologiques. C'est notamment le cas du symbionte primaire transmis verticalement *Buchnera aphidicola*, qui est strictement indispensable pour permettre aux pucerons de se nourrir de sève phloémienne, une source d'alimentation très pauvre en acides aminés (Douglas, 1998, 2006; Sasaki & Ishikawa, 1995). A l'inverse des symbiontes primaires, les symbiontes facultatifs ne sont pas requis pour la survie ou la reproduction du puceron. Ils sont mutualistes seulement dans certains contextes écologiques. C'est par exemple le cas de *Rickettsiella* qui affecte la couleur de son hôte en modifiant la quantité de quinones polycycliques chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Tsuchida et al., 2010). Ils peuvent être présents dans l'intestin, l'hémolymphe, les glandes salivaires alors que les symbiontes primaires sont généralement situés dans les bactériocytes (ou mycétocytes) qui sont des cellules adipocytes spécialisées permettant la protection des symbiontes et des échanges métaboliques complexes (Feng et al., 2019; Hansen & Moran, 2011). Les symbiontes secondaires ne sont pas strictement hérités par la mère comme les symbiontes primaires. Ils peuvent même occasionnellement passer d'une espèce à l'autre (Oliver et al., 2010). La transmission horizontale peut être effectuée par des guêpes parasites à travers l'intermédiaire de leurs ovipositeurs (Gehrer & Vorburger, 2012) ou encore médiée par la plante (Caspi-Fluger et al., 2012; Gonella et al., 2015; Li et al., 2020).

Symbionte et gamme d'hôte

Les symbiontes sont étroitement liés à l'adaptation des hémiptères à leurs plantes hôte. Comme décrit plus haut c'est le cas de *Buchnera aphidicola* pour les pucerons, mais également de *Portiera* pour les aleurodes, ou de *Carsonella* pour les psylles (Hansen & Moran, 2014). *Acyrtosiphon pisum* (communément appelé puceron du pois) peut posséder différents symbiontes secondaires complétant la présence seule de *Buchnera*. La distribution des symbiontes secondaires corrèle fortement avec les différents biotypes d'*A. pisum*, chacun spécialisé sur des hôtes spécifiques (Peccoud et al., 2015). Le puceron géant des conifères (*Cinara cedri*) possède le symbionte *Serratia symbiotica* qui lui confère la possibilité de synthétiser le tryptophan et la riboflavin. Ces composés normalement fournis par *Buchnera*, ne le sont plus à cause d'un génome très réduit de cette bactérie chez *Cinara*. *Serratia symbiotica* semble donc évoluer vers le rôle de symbionte primaire chez cette espèce de puceron (Lamelas et al., 2011). L'élargissement de la gamme d'hôte d'un vecteur par l'acquisition de symbionte peut affecter l'épidémiologie virale, notamment lorsque les nouvelles plantes sur lesquelles les vecteurs peuvent s'établir sont également hôte des virus qu'ils transportent.

Symbionte et défense contre les guêpes parasitoïdes

Une autre caractéristique écologique conférée par les symbiontes est la protection face aux parasitoïdes (Vorburger, 2022). C'est notamment le cas du symbionte secondaire *Hamiltonella defensa* qui protège les pucerons *Acyrtosiphon pisum* (Oliver et al., 2003, 2005) et *Aphis fabae* (Schmid et al., 2012) des guêpes parasitoïdes *Aphidius ervi* et *Lysiphlebus fabarum*, respectivement. Les mécanismes permettant les phénomènes de résistances sont très peu connus mais pourraient être liés à la production de toxines par les symbiontes. C'est par exemple le cas de *H. defensa* dont le génome contient la copie d'un gène de bactériophage lambda lysogénique produisant la toxine APSE (pour Aphid Pisum Secondary

Endosymbiont). Ce gène étant soumis à un fort taux de recombinaison (Degnan & Moran, 2008), il a été proposé que la versatilité des toxines de symbionte ait pu être un moteur important de l'évolution du réseau trophique et de la spécialisation des parasitoïdes à leurs hôtes (Vorbürger, 2022). Les symbiontes du genre *Spiroplasma* sont également capable de produire des composés toxiques conférant des résistances à leurs hôtes et participent à la défense contre des parasitoïdes et nématodes parasites. C'est le cas des enzymes RIPs (ribosome- inactivating proteins) protégeant la mouche *Drosophila neotestacea* (Ballinger et al., 2019; Ballinger & Perlman, 2017). Des travaux empiriques (Hodge et al., 2011) et de modélisation (Jeger et al., 2011) ont montré que la présence de parasitoïdes réduisait la densité de population des pucerons sur les plantes infectées mais favorisait leur dispersion et ainsi la transmission virale. La présence ou l'absence de symbiontes de défense pourrait donc également moduler la transmission.

Symbionte et transmission virale

Des travaux ont mis en évidence que les symbiontes pouvaient jouer un rôle direct dans la transmission virale. La protéine chaperonne GroEL produite par *Buchnera* permettrait la stabilisation des particules virales des polerovirus au niveau de l'hémolymphe des pucerons en interagissant notamment avec la protéine mineur de la capsid, la protéine fusion P3P5 (également appelé Readthrough protéine ou RT) (van den Heuvel, Verbeek, and van der Wilk 1994; van den Heuvel et al. 1997). L'inhibition de la production de GroEL par traitement des pucerons aux antibiotiques réduit de 70 % la transmission du potato leafroll virus (PLRV, famille : *Solemoviridae*, genre : *Polerovirus*) et indiquerait un rôle majeur de la protéine dans le phénomène de transmission (van den Heuvel et al., 1994). Cependant, d'autres travaux montrent des résultats contradictoires (Bouvaine et al., 2011). En effet la forme active de chaperonne de GroEL est constituée de 14 sous-unités, et il semblerait que l'interaction GroEL-P3P5 ne soit pas possible sans abolir l'autoassemblage du complexe et donc la fonction stabilisante de la structure protéique tridimensionnelle par GroEL. De plus, cette même étude montre la présence de la protéine dans les cellules de *Buchnera* mais n'arrive pas à la détecter ni dans l'estomac, ni dans le corps gras, ou encore l'hémocoel. Il semble peu probable que GroEL puisse stabiliser les polerovirus dans l'hémolymphe si la protéine ne peut franchir les membranes des bactériocytes. Un second exemple d'implication de cette protéine a cependant été décrit par deux équipes indépendantes pour un autre pathosystème (Gottlieb et al., 2010; Morin et al., 1999). L'interaction entre la protéine GroEL produite par *Hamiltonella* et les particules du tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Famille : *Geminiviridae* ; Genre : *Begomovirus*) a été démontrée *in vitro* et *in vivo*. Cependant les symbiontes *Rickettsia* et *Portiera* également présents chez l'aleurode vectrice, semblent produire une protéine GroEL qui n'interagit pas avec les particules virales du TYLCV (Gottlieb et al., 2010). Le rôle des symbiontes dans la protection des particules des particules virales dans le vecteur semble encore incertain. Cependant, leur implication majeure dans la physiologie des pucerons suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans les différentes étapes de la transmission virale (voir partie suivante), l'étude des symbiontes dans ce domaine reste donc à considérer.

C) Comportement de choix d'une plante hôte

La forte capacité reproductive des pucerons par parthénogenèse et le nombre excessivement faible d'individus ailés réussissant à établir une colonie sur un hôte susceptible pourraient laisser penser que la stratégie de recherche d'une plante est aléatoire (de même que la production en grande quantité de

graines ou de pollen peut compenser le faible taux de germinations efficaces ou de rencontre d'organes femelles). Néanmoins, le comportement de recherche et de colonisation d'une plante susceptible est très codifié (Döring, 2014; Powell et al., 2006) (Figure 2). Il dépend à la fois de la perception du puceron (vision, olfaction, gustation...), mais également d'indices de la plante (couleurs, odeurs, textures, molécules de défenses...) et de facteurs environnementaux contingents (vent, pluviométrie, présence d'hôte environnant).

Le processus de colonisation d'une plante hôte par un puceron illustré ci-dessous est basé sur les travaux de (Powell et al., 2006) qui décrivent les comportements réalisés par un individu ailé non reproducteur, morphe de puceron dont la production est notamment stimulée par la baisse de la qualité nutritive de la plante hôte initiale et par une hausse de la densité de population (Müller et al., 2001). L'acceptation de la plante par le puceron peut se diviser en cinq phases successives : (i) La phase de vol précédent l'atterrissage sur la plante, (ii) le contact avec la plante et la recherche d'indices de surface, (iii) l'insertion des stylets dans les tissus superficiels de la plante, (iv) la recherche du phloème dans les tissus plus profonds de la plante, (v) la salivation dans le phloème suivi d'une ingestion durable de sève élaborée. Après chaque phase, le puceron peut rejeter la plante et recommencer cette boucle comportementale sur un nouvel hôte (Fereses & Moreno, 2009).

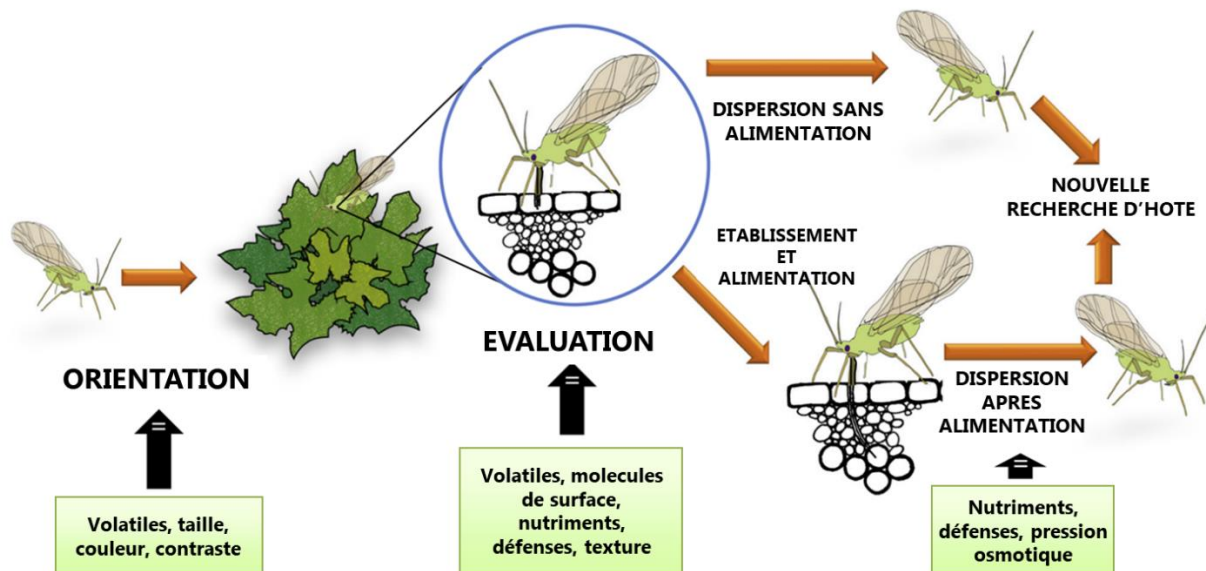


Figure 2 : Enchaînement comportemental réalisé lors du choix d'une plante hôte par un puceron. Dans les encadrés verts sont indiqués des indices de la plante pouvant influencer les étapes décrites. Modifié à partir de (Mauck, De Moraes, and Mescher 2016).

La phase de pré-atterrissage est essentiellement guidée par la perception d'indices visuels par le puceron ailé, notamment par le contraste de couleurs et par la réflectance des feuilles (Döring & Kirchner, 2022). *Myzus persicae* possède trois types de photorécepteurs ayant des sensibilités maximales différentielles pour le vert, le bleu et les UV (Kirchner et al., 2005). A l'inverse des lépidoptères, les pucerons ont longtemps été considérés comme des espèces ne pouvant déterminer la susceptibilité d'un hôte lors de la phase du vol, cette dernière requérant un contact direct avec la plante. Leur comportement de vol étant

décrit comme une *recherche* d'hôte et non une *sélection* d'hôte (Bukovinszky et al., 2005). Cependant, plusieurs études suggèrent que dès la phase de vol, les pucerons sont capables de percevoir des composés organiques volatiles (COVs) propres à des plantes susceptibles et d'y répondre en amont de la phase d'atterrissage (Döring, 2014; Nottingham & Hardie, 2008; Webster et al., 2010). La perception des odeurs se fait par les sensilles olfactives présentes notamment au niveau des antennes (Hardie et al., 1994; Leal, 2013; Park & Hardie, 2004; Webster et al., 2010). La phase de pré-atterrissage semble donc guidée par des indices visuels mais également olfactifs.

Après le contact avec la plante et avant l'insertion des stylets, de nombreux indices de la plante sont analysés par le puceron. Il perçoit des composés chimiques à travers des sensilles olfactives mais également gustatives en agitant ses antennes (Powell et al., 1995). Ce comportement peut être perturbé par la présence de trichomes qui agissent comme barrières physiques (chez la tomate, le coton et la patate par exemple), mais également chimiques, avec les trichomes glandulaires qui peuvent sécréter différents composés (Riddick & Simmons, 2014). Les cires épicuticulaires empêchent également la colonisation de la plante par des pucerons non adaptés. Cela a été montré avec *Aphis fabae* qui insert plus rapidement ses stylets dans la feuille lorsque les cires de cette dernière ont été enlevées (Powell et al., 1999). Cependant, malgré la présence de défenses de la plante ou même de traitements artificiels avec des molécules répulsives, il est très probable que le puceron effectue a minima une piqûre de test en insérant brièvement ses stylets dans la plante, car ce comportement est proche du réflexe lors du premier contact des tarsi du puceron avec une surface quelconque (Griffiths et al., 1982; Phelan & Miller, 1982).

La première insertion des stylets dans la plante est généralement superficielle et inférieure à une minute. Elle comporte souvent une piqûre intracellulaire, composée d'une phase de micro salivation, puis d'une phase de micro-ingestion. Elle permet d'ingérer assez de contenu cellulaire pour entrer en contact avec les organes de la gustation situés dans la zone épipharyngée (Wensler & Filshie, 1969). Lorsque les stylets naviguent dans la plante, les pucerons sécrètent en continu une salive « gélifiante » qui scelle le site d'insertion (plug) et forme la gaine salivaire permettant la lubrification des stylets. Sur une plante hôte, un puceron pourra insérer plus profondément ses stylets dans la plante et effectuer plusieurs piqûres intracellulaires dans les cellules du mésophylle, alors que sur une plante non-hôte, un puceron multipliera les piqûres superficielles ou ne repiquera pas la plante. C'est le cas de *Rhopalosiphum padi* qui réalise de nombreuses piqûres brèves sur *Arabidopsis* en comparaison du comportement qu'il effectue sur l'orge, qui fait partie de sa gamme d'hôte (Escudero-Martinez et al., 2021). Le rejet d'une plante lors des phases de comportement alimentaire peut donc avoir lieu bien avant l'atteinte des tissus vasculaires.

Enfin, le puceron atteint le site principal d'alimentation, à savoir les tissus du phloème abritant la sève élaborée. Les gradients de concentration en sucre et en pH sont deux facteurs importants qui guident le puceron (Hewer et al., 2010). Le puceron cesse de sécréter la salive « gélifiante » et secrète durant plusieurs secondes voire minutes, un autre type de salive, la salive « aqueuse » dans les tubes criblés du phloème. Elle joue un rôle crucial dans l'évitement du scellement des tubes criblés par dépôt de callose, agrégation des protéines P (protéines structurales filamenteuses du phloème), ou la formation de forisomes (uniquement chez les *Fabaceae*) (Walker, 2022). Le puceron délivre notamment plusieurs effecteurs protéiques lorsqu'il sécrète de la salive (gélifiante et aqueuse) qui participent à la réduction des voies de défenses de la plante et préviennent l'obstruction des tubes criblés. La composition de la

salive diffère d'une espèce de puceron à l'autre (voir biotype) et participe activement à la capacité du puceron à coloniser une plante à travers un dialogue moléculaire complexe (Hogehout & Bos, 2011; Shih et al., 2023). L'acceptation de la plante par le puceron a lieu lors de l'établissement de la phase d'alimentation, à savoir la transition de la phase de salivation active vers une phase d'ingestion passive et durable de la sève élaborée, conservée hautement sous pression dans les tubes criblés (Froelich et al., 2011).

D) Anatomie buccale permettant la vection

Les pucerons possèdent des pièces buccales de type piqueur-suceur leur permettant de s'alimenter de sève en se connectant directement aux tubes criblés de leurs plantes hôtes. Le rostre, qui est formé à partir de modification de la mandibule et du maxillaire des pièces buccales, protège un organe flexible appelé « stylets » (Forbes, 1969). Les stylets du puceron peuvent traverser l'épiderme de la plante et naviguer dans les tissus par la voie apoplasmique (entre les parois cellulaires) jusqu'au site d'alimentation principal (i.e., tissus du phloème) (Figure 3a). Les stylets se composent d'une paire de stylets mandibulaires innervés par des dendrites, et abritant une paire de stylets maxillaires. Ils possèdent deux cavités, le canal salivaire grâce auquel le puceron peut sécréter la salive gélifiante et aqueuse, et le canal alimentaire par lequel le puceron ingère la sève. A l'extrémité des stylets, les deux canaux fusionnent pour former le canal commun (Figure 3b).

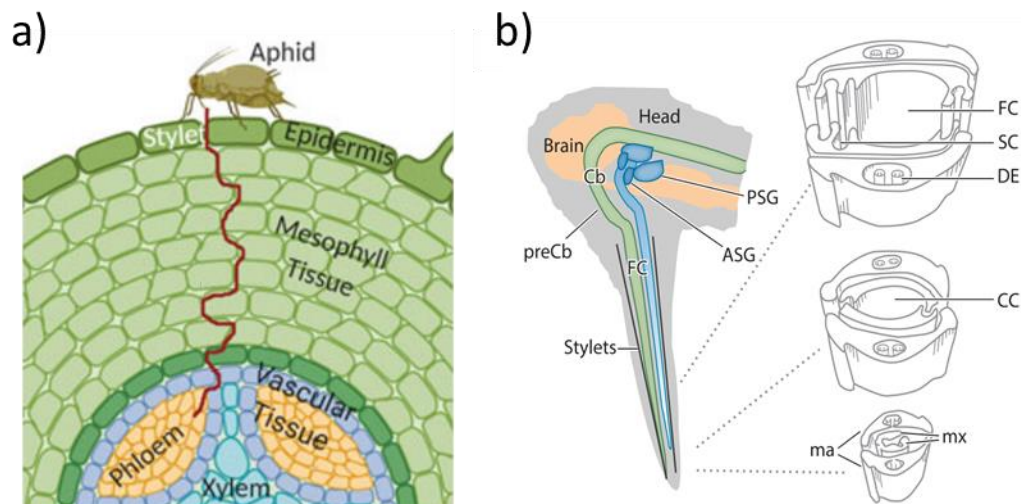


Figure 3 : Localisation des stylets d'un puceron dans les tissus d'une plante et anatomie des stylets. a) Coupe schématique d'une feuille et localisation tissulaire des stylets d'un puceron lors de l'ingestion de sève phloémienne : De l'extérieur vers le centre de la feuille, sont représentés la couche épidermique et les tissus du mésophylle (en vert) puis les tissus vasculaires composés du phloème (en jaune) et du xylème (en bleu clair). Les stylets du puceron sont en rouge et naviguent entre les cellules par l'apoplasme jusqu'aux tubes criblés dans lesquels circule la sève élaborée. Figure adaptée à partir de (Escudero-Martinez et al., 2021) b) Schéma des stylets et du début du tube digestif antérieur d'un puceron : le canal alimentaire (FC) dans les stylets est en vert, de même que le précibarium (preCb) et le cibarium (Cb). Le canal salivaire (SC) et les glandes salivaires principales (PSG) et accessoires (ASG) sont en bleu. (b) Deux stylets mandibulaires (ma) protègent deux stylets maxillaires emboîtés (mx). Seuls les stylets mandibulaires contiennent des dendrites (DE). Les coupes transversales révèlent en outre le canal salivaire (SC) et le canal commun (CC). D'après (Blanc, Drucker, and Uzest 2014).

E) Comportement alimentaire des pucerons et transmission virale

La correspondance entre les différentes sous-phases du comportement alimentaire d'un puceron et la transmission virale est bien établie, et a notamment été permise grâce à la technique de l'électropénétrographie (EPG ; Figure 4). Comme décrit dans la partie précédente « comportement de choix d'une plante hôte », il est possible de diviser le comportement alimentaire des pucerons en deux étapes, l'évaluation de la susceptibilité de la plante hôte et la localisation du phloème par une succession de brèves piqûres intracellulaires dans les tissus superficiels de la plante (épiderme et mésophylle), suivi *par l'ingestion soutenue du sève phloémienne*. C'est lors de ces courtes piqûres test dans la plante, et plus particulièrement des pénétrations intracellulaires que généralement les virus non-circulants non/semi-persistants (principalement contenus dans l'épiderme et mésophylle) sont acquis ou inoculés par le puceron (Martin et al., 1997) (Figure 5a). En ce qui concerne les virus circulants persistants, il est nécessaire que le puceron s'établisse sur la plante et insère ses stylets dans les cellules compagnes ou directement dans les tubes criblés, afin d'acquérir/inoculer les virus circulants persistants, confinés au phloème (Jiménez et al., 2020a; Jiménez, et al., 2020b) (Figure 5b).

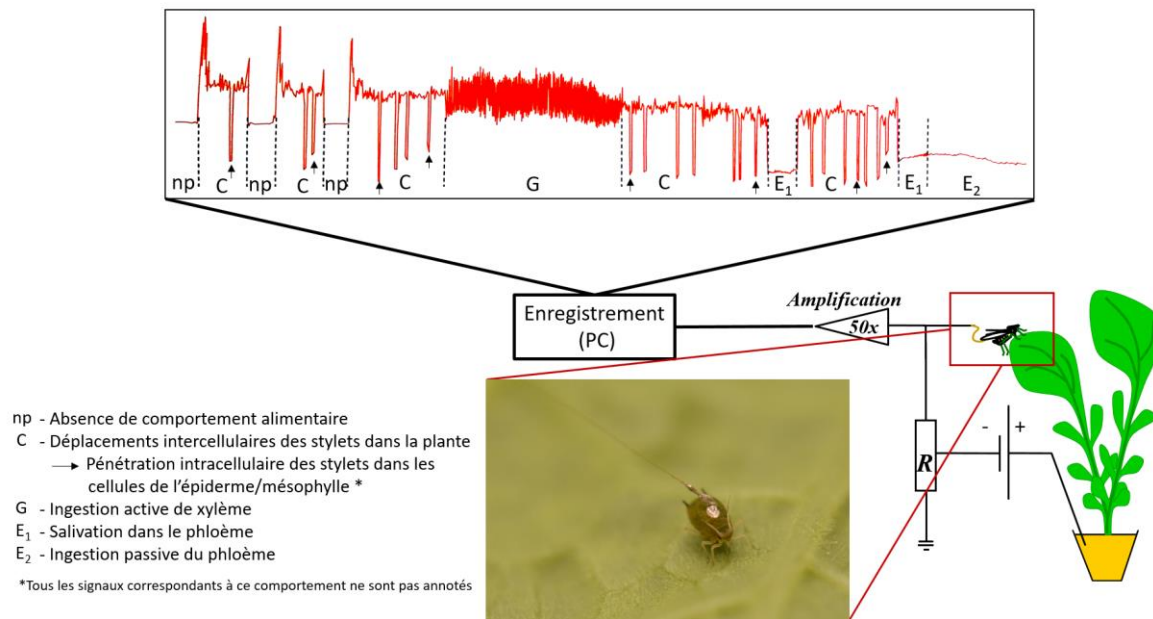


Figure 4 : Schéma d'un système d'électropénétrographie (EPG). La technique EPG permet d'étudier le comportement alimentaire des insectes piqueurs-suceurs comme les pucerons (McLean and Kinsey 1964; Tjallingii 1988). Cette technique consiste à intégrer le puceron dans un circuit électrique en collant sur la partie dorsale de l'abdomen une électrode constituée d'un mince fil d'or ($\varnothing = 12.5 \mu\text{m}$) et de placer une seconde sonde (tige de cuivre) dans le pot de la plante. Lorsque le puceron insère ses stylets dans la plante, le circuit est fermé, et un signal électrique est généré (encadré supérieur). Il existe une dizaine de formes d'ondes caractéristiques produites par une combinaison de deux facteurs principaux, la position des stylets dans les tissus de la plante et l'activité musculaire du puceron (Tjallingii & Hogen-Esch, 1993). Durant l'expérimentation, ces signaux seront amplifiés puis enregistrés sur un ordinateur pour être analysés manuellement a posteriori (Giordanengo, 2014; Sarria et al., 2009). En rouge est représenté un exemple caractéristique de forme d'onde enregistré à partir du comportement de *Myzus persicae* s'alimentant sur navet (schéma adapté à partir d'une présentation de F. Tjallingii).

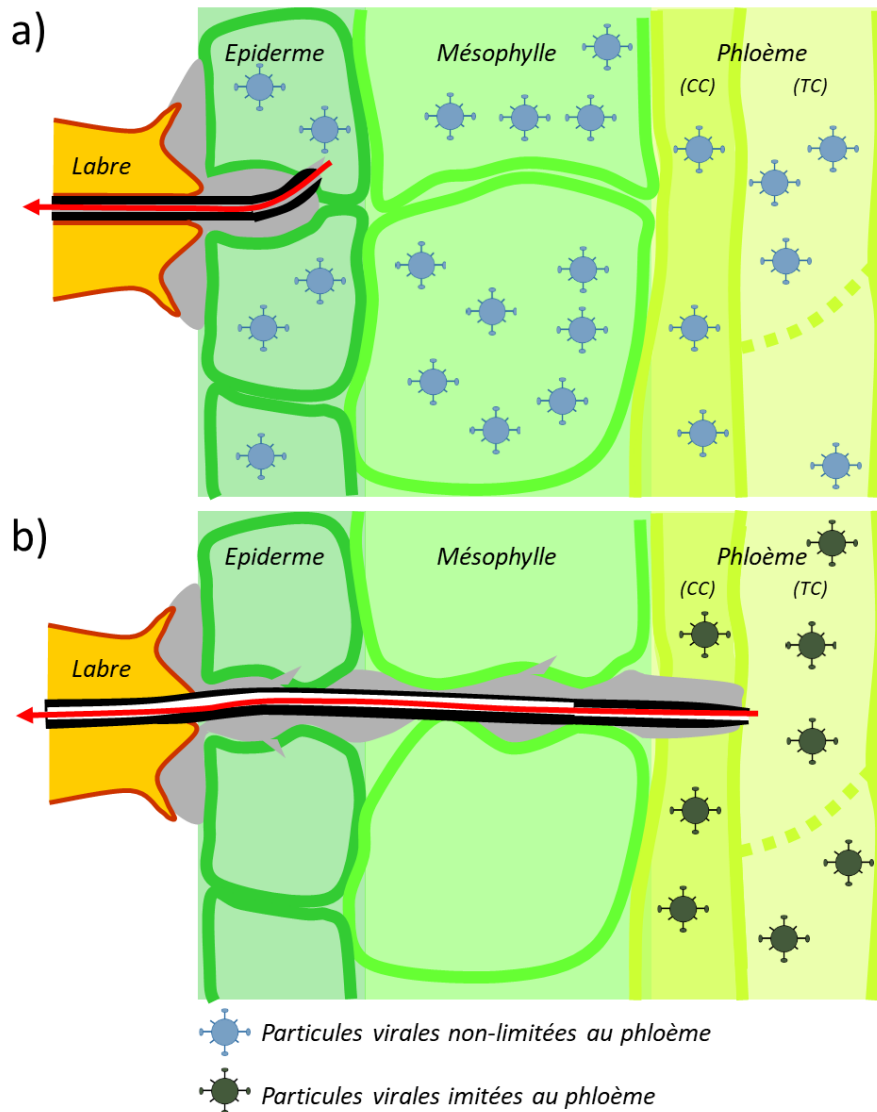


Figure 5 : Représentation schématique du type de comportement alimentaire nécessaire pour l'acquisition / l'inoculation des virus (a) non-circulants non/semi-persistants (NCN/SP) ou (b) circulants persistants (CP) en fonction de leurs tropismes tissulaires respectifs. Les flèches rouges représentent l'ingestion de contenu cellulaire ou de sève élaborée par les stylets du puceron. (a) Les virus NCN/SP peuvent virtuellement infecter toutes les cellules de la plante. Ils peuvent être acquis lors des piqûres intracellulaires dans l'épiderme et le mésophylle, mais sont généralement perdus lorsque les stylets atteignent les tubes criblés. (b) Les virus CP sont limités aux tissus du phloème [cellules compagnes (CC) et tubes criblés (TC)], il est donc nécessaire que le puceron atteigne ces tissus pour pouvoir acquérir ou inoculer ces virus (schéma adapté à partir d'une présentation de F. Tjallingii).

III – La manipulation virale par les phytovirus

Comme déjà évoqué dans l'introduction générale, historiquement les manipulations parasitaires ont été décrites pour des organismes tels que les protozoaires/métazoaires parasites. C'est par exemple le cas du parasite *Polymorphus paradoxus* (famille : *Polymorphidae*) qui modifie le comportement de fuite de son hôte, un crustacé *Gammarus lacustris* (famille : *Gammaridae*) (Lefèvre et al., 2009). Déjà la

question de distinguer des effets « manipulateurs » adaptatifs d'effets « by-products » (sous-produits) des infections faisait débat. C'est pourquoi Robert Poulin (2010) propose deux prérequis nécessaires pour qualifier des traits manipulateurs comme étant adaptatifs dans le cadre de la manipulation parasitaire (i.e., manipulation virale étendue à d'autres pathogènes, notamment eucaryotes et pluricellulaires). Le premier est que le trait observé doit favoriser la transmission du parasite, ou plus généralement améliorer sa valeur sélective. Le second, que ce trait doit être codé par un gène du pathogène lui-même, et donc soumis à la sélection naturelle (Heil, 2016; Herbison, 2017; Robert Poulin, 2010; Robert Poulin & Maure, 2015).

Les virus sont des parasites cellulaires obligatoires qui ont évolué pour détourner le métabolisme de leurs hôtes afin de se répliquer (Culver & Padmanabhan, 2008). Si – comme le montre la littérature – les altérations physiologiques et phénotypiques de la plante hôte lors de l'infection ont un effet sur leur transmission en influençant le comportement des vecteurs, et que ces traits sont sous l'influence génétique des virus, il est de fait très probable qu'ils soient soumis à la sélection naturelle (Mauck et al., 2012). En effet, tous traits codés par le virus défavorisant sa transmission seraient rapidement contre-sélectionnés par la sélection naturelle. La manipulation du vecteur (qu'elle opère dans le vecteur ou bien à travers des modifications phénotypiques de l'hôte) par les phytovirus semble d'autant plus avantageuse, voire nécessaire, dans le cas des virus infectant des plantes annuelles dont le virome disparaît en même temps que la plante dépérit. Les phénomènes manipulateurs sont également influencés par le mode de transmission du virus (i.e., l'interaction du virus avec le vecteur et également sa localisation dans les tissus de la plante) (Figure 6). En effet, les types d'effets manipulateurs (attraction / répulsion, appétence de la plante infectée, performances des vecteurs...) supposés être favorables dépendent fortement du temps de rétention du virus dans le vecteur (persistance) (Mauck, 2016). Si l'émergence de la manipulation des vecteurs par les virus de plante semble très probable d'un point de vue éco-évolutif, elle fait néanmoins face à plusieurs contraintes (Mauck et al., 2018). Par exemple, à l'inverse des arbovirus animaux, la majorité des virus de plante ne font que transiter dans leur vecteur et ne s'y répliquent pas (à l'exception d'une minorité, les virus circulants persistants propagatifs, CPP) (Blanc & Gutiérrez, 2015). Mais surtout, malgré leur fort taux de mutation (García-Arenal et al., 2001; Roossinck, 1997), les génomes extrêmement restreints des virus de plantes souffrent d'une grande rigidité du point de vue de l'émergence de nouvelles fonctions, comme par exemple des traits manipulateurs (Mauck et al., 2018).

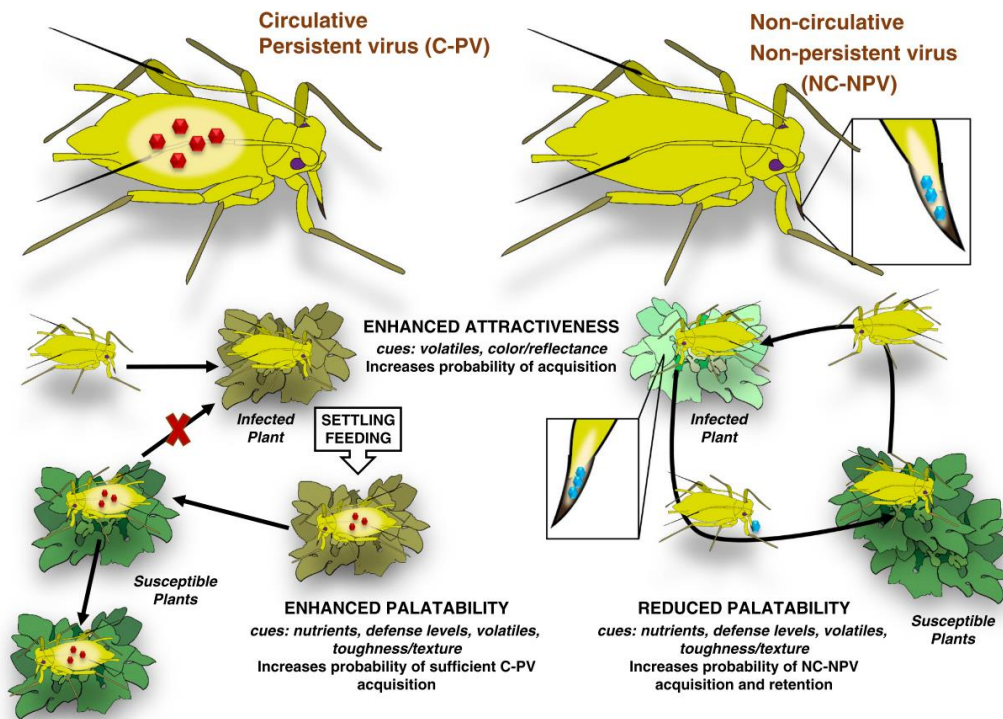


Figure 6 : Effets manipulateurs attendus des virus de plantes selon qu'ils appartiennent au mode de transmission circulant-persistant (CP) ou non-circulant non-persistant (NC-NP). Cette nomenclature est également fortement corrélée à la répartition des virus dans la plante (virus limités aux tissus du phloème ou non). Les virus CP sont acquis au cours d'une alimentation prolongée, généralement dans les tissus du phloème, après quoi ils sont internalisés dans le vecteur (s'y multipliant parfois) et migrent vers les glandes salivaires, à partir desquelles ils peuvent être inoculés à plusieurs plantes. Étant donné que de longues périodes d'alimentation sont nécessaires pour l'acquisition et l'inoculation des virus circulants, on s'attend à ce que ces virus aient des effets neutres à positifs sur l'attractivité des plantes (pour encourager les contacts avec le vecteur) et sur la palatabilité et/ou la qualité (pour assurer l'ingestion d'un nombre suffisant de virions). Après l'acquisition du virus, il est bénéfique pour les CP que le vecteur se disperse de la plante infectée et qu'il s'oriente préférentiellement vers les plantes saines (comme c'est le cas pour les NC-NP). En revanche, l'acquisition de la plupart des NC-NP est favorisée par le fait que les vecteurs insèrent brièvement leurs stylets dans les cellules des tissus superficiels (épiderme et mésophylle), puis se dispersent rapidement des plantes infectées vers les plantes saines. En effet, la transmission de ces virus est diminuée lorsque les vecteurs atteignent les tissus du phloème. Les NC-NP ne sont pas internalisés, mais interagissent avec des régions spécifiques des pièces buccales pendant quelques heures à quelques jours. Ce mécanisme de transmission devrait être facilité par des changements phénotypiques des hôtes qui les rendent attractifs pour les vecteurs, mais moins appétentes afin d'encourager la dispersion rapide nécessaire à la transmission. Il est bénéfique pour un virus NC-NP que ce changement de préférence soit temporaire, car cela garantit que les vecteurs n'évitent pas en permanence les hôtes infectés. D'après (Mauck, 2016).

A) Contraintes évolutives liées aux génomes des (phyto)virus

Comme mentionné plus haut, d'après la définition de Poulin (2010), une modification du phénotype de l'hôte ou du comportement du vecteur peut être considérée comme un phénomène adaptatif manipulateur uniquement si cet effet favorise la transmission du pathogène d'une part, mais également si ce trait est codé par le génome du pathogène lui-même. Or les phytovirus possèdent des génomes parmi les plus restreints de tous les organismes (d'environ 4 à 20 kb). Cette caractéristique limite fortement l'émergence de nouvelles fonctions du génome que ce soit des effets manipulateurs ou tout autres adaptations. Par exemple, la manipulation du phénotype de l'hôte est fortement plante-spécifique (Mauck et al., 2014) et peut même être limitée à certains génotypes au sein d'une espèce (Rajabaskar et al., 2013a,b). Cela suggère que les virus des plantes ne peuvent pas évoluer vers des fonctions de manipulation qui induisent un phénotype propice à la transmission dans tous les hôtes potentiels. Les limites à l'évolution des fonctions de manipulation sont probablement régies par les mêmes contraintes moléculaires qui limitent l'évolution et l'adaptation des virus en général. Le propos de cette partie de l'introduction est de discuter des adaptations et des contraintes inféodées à la taille, la structuration et l'expression des génomes de virus de plante dans un contexte d'émergence de traits manipulateurs.

Structure génomique et forces évolutives façonnant les génomes viraux

La restriction de l'information génétique des virus de plantes dans des petits génomes est imposée par plusieurs facteurs. Dans le cas d'un taux de mutation très élevé comme celui des virus (García-Arenal et al., 2001; Roossinck, 1997), tendre vers des génomes de plus en plus étendus favorisera l'accumulation de mutations délétères. Ce mécanisme peut expliquer en partie pourquoi les virus à ARN possèdent généralement des génomes en moyenne plus restreint en taille que leur homologues à ADN (Belshaw et al., 2008). En effet, les ARN polymérases ARN-dépendantes n'ont pas d'activité exonucléase ce qui les prive d'une fonction correctrice (Drake et al., 1998). Cette caractéristique des polymérases virales à ARN a conduit à l'hypothèse selon laquelle les virus (de plante) à ARN possèdent des taux de mutation globaux plus élevés que les virus (de plante) à ADN (Drake et al., 1998).

Les génomes viraux ont aussi la particularité de présenter des chevauchements de cadres de lecture ouverts (ORF), ce qui permet à une même séquence nucléotidique de coder pour plusieurs protéines. Il est particulièrement présent chez les génomes viraux, notamment de petites tailles (Belshaw et al., 2007) même si il est également retrouvé chez les eucaryotes (Sanna et al., 2008). Cette adaptation permet aux génomes viraux d'encoder plus d'information génétique tout en conservant un génome de taille réduite. En revanche cette structuration génétique impose également des contraintes évolutives supplémentaires, les mutations qui se produiraient dans des régions qui se chevauchent sont plus susceptibles d'être préjudiciables, et le génome mutant serait ainsi plus susceptible d'être éliminé de la population (Sanjuán et al., 2004, 2005; Sanjuán & Elena, 2006).

La mutation et la sélection ne sont pas les seules forces évolutives influençant l'évolution virale. La dérive génétique apporte des effets stochastiques forts d'autant plus que la taille de population est faible (Wright & Sewall, 1951). Les virus de plantes sont contraints à des réductions extrêmes de la taille de populations (i.e., goulots d'étranglement) lors de l'initiation de l'infection systémique mais également lors de la transmission par vecteur (Gutiérrez et al., 2012) qui sélectionne un nombre très faible de génomes lors de l'acquisition ou de l'inoculation (Betancourt et al., 2008; Moury et al., 2007). Il semblerait cependant

que l'influence de la dérive génétique puisse être variable au sein des virus, le CaMV par exemple possède un goulot d'étranglement très étendu (plusieurs centaines de génomes) lors de la colonisation des tissus de son hôte (Monsion et al., 2008). La dérive dépend également de caractéristiques de l'infection pouvant varier au sein d'une même espèce comme par exemple le titre viral dans le réseau vasculaire (Gutiérrez et al., 2012).

Valeur sélective des gènes viraux, une histoire de contexte

L'émergence de traits manipulateurs chez les phytovirus est restreinte par des caractéristiques intrinsèques à la structure génétique des génomes viraux (cf. paragraphe précédent). Un second niveau de contrainte est également lié à l'expression de ces gènes. La pléiotropie qualifie un gène qui détermine plusieurs traits phénotypiques distincts (Paaby & Rockman, 2013; Stearns, 2010). Ainsi, l'apparition d'une mutation favorisant la manipulation (ou tout autre trait), peut également avoir des effets néfastes sur la réplication, la transmission ou une autre fonction majeure. La modification d'un seul acide aminé de la protéine de la capsid du CMV peut, par exemple, réduire le taux de transmission par puceron (en réduisant l'efficacité de liaison des particules virales dans le vecteur) mais également induire une nécrose de la plante hôte, et donc limiter la survie de la plante comme source virale (Ng et al., 2005). Plus généralement, des phénomènes pléiotropiques antagonistes peuvent se produire à l'échelle de l'adaptation à un (Lee et al., 2023) ou plusieurs hôtes (Lalić et al., 2011). En effet, les mutations qui se fixent pendant l'infection d'un hôte (parce qu'elles sont bénéfiques, ou parfois neutres) peuvent être préjudiciables lors de l'infection d'un hôte ultérieur si elles réduisent ou annihilent la virulence.

Enfin, il est également important de préciser que la somme des effets de plusieurs mutations dans le génome ne produit pas nécessairement la somme des effets produits par les mutations indépendantes (phénomène d'épistasie). Entre d'autres termes, la capacité d'une mutation (permettant ou favorisant, par exemple, la manipulation) à se fixer dans la population dépendra de la valeur adaptative de cette mutation mais également des synergies avec le reste du génome (Bedhomme et al., 2015). Les études s'intéressant aux interactions épistatiques entre les gènes de virus suggèrent que ces phénomènes devraient restreindre les possibilités évolutives des fonctions de manipulation, en particulier pour les virus aux gammes d'hôtes étendues qui infectent des espèces phylogénétiquement différentes (Lalić & Elena, 2013).

B) La manipulation du phénotype de la plante hôte

Lors de l'infection, la physiologie de la plante hôte est reprogrammée pour permettre la réplication virale (Culver & Padmanabhan, 2008). A travers cette restructuration physiologique en tant que telle, ou par une altération du phénotype de la plante, l'infection va moduler les interactions plante-vecteur (Mauck et al., 2014). De nombreux travaux montrent que ces modifications physiologiques et phénotypiques de l'hôte peuvent favoriser la transmission (Mauck et al., 2012). Comme nous l'avons vu dans la partie III-C, le comportement de choix d'un hôte par un puceron est très codifié et répond à un enchaînement de réponses comportementales (Figure 2) (Ferreles & Moreno, 2009; Powell et al., 2006). Les effets manipulateurs médiés par la plante peuvent agir sur trois types de comportement du puceron : (i) le comportement de recherche de l'hôte à plus ou moins longue distance, (ii) le comportement permettant l'acquisition virale sur la plante infectée, (iii) le comportement de dispersion/recherche d'un nouvel hôte qui pourra aboutir à l'inoculation (Figure 7).

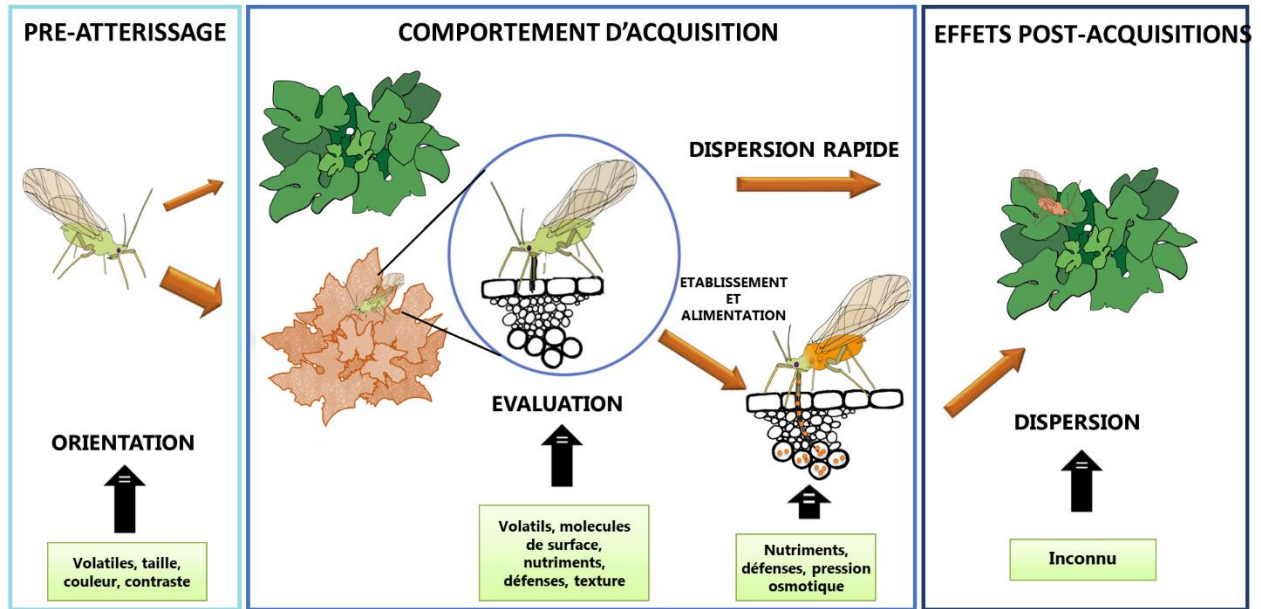


Figure 7 : Séquences comportementales potentielles d'un puceron en réponse à des aspects du phénotype d'une plante hôte (encadrés verts) qui peuvent être affectés par l'infection virale. De gauche à droite, dans un ordre chronologique, sont représentés le comportement de recherche d'hôte et d'orientation d'un puceron non virulifère (encadré bleu clair), l'interaction puceron-plant infectée conduisant éventuellement à l'acquisition virale par le puceron (encadré bleu médian), et la dispersion d'un puceron virulifère vers un nouvel hôte sain (encadré bleu foncé). La flèche épaisse dans le premier encadré indique un choix préférentiel des pucerons pour les plantes infectées. L'acquisition virale peut avoir lieu lors de l'insertion brève des stylets dans les tissus superficiels de la plante, ou nécessiter l'établissement durable du puceron et l'ingestion de sève depuis les tissus du phloème. La dispersion des vecteurs peut être stimulée par des prédateurs, la densité de population croissante ou des facteurs abiotiques. Cependant l'influence virale sur la dispersion et la recherche d'un nouvel hôte (i.e., effets post-acquisitions) est encore très peu connue. Figure adaptée à partir de (Mauck et al., 2016).

Sélection initiale d'une plante hôte

Lors de la recherche d'un hôte et avant la phase d'atterrissage, le choix du puceron va essentiellement dépendre des caractéristiques physiques de la plante telles que la taille, la couleur ou bien la morphologie des feuilles de la plante (Mauck et al., 2016). A distance plus restreinte, la composition (en termes de quantité et de qualité) des composés organiques volatiles (COVs) peut également influencer le choix du puceron (Medina-Ortega, Bosque-Pérez, et al., 2009; Wu et al., 2014). Près d'une cinquantaine de virus de plante agissant sur le comportement de choix de leur vecteur ont été décrit dans la littérature et la quasi-totalité de ces études montrent un choix préférentiel des vecteurs pour les plantes infectées, quel que soit le mode de transmission (Mauck et al., 2018). Cet effet est attendu car une augmentation du contact plante-vecteur est bénéfique à la transmission du virus (Roosien et al., 2013; Sisterson, 2008). Cette attraction des vecteurs envers les plantes infectées a essentiellement été étudiée pour des infections virales, mais des travaux sur d'autres pathosystèmes incluant des champignons ou des bactéries ont également rapporté cette tendance (Eigenbrode et al., 2018).

Phase de contact et acquisition des particules virales

Une fois en contact avec la plante et avant l'insertion des stylets, des informations chimiques vont être prises en compte par le puceron, que ce soit par l'intermédiaire de sensilles olfactives ou gustatives, comme décrit précédemment (Powell et al., 1995). Une fois l'insertion des stylets dans la plante effectuée, les métabolites primaires tels que les acides aminés et les sucres vont avoir un effet important sur l'acceptation de la plante par le puceron. Des variations dans la composition des métabolites primaires de la plante ont été montrés pour plusieurs virus (Gadhavé et al., 2019; Selman et al., 1961). Le CMV par exemple, perturbe le ratio C:N en induisant une réduction des sucres et une suraccumulation de nombreux acides aminés dans les plantes infectées (Mauck et al., 2014). Le CMV réduit notamment la concentration en saccharose qui est une molécule essentielle au comportement de recherche du site d'alimentation des pucerons (Hewer et al., 2010), mais également leur source principale de carbone (Ashford et al., 2000; Rhodes et al., 1997). Ces variations modulent l'appétence des pucerons et peuvent les inciter, ou au contraire les décourager, à prolonger leurs comportements alimentaires sur les plantes infectées. La dispersion rapide des pucerons après une ou plusieurs brèves insertions des stylets, favorise la transmission des virus non limités au phloème. A l'inverse l'installation des pucerons sur la plante infectée favorise l'acquisition des virus dont le tropisme se limite à ces tissus.

Lors de contacts prolongés, les métabolites primaires peuvent également influencer les performances des vecteurs sur les plantes infectées (Casteel et al., 2014; Chesnais, Mauck, et al., 2019). Une augmentation des performances induite par l'infection favorise une augmentation de la taille de population des vecteurs et peut faciliter les chances de transmission (Hodge & Powell, 2008a).

L'infection virale peut également altérer les défenses constitutives des plantes en modulant l'accumulation de métabolites secondaires tels que les glucosinolates chez les brassicacées (Westwood et al., 2013) ou les défenses physiques comme que les trichomes (Mauck et al., 2014). Les plantes induisent des dépôts de callose dans les tissus du phloème afin de limiter le détournement de la sève par les insectes piqueurs-suceurs (Hao et al., 2008; Leybourne & Aradottir, 2022). Ce mécanisme de défense est, par exemple, altéré par le tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Famille : *Geminiviridae* ; Genre : *Begomovirus*) et le turnip mosaic virus (TuMV, famille : *Potyviridae*, genre : *Potyvirus*) afin de favoriser la colonisation et la fécondité de leur vecteur respectifs (Casteel et al., 2014; Su et al., 2015). Plusieurs phytohormones modulent les relations plantes-insectes en stimulant les défenses (Erb et al., 2012; Morkunas et al., 2011), parmi lesquelles le jasmonate, le salicylate et l'éthylène qui ont été étudiés de façon prépondérante (An & Mou, 2011; Lortzing & Steppuhn, 2016; Smith et al., 2009). Des travaux montrent que l'infection virale peut altérer la production de ces phytohormones, ce qui influence le comportement des insectes vecteurs et, indirectement, module la transmission virale (Casteel et al., 2015; Patton et al., 2020). Récemment, des dérégulations d'accumulations d'hormones moins étudiées dans le cadre des interactions plantes-insectes (par exemple l'auxine, la gibbérellines, ou l'acide abscissique) ont également été mises en évidence pour plusieurs virus (Pan et al., 2021).

Phase post-acquisition, recherche d'un nouvel hôte

Lorsqu'un puceron virulifère quitte la plante infectée, il peut présenter des comportements et/ou des traits physiologiques modifiés en comparaison de pucerons non virulifères, ce qui peut avoir des conséquences sur la transmission (Blanc & Michalakakis, 2016). Ceci inclut tout d'abord des effets décrits

précédemment comme la détection et la réponse à des indices de la plante afin de choisir un nouvel hôte (Rajabaskar et al., 2014). Dans une expérimentation très élégante, Ingwell et al., (2012) ont montré que lorsque le puceron *Rhopalosiphum padi* avait acquis le barley yellow dwarf virus (BYDV, famille : *Solemoviridae*, genre : *Polerovirus*) à partir d'un milieu comportant des particules virales purifiées, celui-ci colonisait préférentiellement des plantes saines, contrairement aux pucerons non virulifères qui choisissent préférentiellement les plantes infectées. Après alimentation sur une plante infectée, les virus peuvent également influencer le métabolisme du vecteur (Stafford-Banks et al., 2014) ou sa motilité (Chesnais et al., 2020). Enfin, le comportement alimentaire lors de l'interaction avec des hôtes ultérieurs peut également être influencé (Chesnais et al., 2020; Stafford et al., 2011). L'ensemble de ces effets dits, effets post-acquisitions, peuvent être directs (provoqué par la présence du virus dans le puceron) ou bien indirects, c'est à dire induits par le passage du puceron sur la plante infectée (effets indirects persistants), voir paragraphe précédent. Il est cependant extrêmement difficile de dissocier ces deux mécanismes d'action à partir du moment où l'acquisition virale est réalisée à partir d'une plante infectée (Ingwell et al., 2012).

C) Les aspects les moins étudiés de la manipulation par les phytovirus

Les effets directs

Comme indiqué précédemment, apporter la démonstration d'un effet manipulateur d'origine directe est complexe. Dès lors que l'acquisition virale a été réalisée à partir d'une plante infectée, un effet du virus médié par la plante (modifications de la qualité – composés primaires et secondaires) ne peut pas être exclu pour expliquer le comportement différentiel entre des vecteurs virulifères et non virulifères (Lu et al., 2019). Il semble indispensable de purifier les particules virales pour éliminer tous les facteurs de la plante pouvant influencer le vecteur et ne conserver que les effets résultant de l'interaction virus-vecteur (Ingwell et al., 2012; Marmonier et al., 2022). Cependant des protocoles de purification de virus n'ont été développés que pour quelques virus (Hull et al., 1976; van den Heuvel, 1991), et restent imparfaits car certains composés d'origine végétale sont également enrichis durant le processus purification (Marmonier et al., 2022; Tscheuschner et al., 2023). Ces contraintes ont fortement limité le nombre d'études crédibles décrivant des effets directs. Pourtant, leurs existences notamment chez les virus propagatifs, est d'autant plus probables qu'ils interagissent ou se répliquent dans de nombreux tissus de l'insecte comme par exemple, le système nerveux, et pourraient induire des modifications comportementales du vecteur (Ammar & Hogenhout, 2008).

L'identification de facteurs viraux

Un corpus grandissant d'études existe sur des descriptions de phénomènes manipulateurs ciblant les préférences des vecteurs pour les plantes infectées ou bien l'ensemble des comportements effectués par les vecteurs interagissant avec des plantes infectées (Mauck et al., 2012; 2018). Cependant, les descriptions des mécanismes sous-jacents, et notamment de l'identification des facteurs viraux font cas d'exceptions (Mauck et al., 2019). Il a été montré par exemple, que la protéine C2 des begomovirus (famille : *Geminiviridae*) réduisait les mécanismes de résistances des plantes aux aleurodes pour favoriser leur survie et leur fécondité en interférant avec les voies de dégradation du protéasome (Li et al., 2019). Plusieurs études sur les fijivirus ont identifiés des déterminants viraux impliqués dans la transmission du côté de l'insecte (Zhang et al., 2021), mais également de la plante hôte. L'étude très vaste de Zhao (2022)

a notamment montré que la protéine P6 du southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV, famille : *Spinareoviridae* , genre : *Fijivirus*) interagissait dans un premier temps avec la protéine cytoplasmique OsRTH2 lors des stades précoces de l'infection stimulant la production d'éthylène afin de favoriser la réplication virale en repoussant les vecteurs (dont l'arrivée prématurée est rapidement létal pour les plantes infectées). Puis dans un second temps, lorsque la plante infectée peut supporter les stress simultanés de l'infection et de l'infestation, la P6 est transloquée dans le noyau et restreint la dimérisation du facteur de transcription OsEIL2 ce qui réduit fortement l'expression d'éthylène et favorise l'attraction des vecteurs. Cette étude est remarquable à la fois pour la description des mécanismes permettant la modulation de l'attraction du vecteur, mais également car en effectuant plusieurs observations au cours du développement de l'infection, elle met en avant que des effets manipulateurs adaptatifs puissent varier selon le stade de l'infection considéré. Un effort conséquent est nécessaire pour identifier l'ensemble des voies de signalisation potentiellement manipulées dans les plantes hôtes par des virus aux modes de transmission différents.

Les effets post-acquisitions

Les effets manipulateurs sur les interactions aboutissant à l'acquisition de virus par les vecteurs ont été décrits pour de nombreux virus (Mauck et al., 2018). Cependant, il existe très peu de publications qui étudient les effets manipulateurs potentiels permettant une facilitation de la recherche d'hôte ou d'inoculation du virus par les vecteurs virulifères (Blanc & Michalakakis, 2016). Le type de comportement le plus étudié pour les effets post-acquisitions est sans doute la description de changement de préférence de plantes hôtes par les pucerons virulifères (Ingwell et al., 2012; Medina-Ortega, et al., 2009; Rajabaskar et al., 2014). Par exemple, *M. persicae* choisit préférentiellement les plantes infectées par le potato leaf roll virus (PLRV) lorsqu'il est non-virulifère, puis au contraire préfère s'établir sur des plantes saines une fois qu'il a acquis le virus (Rajabaskar et al., 2014). Ce type de changement de préférence en fonction du statut a d'ailleurs été démontré comme participant à l'accélération de la propagation virale par des travaux de modélisation (Roosien et al., 2013). Un article étudiant les effets post-acquisitions du TuYV sur son vecteur *M. persicae* a également montré une amélioration de la motilité des pucerons virulifères qui faciliterait la recherche d'hôte, et une altération du comportement alimentaire des pucerons virulifères sur des plantes saines (Chesnais et al., 2020). Enfin, Stafford et al. (2011) ont montré que l'inoculation du tomato spotted wilt virus (TSWV) était facilitée par une modification du comportement alimentaire des aleurodes vectrices virulifères. Mis à part ces quelques exemples, les effets post-acquisitions induits par les virus de plante sont encore très largement inexplorés, et aucun mécanisme sous-jacent n'a été proposé pour ceux-ci.

Description des modèles biologiques utilisés lors de la thèse

I – *Myzus persicae*

Myzus persicae (Sulzer, 1776), aussi appelé « puceron vert du pécher », est une espèce *hautement* polyphage (van Emden et al., 1969). Les individus ailés ou aptères dont la couleur nuance de vert à jaune, mesurent entre 1,2 et 2,1 mm (Figure 8). Son hôte primaire est très généralement *Prunus persica* ou d'autres ligneux du genre *Prunus*, alors que ses hôtes secondaires représentent plus de 400 espèces de végétaux appartenant à près de 50 familles botaniques dont les *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* et *Cucurbitaceae* (Blackman and Eastop, 2000). Des sous-espèces de *Myzus persicae* ont été décrites tel que *Myzus persicae subsp. Nicotianae* qui est associé au tabac et résistant à la nicotine (Blackman, 1987; Troczka et al., 2021). Cette forte plasticité phénotypique ainsi qu'un crible évolutif intense exercé par l'utilisation massive de biocides a abouti à l'émergence de résistances à de nombreuses classes d'insecticides dont les néonicotinoïdes (Bass et al., 2014; Bass & Nauen, 2023; Roy et al., 2022). En région tempérée, *Myzus persicae* est généralement un puceron holocylique, qui se reproduit massivement par parthénogenèse et ponctuellement par reproduction sexuée. Il est également hétéroécique (possède plusieurs hôtes) alternant entre un hôte primaire durant l'hiver, et un hôte secondaire le reste de l'année. En revanche dans des régions où la saison hivernale est absente ou plus clémente, il peut se passer de la forme diapausante (œuf) et donc de reproduction sexuée, on dit alors qu'il est anholocylique. Il est le plus impactant des pucerons ravageurs de cultures sur le plan agroéconomique (van Emden and Harrington, 2007). Cependant, d'autres espèces de pucerons hautement polyphage et vectrices de nombreux virus sont également très problématiques, c'est le cas par exemple d'*Aphis gossypii* (van Emden and Harrington, 2007). *Myzus persicae* cause des dommages en détournant les photoassimilats de la plante lors de son alimentation, en favorisant le développement de moisissures fuligineuses (ascomycètes saprophytes) qui réduisent l'activité photosynthétique, et surtout en transmettant de nombreux virus (Dedryver et al., 2010). Il est un des pucerons vecteurs pouvant transmettre le plus de virus avec plus de 100 espèces différentes transmises (Kennedy et al., 1962, van Emden and Harrington, 2007). Il transmet efficacement le turnip yellows virus (TuYV) et le cauliflower mosaic virus (CaMV) qui sont les deux virus étudiés dans ces travaux de thèse de doctorat.



Figure 8 : Photographie de *Myzus persicae* relié à une sonde EPG. M. Verdier, Q. Chesnais & M. Drucker.

II – Le cauliflower mosaic virus

A) Généralités

Le virus de la mosaïque du chou-fleur (cauliflower mosaic virus, CaMV) est le membre type du genre *Caulimovirus* auquel il appartient parmi 12 autres espèces reconnues par l'ICTV (Comité international de taxonomie des virus). Les caulimovirus appartiennent à la famille des *Caulimoviridae* qui comprend 9 autres genres. Le CaMV réplique son génome à ADN par transcription inverse d'un ARN pré-génomique et appartient donc au supergroupe des pararetrovirus. Le CaMV a été le premier virus de plante à être découvert possédant un génome à ADN ainsi que le premier virus infectant le règne végétal à avoir été entièrement séquencé (Franck et al. 1980; Haas et al. 2002). Ces différentes caractéristiques ainsi que la facilité de construire des clones infectieux (grâce à son ADN double-brin similaire à un plasmide) font du CaMV un des 10 virus de plante les plus étudiés malgré son impact agroéconomique modéré (Scholthof et al., 2011). Ses virions forment des particules non enveloppées de forme icosaédriques d'environ 50 nm de diamètre. L'assemblage de 420 molécules de la protéine de capsid est nécessaire pour former une particule complète de symétrie d'ordre $T = 7$ abritant le génome viral. Ce dernier comporte approximativement 8000 paires de bases et est enchâssé dans la surface interne du virion. Le génome du CaMV possède 7 ORF (cadre de lecture ouvert) codant pour 6 protéines nommées P1 à P6.

B) Gamme d'hôte, symptomatologie et tropisme tissulaire

Le CaMV infecte majoritairement les plantes de la famille des *Brassicaceae*, incluant les radis, navets, moutardes, choux-fleurs, brocolis, choux, et la plante modèle *Arabidopsis* (Figure 9a). La spécificité d'hôte est assurée par un domaine de la protéine P6 et permet aux souches D4 et W260 d'infecter également les solanacées (Schoelz & Shepherd, 1988). La symptomatologie de l'infection est d'intensité variable selon la souche de CaMV utilisée mais également selon l'hôte infecté. Cependant, le développement caractéristique de l'infection du CaMV provoque généralement un blanchiment des feuilles qui n'affecte en premier lieu que les nervures (mosaïque) et qui progressivement recouvrent tout le limbe. Une plante infectée manifeste des feuilles gaufrées et enroulées sur elle-même, avec un retard de croissance généralisé. Le CaMV n'est pas limité aux tissus du phloème et peut virtuellement infecter toutes les cellules de la plante, à savoir l'épiderme, le mésophylle, et le parenchyme vasculaire. Il est cependant important de souligner qu'à l'inverse des particules virales qui sont retrouvées dans et hors des tissus du phloème, le facteur assistant de la transmission n'est disponible pour l'acquisition par le vecteur que dans l'épiderme et le mésophylle (Figure 9b).

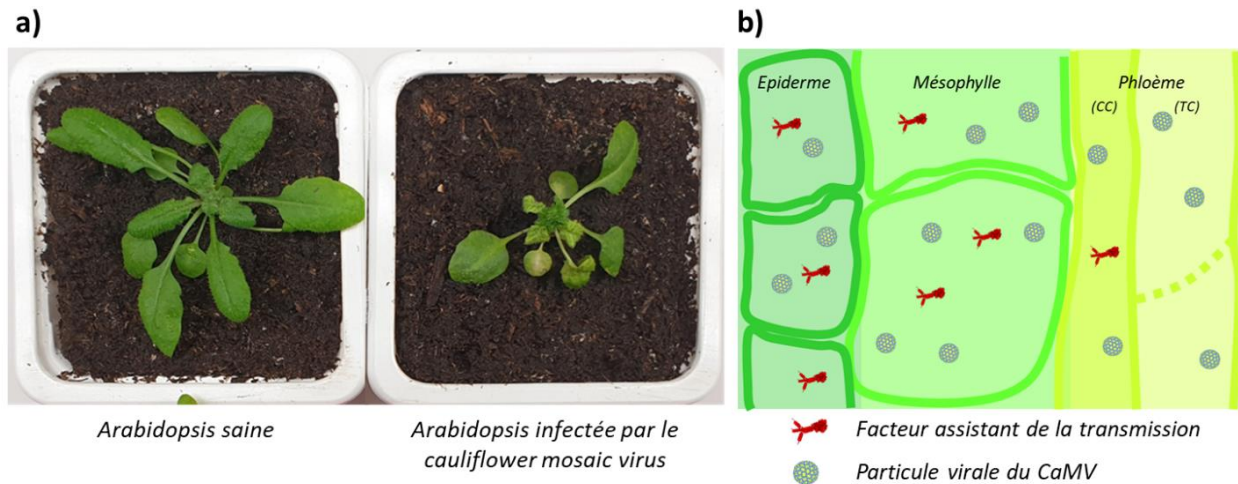


Figure 9 : Infection d'Arabidopsis par le cauliflower mosaic virus. a) Photographie illustrant le phénotype d'Arabidopsis lors de l'infection du CaMV à trois semaines post-inoculation (équivalent à des plantes âgées de cinq semaines). Les Arabidopsis infectées par le CaMV manifestent un retard de croissance généralisé. Leurs feuilles sont jaunies, gaufrées, et enroulées sur elle-même. b) Représentation schématique du tropisme tissulaire du CaMV. Le CaMV peut virtuellement infecter toutes les cellules de la plante. Cependant, l'acquisition des particules virales (sphères bleues et jaunes) par le puceron nécessite l'acquisition préalable, ou concomitante, du facteur assistant la transmission (en rouge) qui est présent uniquement dans l'épiderme et le mésophylle. Photographie de Q. Chesnais et schéma adapté à partir d'une présentation de F. Tjallingii.

C) Les protéines du CaMV

P1

La protéine P1 (~40 kDa) est la protéine de mouvement impliquée dans le déplacement de cellule à cellule (Linstead et al., 1988). Elle est capable de s'auto-assembler pour former des structures tubulaires qui interagissent avec les plasmodesmes afin de permettre au CaMV de les franchir sous forme de particule virale (Perbal et al., 1993). Le passage des virions du CaMV dans les plasmodesmes nécessite le recrutement de la P3 qui est la protéine associée à la capsid. L'interaction entre la protéine de mouvement et la protéine de la capsid se fait de façon indirecte par des interactions coiled-coil entre la P1 et la P3 (Stavolone et al., 2005).

P2

La P2 (~18 kDa) est le facteur assistant de la transmission, ou « helper-component » et est nécessaire pour la transmission du CaMV par son vecteur (Armour et al., 1983; Lung & Pirone, 1974). En revanche, elle est totalement dispensable pour la réplication virale dans la plante hôte (Armour et al., 1983; Verdier et al., 2023). Après la traduction de la protéine au niveau des usines virales, la P2 est rapidement adressée dans une structure virale appelée « corps à transmission » (Espinoza et al., 1991; Khelifa et al., 2007). Cette structure sans membrane est essentiellement composée de P2 mais comporte aussi des particules virales associées à la P3 ainsi que de la P3 libre (Drucker et al., 2002). Le corps à transmission est une structure dynamique pouvant réagir instantanément à la piqûre intracellulaire d'un puceron (Hébrard et al., 2001; Martinière et al., 2013). La pénétration des stylets du puceron dans une cellule infectée par le CaMV va induire des variations de la concentration intracellulaire de calcium et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui va provoquer la désolidarisation des protéines formant le

corps à transmission (Martinière et al., 2013). Cette « activation du corps à transmission » (Figure 10) va induire la répartition de la P2 sur le réseau de microtubules ce qui pourrait potentiellement faciliter l'acquisition par le puceron du facteur assistant de la transmission seul, ou bien de l'ensemble complexe transmissible du CaMV, à savoir le complexe P2-P3:virions (Drucker et al., 2002; Martinière et al., 2009). Le phénomène d'activation de la transmission pourrait limiter le coût énergétique payé par l'hôte en induisant la forme transmissible du virus uniquement lorsqu'elle est nécessaire, à savoir en présence du vecteur (Drucker & Then, 2015). Il semble partagé au moins par le turnip mosaic virus (Familiy : *Potyviridae* ; Genre *Potyvirus*) et pourrait être plus généralement présent chez les phytovirus non circulants (Berthelot, et al., 2019; Drucker & Then, 2015).

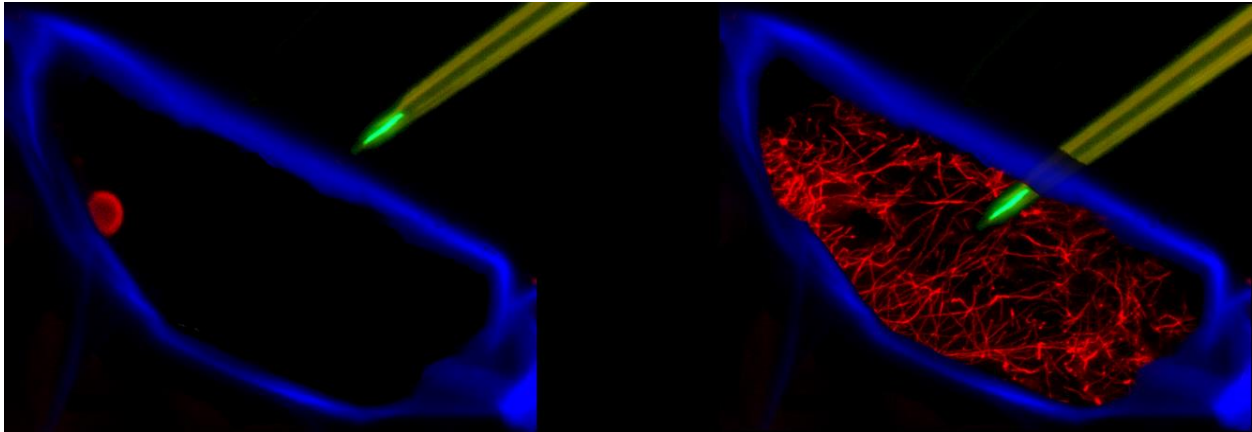


Figure 10 : Activation d'un corps à transmission lors de l'intrusion des stylets du puceron dans la cellule végétale : Le photomontage montre à gauche une cellule d'épiderme, définie par sa paroi colorée en bleu, qui contient un corps à transmission, présenté en rouge. A côté de la cellule sont montrés les stylets d'un puceron, dont l'acrostyle est coloré en vert. L'image à droite montre la même cellule, après insertion des stylets dans le cytoplasme, le corps à transmission est alors « activé » et la P2 est répartie sur les microtubules et plus facilement acquise par le vecteur (Figure : M. Drucker).

P3

La P3 (~15kDa) est la protéine associée à la capsid. Elle est indispensable à la fois pour l'infection de la plante hôte mais également pour la transmission par puceron. Comme décrit plus haut, la P3 lorsqu'elle est associée à une particule virale, peut interagir avec la protéine de mouvement du CaMV (P1) afin de permettre le déplacement de cellule à cellule à travers les plasmodesmes (Stavolone et al., 2005). Elle est également requise pour la transmission car elle interagit avec l'extrémité C terminale du facteur assistant de la transmission (P2) qui ne peut lier directement les particules virales (Figure 10). Au niveau cellulaire, il existe une forme libre de la P3 qui est présente dans les corps à transmission et semble nécessaire pour maintenir la P2 fonctionnelle (Drucker et al., 2002).

P4

La protéine P4 (~57 kDa) est la protéine de la capsid. Elle est traduite sous forme d'un précurseur de 57 kDa puis clivée par la P5 afin de former des produits de clivage de poids moléculaire distincts (42, 39, 37 et 35 kDa). La quantité relative de ces protéines peut varier selon la souche du CaMV ou l'hôte. Plusieurs résidus de la protéine peuvent être phosphorylés par la caséine kinase II cellulaire, et ces

modifications post-transcriptionnelles jouent un rôle crucial dans l'initiation de l'infection (Champagne et al., 2007; Chapdelaine et al., 2002).

P5

La P5 (78 kDa) est une polyprotéine homologue au produit du gène *pol* des rétrovirus. Elle possède à la fois une activité RNase H et une activité de transcription inverse respectivement portées par les régions C- et N-terminales mais ne dispose pas d'un motif intégrase à l'inverse des rétrovirus. Cette caractéristique est propre aux pararétrovirus à l'exception du petunia vein-clearing virus (PVCV) (Richert-Pöggeler & Shepherd, 1997). La protéinase de 18 kDa est libérée par autoclivage de la P5 et participe ensuite à la maturation du précurseur de la capsid (Guidasci et al., 1992).

P6

La protéine P6 (62 kDa) est une protéine multifonctionnelle très abondante dans les cellules infectées car elle est le constituant principal des usines virales (ou corps à inclusion denses). Les usines virales sont des organites viraux non protégés par une membrane dans lesquelles des protéines virales et cellulaires sont recrutées pour la réplication. Elles sont formées par auto-assemblage de la P6. Ces structures sont dynamiques et mobiles au sein de la cellule (Alers-Velazquez et al., 2021; Schoelz et al., 2016). La P6 est impliquée dans de nombreuses étapes de l'infection. Elle est notamment la première protéine produite à partir des ARN 19S et 35S. La synthèse des autres protéines à partir de l'ARN polycistronique 35S dépend de la P6 qui permet la transactivation par « *ribosome shunt* » (Pooggin & Ryabova, 2018). La protéine P6 possède à la fois un signal NES et deux signaux NLS qui lui permettent de franchir la membrane nucléaire à différentes étapes de l'infection. Dans le noyau, elle peut notamment participer à l'inhibition du « *post-transcriptional gene silencing* » (PTGS) (Haas et al. 2008), mais également moduler les régulations épigénétiques en interférant avec les histones désacétylases cellulaires HD2C et HDA6 pour promouvoir l'infection (Li et al. 2021). Son domaine Vir/Avr est responsable de la suppression du « *burst oxydatif* » et de l'autophagie dépendant de l'acide salicylique. En interférant avec ces mécanismes de défense, elle pourrait moduler la colonisation de la plante par d'autres parasites non viraux (d'origine bactérien ou animal) (Chesnais et al., 2021; Hafrén et al., 2017; Zvereva et al., 2016). En effet, la protéine P6 module les relations plantes-insectes en affectant les performances et le comportement alimentaire de son puceron vecteur *Myzus persicae* (Chesnais et al., 2021).

P7

La protéine P7 n'a jamais été détecté *in planta*. Des délétions dans l'ORF7 ne sont pas létales, mais les mutations du codon start révertent rapidement. Ceci indique que la présence d'un ORF (mais pas son produit d'expression) en amont de l'ORF1 est important pour le développement de l'infection, probablement pour réguler ou permettre le ribosome shunt (Dixon and Hohn 1984; Dixon, Jiricny, and Hohn 1986). De plus, une étude de double hybride chez la levure a montré que la protéine interagissait avec la protéine P6 (Lutz et al., 2012).

D) Transmission du CaMV

Dans la nature, la transmission du CaMV est assurée par l'intermédiaire d'un insecte vecteur. Au moins 27 espèces de puceron ont été mentionnées comme vectrices du CaMV (Bak & Emerson, 2020). Aucun cas de transmission par le pollen ou par la graine n'a été décrit. Il peut être facilement transmis mécaniquement en laboratoire, mais la transmission par le contact ne semble pas s'opérer dans la nature. La transmission par puceron est dite non-circulante et semi-persistante, c'est-à-dire que les virions ne sont pas internalisés dans le corps du puceron mais sont seulement retenus dans les stylets du puceron durant quelques heures, voire quelques jours. L'interaction avec le vecteur est donc transitoire et s'effectue uniquement dans une partie très restreinte située dans le canal commun des stylets maxillaires du puceron, l'acrostyle (Uzest et al., 2010). Le CaMV utilise un facteur assistant de la transmission – la protéine P2 – qui va former un pont protéique afin de permettre l'accrochage des particules virales dans l'acrostyle (Armour et al., 1983; Lung & Pirone, 1974; Uzest et al., 2007). Plus précisément, l'extrémité N terminal de la P2 va relier un récepteur protéique (une styline) enchâssée dans la cuticule des stylets (Webster et al., 2018), alors que l'extrémité C-terminal de la P2 se lie à la protéine associée de la capsid (P3) qui entoure la particule virale (Leh, 1999; Plisson et al., 2005) (Figure 11). Deux dynamiques de formation du complexe transmissible du CaMV (P2:P3:virions) sont possibles. Lors de l'activation de la transmission la P2 peut s'associer à la P3 et former le complexe complet dans la cellule infectée, ou alors la P2 peut se fixer seule dans les stylets et s'en suit l'interaction avec l'association P3:virions qui a toujours lieu préalablement dans la cellule végétale (Drucker et al., 2002). Ce second mécanisme permet l'acquisition de P3:virions depuis la sève du phloème qui ne contient pas de P2 (Palacios et al., 2002). Environ 800 particules peuvent être retenues simultanément dans les stylets d'un puceron.

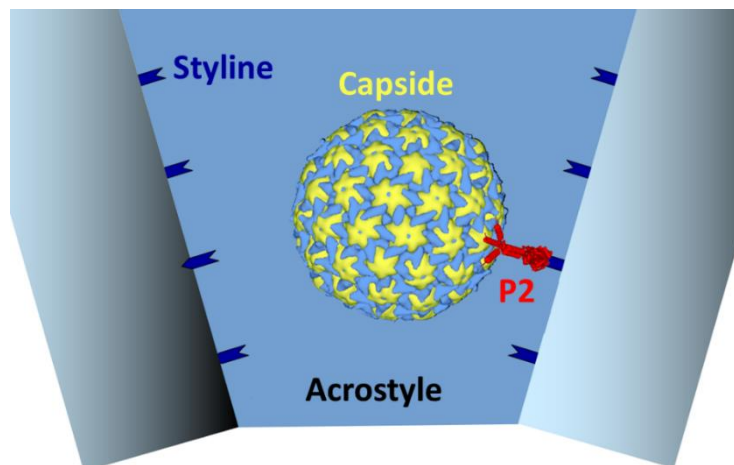


Figure 11 : Représentation de l'interaction d'une particule virale du CaMV dans les stylets maxillaires d'un puceron. Une particule virale composée de protéines de la capsid (en jaune) et de protéines P3 associées à la capsid (en bleu clair) interagit avec le facteur assistant de la transmission (la protéine P2 en rouge) accrochée à un récepteur protéique (styline-1, bleu foncé) situé sur la surface interne des stylets du puceron. Cette interaction n'a lieu qu'au niveau de l'acrostyle, une partie très restreinte du canal commun des stylets maxillaires. Caractérisation tridimensionnelle de la particule virale d'après (Plisson et al., 2005) et représentation S. Blanc & M. Drucker

III – Le turnip yellows virus

A) Généralités

Le turnip yellows virus (TuYV) fait partie du genre des *Polerovirus* dont le membre type est le potato leafroll virus (PLRV) et qui donne son nom au taxon. Avec trois autres genres, les *Enamovirus*, les *Polemovirus* et les *Sobemovirus*, ils forment la famille des *Solemoviridae* (anciennement *Poleroviridae*). Le TuYV possède un génome monopartite à ARN simple brin d'environ 5640 nucléotides contenant 7 ORF chevauchants (de l'ORF0 à l'ORF5 et l'ORF 3a) codant pour les sept protéines associées (Boissinot et al., 2020; Delfosse et al., 2021). L'ARN est coiffé par la protéine virale Vg et ne contient pas de queue poly-A. La capside icosaédrique de symétrie T = 3 d'environ 25 nm de diamètre est constituée de deux protéines. Sa formation nécessite 180 unités de la protéine majeure de la capside appelée CP, et seulement quelques molécules de la protéine mineure de la capside, la RT. Celle-ci tient son nom du phénomène de 'readthrough' qui permet au ribosome de poursuivre la traduction après le codon stop de la CP. Chez le TuYV, aucune de ces deux protéines ne semblent ni glycosylée ni acétylée, alors que chez le barley yellow dwarf virus - RPV (BYDV-RPV, famille : *Solemoviridae*, genre : *Polerovirus*), deux résidus lysines de la CP sont acétylés (Cilia et al., 2014).

B) Gamme d'hôte, symptomatologie et tropisme tissulaire

Le TuYV peut infecter au moins 23 familles végétales incluant les *Chenopodiaceae*, *Asteraceae*, *Solenaceae*, *Cucurbitaceae*, et *Fabaceae* (Beuve et al., 2008). Parmi cette gamme d'hôte très étendue, certains correspondent à des plantes cultivées (e.g., le colza, le chou-fleur, le brocoli, la laitue, le radis, le navet et la tomate) et font donc du TuYV un virus à importance agroéconomique. Le TuYV infecte également la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Figure 12a). De plus, de nombreuses adventices ou poacées sont des hôtes naturels du TuYV et jouent le rôle de réservoir viral, rendant le contrôle de ce virus difficile au champ. Le symptôme caractéristique du TuYV est le jaunissement foliaire. Cependant, les modifications phénotypes liées à l'infection peuvent se décliner selon un large éventail et dépendent de l'hôte infecté. La décoloration des feuilles peut tendre vers le jaune, le rouge ou le violet chez le colza et de nombreuses brassicacées, alors que les féverolles peuvent être atteintes de rabougrissements et de nécroses en plus du jaunissement. La versatilité des symptômes, l'imputabilité du jaunissement à de nombreux autres facteurs biotiques ou abiotiques et la présence de plantes asymptomatiques rendent la détection du TuYV en champs difficile sans diagnostic moléculaire. Comme tous les *Solemoviridae* à l'exception du complexe mutualiste du pea enation mosaic 1 (PEMV1, genre : *Enamovirus*) et du pea enation mosaic 2 (PEMV2, genre *Umbravirus*), le TuYV est strictement limité aux tissus du phloème. C'est-à-dire qu'il n'infecte que les cellules compagnes et les tubes criblés, ce qui correspond à environ 5% des cellules végétales (Figure 12).

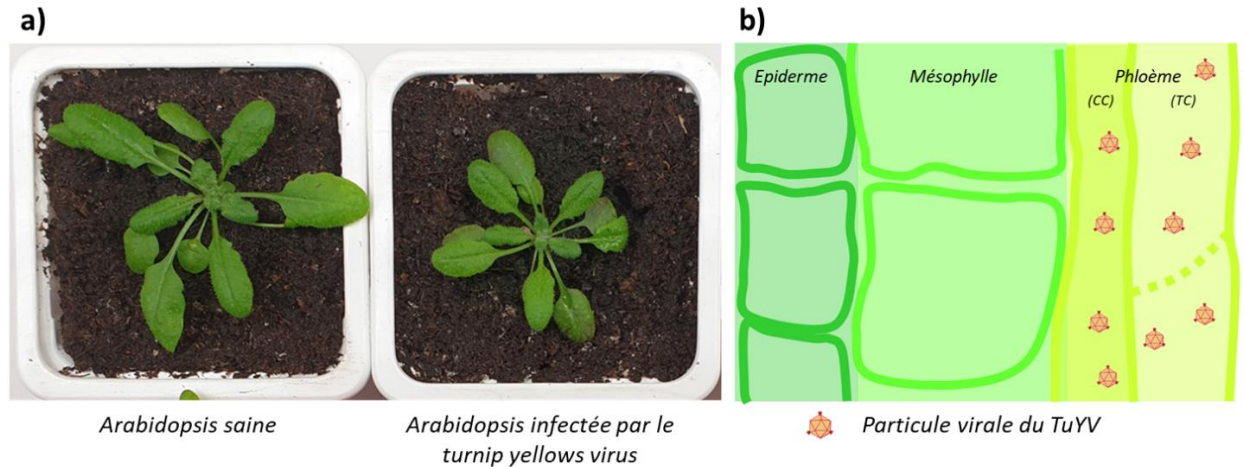


Figure 12 : Infection d'Arabidopsis par le turnip yellows virus. a) Photographie illustrant le phénotype d'Arabidopsis lors de l'infection du TuYV à trois semaines post-inoculation (équivalent à des plantes âgées de cinq semaines). Les Arabidopsis infectées par le TuYV ont une surface foliaire réduite en comparaison des plantes saines et les feuilles les plus âgées affichent des colorations violacées, probablement liées à l'accumulation d'anthocyanes. b) Représentation schématique du tropisme tissulaire du TuYV. La réplication et la présence des particules virales du TuYV sont limitées aux tissus du phloème, à savoir les cellules compagnes et les tubes criblés. Photographie de Q. Chesnais et schéma adapté à partir d'une présentation de F. Tjallingii.

C) Les protéines du TuYV

P0

La protéine P0 (~29 kDa) est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la suppression du 'post-transcriptionnel gene silencing' (PTGS), la réponse hypersensible (Der Wang et al., 2015), et semblerait intervenir dans l'interaction plante-virus-puceron. Due à la séquence entourant le codon initiateur AUG suboptimal, l'accumulation de la P0 est très faible dans son hôte. Ce codon est soumis à une forte sélection car son remplacement par un codon plus efficace provoque une réduction du titre viral (Pfeffer et al., 2002). Son activité de suppresseur de RNA silencing intervient par la dégradation de la protéine ARGONAUTE1, une protéine pouvant lier l'ARN guide et faisant partie du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) qui est indispensable pour la séquestration ou le clivage des ARN cibles (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Pfeffer et al., 2002). Récemment, il a été montré que AGO1 est stabilisé dans la vasculature des plantes infectées, indiquant que le rôle de la P0 du TuYV dans la suppression du silencing n'est pas si simple (Clavel et al., 2021). Chez le PLRV, la P0 ainsi que la P1 et la P7 (protéine non présente chez le TuYV) modulent aussi d'autres mécanismes de défenses, notamment les voies du jasmonate et de l'éthylène ce qui influence le comportement du puceron vecteur *Myzus persicae* (Patton et al., 2020), cependant les mécanismes sous-jacents responsables ne sont pas identifiés.

P1

La protéine P1 (~70 kDa) est impliquée dans un grand nombre de processus liés à la réplication virale (Sadowy et al., 2001). Elle possède deux domaines transmembranaires associés à la formation du complexe de réplication. La VPg (genome-binding protein) est traduite avec la P1 puis relâchée par clivage protéolytique de la protéase à sérine portée par la P1 (Li, Halpin, and Ryan 2007).

P2

La protéine P2 (~119 kDa) est exprimée fusionnée à la protéine P1 par un décalage de -1 du cadre de lecture. La P2, ou protéine P1P2 est la polymérase du TuYV et possède une activité ARN-polymérase-ARN-dépendante. Avec la protéine P1, elles sont les deux seules protéines virales strictement nécessaires à la réplication (en plus des facteurs de l'hôte également impliqués) (Reutenauer et al., 1993). Le décalage du cadre de lecture nécessaire à la traduction de la P1P2 ne se produit que peu fréquemment, entre 1% et 30% des ribosomes poursuivent la traduction après l'atteinte du codon stop de la P1 (Delfosse et al., 2021).

P3

La P3 (~24 kDa) est la protéine majeure de la capsid (CP). Cent quatre-vingt protéines sont nécessaires pour la formation d'une particule icosaédrique complète de symétrie T = 3. La formation de la capsid est à la fois requise pour le mouvement de cellule à cellule (Hipper et al., 2014) et pour la transmission (Brault et al., 2005). Chez le PLRV, la localisation nucléaire et nucléolaire de la CP suggère que cette protéine virale pourrait également influencer la régulation des gènes cellulaires des plantes hôtes, ou interagir avec des protéines nucléaires essentielles au cycle viral (Haupt et al., 2005). De manière intéressante, la CP nucléaire ne semble pas être sous forme de virion (Haupt et al., 2005). Également chez le PLRV, DeBlasio et al. (2016) ont mis en évidence que la CP interagissait avec 32 protéines de l'hôte impliquées dans de diverses voies biochimiques comme notamment la photosynthèse, la fixation du carbone, la défense des plantes, le trafic cellulaire ou encore le repliement des protéines.

P3a

La P3a est une petite protéine d'environ 5 kDa. A cause de son codon d'initiation non canonique la protéine P3a n'a été découverte que récemment (Smirnova et al., 2015). Elle est impliquée dans le mouvement, et au moins chez le PLRV, interagit avec plusieurs partenaires viraux à savoir la protéine de mouvement (P4) et la RT. La proline 18 a été identifiée comme un résidu important pour les fonctions de mouvement et d'établissement de l'infection (Zhang et al., 2018).

P4

La protéine P4 (~17 kDa) dont l'ORF est contenu dans l'ORF3, possède de nombreuses caractéristiques propres des protéines virales de mouvement (Lucas, 2006). Elle est requise pour l'infection systémique (Lee et al., 2002; Ziegler-Graff, 1996), interagit avec les plasmodesmes et accroît leurs diamètres (Hofius et al., 2001; Lee et al., 2002). De plus, il a été montré que la P4 altère le métabolisme de l'amidon et influence l'allocation des sucres libres des tissus puits vers les tissus sources. Cet effet étant fortement dose dépendant et ayant été étudié dans des plantes transgéniques, il n'a pas encore été démontré lors d'infection sauvage (Herbers et al., 1997; Hofius et al., 2001).

P5

La protéine P5 est la protéine mineure de la capsid et est traduite sous la forme d'une protéine fusion P3-P5 par un phénomène de « *ribosomal readthrough* » au niveau du codon stop de la P3. Sous sa forme « tronquée » (55 kDa) elle est donc composée de la protéine CP et d'un domaine supplémentaire le RT domaine (RTD). Son enchâssement dans la capsid n'est pas nécessaire pour la formation d'une particule virale. En revanche sa présence est indispensable pour la transmission. La RT semble interagir avec le

récepteur à l'éphrine (Eph), et serait impliquée dans l'internalisation des virions dans le puceron (Mulot et al., 2018). Une seconde forme, la RT « complète » (74 kDa), est détectée libre dans la cellule mais également dans le noyau chez le PLRV (Haupt et al., 2005). Les deux formes de la RT semblent être impliquées dans le mouvement à longue distance à travers les tissus vasculaires de la plante (Boissinot et al., 2014).

D) Transmission du TuYV

A l'exception du pepper whitefly-borne vein yellows virus (PeWBVYV) transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci* (Ghosh et al., 2019), tous les polerovirus dont le TuYV, sont transmis par puceron selon le mode de transmission circulant, persistant et non-propagatif. Une fois que le puceron ingère de la sève dans les tissus du phloème, les particules virales circulent dans son tube digestif et peuvent être internalisées dans l'hémocoel. Cela peut avoir lieu au niveau de l'intestin moyen pour le PLRV (Garret et al., 1993) ou le TuYV (Reinbold et al., 2001), alors que l'internalisation a lieu au niveau de l'intestin postérieur pour le barley yellow dwarf virus (BYDV ; Genre : *Solemoviridae* ; Famille : *Tombusviridae*) (Li et al. 2001). En ce qui concerne plus particulièrement le TuYV, l'internalisation se fait par l'intermédiaire de vésicules à clathrine au niveau du pôle apical des cellules intestinales (Brault et al., 2007). L'implication d'un récepteur à l'éphrine (Eph) dans ce mécanisme a été la première identification d'un récepteur permettant l'internalisation d'un polerovirus dans son puceron vecteur (Mulot et al., 2018). La réduction artificielle de l'expression du gène codant cette protéine par l'utilisation d'ARN double brin induisant le silencing a montré à la fois une diminution du nombre de copies virales internalisées dans l'hémolymphe, et également une diminution du taux de transmission (Mulot et al., 2018). Une fois dans l'hémolymphe, les virions doivent pénétrer les glandes salivaires afin d'être inoculés par le puceron en tant que composant salivaire. Malgré l'absence de réplication dans le puceron, ce dernier reste porteur du virus (i.e., virulifère) toute sa vie.

Chapitre 1 : Effets du CaMV sur le
comportement de son vecteur *Myzus*
persicae

Résumé du chapitre 1

CONTEXTE

Les virus de plantes influencent différentes phases comportementales et traits d'histoire de vie de leurs vecteurs afin de favoriser leur propre transmission. Le comportement alimentaire des pucerons est un élément clé pour la transmission virale. En effet, selon la persistance du virus dans le vecteur et le tropisme tissulaire dans la plante, certaines sous-phases du comportement alimentaire (piques intra-cellulaires, ingestion de sève du phloème...) sont incontournables pour l'acquisition et l'inoculation des particules virales. Des observations réalisées avec des virus appartenant à des clades distincts montrent que les virus circulants-persistants (CP) ont tendance à favoriser un contact durable entre l'insecte et la plante infectée, alors qu'à l'inverse les virus non-circulants non-persistants (NCNP) découragent les vecteurs de s'établir sur les plantes infectées et favorisent un départ rapide de ces derniers après l'acquisition. Les virus non-circulants semi-persistants (NCSP) sont, quant à eux, très peu étudiés et leur mode de transmission intermédiaire pose des questions sur les effets qu'ils peuvent avoir sur les interactions plantes-insectes-vecteurs.

HYPOTHESE(S) et OBJECTIF(S)

Si le CaMV induit des réponses comportementales et/ou physiologiques sur son puceron vecteur, *Myzus persicae*, favorisant sa propre transmission, alors des déterminants viraux doivent être impliqués. Un des objectifs de ce chapitre est d'identifier les facteurs protéiques qui influencent le comportement alimentaire et les performances du puceron vecteur. Nous avons également comme objectif de caractériser le mode d'action des protéines identifiées. Ces résultats permettront une meilleure compréhension des interactions virus-plante-insecte pour les virus NCSP.

METHODE

Afin de séparer les effets, potentiellement intriqués, des différentes protéines du CaMV sur le comportement alimentaire de *M. persicae*, nous avons employés plusieurs méthodologies. La première consiste en l'utilisation de plantes transgéniques n'exprimant qu'une seule protéine virale. Ce type d'approche a été employée pour l'étude de la P6 du CaMV, en utilisant plusieurs variants issus de différentes souches du CaMV et des mutants de la protéine P6. Pour l'étude de la P2, cette protéine n'étant pas nécessaire à la réplication virale, nous l'avons retiré du génome viral et utilisé un virus mutant ne l'exprimant pas (B-J1ΔP2). En complément, dans le but d'étudier les effets de la P2 seule, sans interférence causée par d'autres facteurs viraux ou de la plante, nous avons utilisé la P2 purifiée à partir des cellules *Sf9* infectées par des baculovirus recombinants. Ce type d'approche, associée à la purification de particules virales et de la protéine P3, a permis de constituer un milieu artificiel comportant le complexe transmissible complet du CaMV. En s'affranchissant d'une acquisition sur plante infectée, nous avons pu étudier l'effet direct de l'acquisition de la P2 ainsi que du complexe transmissible du CaMV par le puceron sur son comportement alimentaire.

Deux types de modifications comportementales ont été observées en présence du CaMV, i) l'infection augmente la durée d'ingestion de sève des pucerons se nourrissant sur les plantes infectées, ii) lors des premiers contacts entre la plante infectée et le puceron (« probing »), ce dernier insert ses stylets dans la plante un plus grand nombre de fois et effectue plus de

pénétrations intracellulaires. Les pucerons réalisent des phases d'ingestion de sève du phloème plus longues sur des plantes exprimant la protéine P6, indiquant que celle-ci est (au moins en partie) responsable de l'amélioration du comportement alimentaire des vecteurs sur les plantes infectées. La protéine P6 n'est pas responsable de la réduction des performances du puceron vecteur *M. persicae* sur les plantes infectées par le CaMV. Le comportement de « probing » est altéré chez les pucerons après acquisition du virus sur plante infectée, mais également après acquisition du complexe transmissible complet ou de la P2 seule, sur un milieu artificiel, ce qui indique un effet « direct » de la protéine sur le comportement du vecteur.

Le CaMV est un virus NCSP dont les particules virales dans les stylets du puceron sont retenues seulement quelques heures (ou quelques jours) avant une potentielle inoculation. La réduction des performances de son vecteur, comme cela a été observé dans notre étude ou chez d'autres virus NC, pourrait encourager les vecteurs à rapidement se disperser vers un nouvel hôte de meilleure qualité et ainsi favoriser l'inoculation virale ultérieure. Nos travaux sur la protéine P6 ont montré qu'elle ne semble pas jouer un rôle dans la réduction des performances de *M. persicae* sur les plantes infectées par le CaMV.

L'acquisition du CaMV par son vecteur dépend du comportement effectué par le puceron sur la plante infectée. Le CaMV peut être acquis après une piqûre intracellulaire (dans l'épiderme ou le mésophylle) mais également, et de façon plus efficace, suite à une phase d'ingestion de sève dans le phloème (précédée par de nombreuses piqûres intracellulaires). Nous avons observé une augmentation de la durée totale d'ingestion de sève pour les pucerons placés sur les plantes infectées et différentes plantes transgéniques P6. Cette modification du comportement, causée par la P6 et en particulier le domaine protéique N-terminal (Vir/Avr, responsable entre autres, de la virulence et de la suppression de l'immunité innée), semble donc avantageuse pour l'acquisition virale.

L'infection par le CaMV augmente le nombre de piqûres intra-cellulaires réalisées par les pucerons sur des plantes infectées ou lorsqu'ils sont virulifères. Bien que moins efficaces en termes de transmission virale que l'ingestion de sève, une augmentation du nombre de ces pénétrations intra-cellulaires pourrait néanmoins améliorer à la fois l'acquisition et l'inoculation. En effet, l'accès au phloème et l'ingestion soutenue de sève sont les dernières étapes d'un enchaînement complexe de comportements d'évaluation de la plante hôte effectués par le puceron. Seuls des pucerons dont la plante fait partie de leur gamme d'hôte peuvent atteindre le phloème. De fait, cette modification comportementale pourrait aussi affecter des pucerons qui n'entrent en contact avec la plante infectée que de façon très transitoire, et favoriser leurs comportements de vexion essentiellement basé sur les piqûres intracellulaires. La délétion (plantes transgéniques) ou l'ajout de la P2 (milieu artificiel) a permis d'attribuer ces altérations du « probing » à la protéine P2.

Les points marquants :

- ◆ L'infection du CaMV réduit les performances de son vecteur *Myzus persicae* mais le facteur viral responsable n'a pas été identifié.
- ◆ Le CaMV modifie plusieurs paramètres du comportement alimentaires de *Myzus persicae* afin d'améliorer sa transmission.
- ◆ L'expression de la protéine P6 du CaMV seule induit une augmentation d'ingestion de sève similaire à celle observée lors d'une infection sauvage. Cet effet sur le vecteur semble être « indirect » (médié par la plante-hôte).
- ◆ Retirer le domaine Vir/Avr de la P6 annihile son effet, il est donc indispensable à la modification de comportement.
- ◆ Le CaMV augmente le nombre d'insertion des stylets dans la plante et le nombre de piqûres intracellulaires. Cet effet peut être aboli en utilisant le virus B-JIΔP2, ou bien induit artificiellement en nourrissant le puceron sur du milieu artificiel contenant de la P2.
- ◆ L'effet de la P2 est direct et lié à une interaction supposée entre la P2 et les stylines situées dans l'acrostyle des stylets du puceron. C'est la première description de ce type de phénomène pour un virus non-circulant.

Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected *Arabidopsis*

Quentin Chesnais¹ | Maxime Verdier¹ | Myriam Burckbuchler¹ | Véronique Brault¹ | Mikhail Pooggin² | Martin Drucker ¹

¹Virus Vection, SVQV, UMR 1131 INRAE, Université de Strasbourg, INRAE Centre Grand Est-Colmar, Colmar, France

²DEFENSIRNA, PHIM, INRAE, CIRAD, SupAgro, IRD, MUSE, INRAE Centre Occitanie-Montpellier, Montferrier-sur-Lez, France

Correspondence

Martin Drucker, SVQV, UMR 1131, INRAE Centre Grand Est-Colmar, 28 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France. Email: martin.drucker@inrae.fr

Present address

Martin Drucker, Insect Models of Innate Immunity, IBMC, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 2 allée Konrad Roentgen, 67084 Strasbourg cedex, France

Funding information

Human Frontier Science Program, Grant/Award Number: RGP0013/2015; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-18-CE20-0017-01

Abstract

Emerging evidence suggests that viral infection modifies host plant traits that in turn alter behaviour and performance of vectors colonizing the plants in a way conducive for transmission of both nonpersistent and persistent viruses. Similar evidence for semipersistent viruses like cauliflower mosaic virus (CaMV) is scarce. Here we compared the effects of *Arabidopsis* infection with mild (CM) and severe (JI) CaMV isolates on the feeding behaviour (recorded by the electrical penetration graph technique) and fecundity of the aphid vector *Myzus persicae*. Compared to mock-inoculated plants, feeding behaviour was altered similarly on CM- and JI-infected plants, but only aphids on JI-infected plants had reduced fecundity. To evaluate the role of the multifunctional CaMV protein P6-TAV, aphid feeding behaviour and fecundity were tested on transgenic *Arabidopsis* plants expressing wild-type (wt) and mutant versions of P6-TAV. In contrast to viral infection, aphid fecundity was unchanged on all transgenic lines, suggesting that other viral factors compromise fecundity. Aphid feeding behaviour was modified on wt P6-CM-, but not on wt P6-JI-expressing plants. Analysis of plants expressing P6 mutants identified N-terminal P6 domains contributing to modification of feeding behaviour. Taken together, we show that CaMV infection can modify both aphid fecundity and feeding behaviour and that P6 is only involved in the latter.

KEYWORDS

aphid vector, plant virus, vector behaviour, vector modification, vector transmission, viral factors

1 | INTRODUCTION

Most plant viruses rely on arthropod vectors for their transmission to a new host. Among these, insects with a piercing-sucking feeding

behaviour such as aphids are the most efficient vectors, because they can, with great precision and without inflicting major damage to plant cells, acquire and inoculate viruses in distinct plant tissues. Evidence accumulates that viruses interact with both hosts and

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Molecular Plant Pathology* published by British Society for Plant Pathology and John Wiley & Sons Ltd

vectors and alter some of their characteristics to optimize transmission. The interactions may be direct, that is, changes in vector behaviour or fitness following virus acquisition by and retention in the vector, or indirect, that is, plant traits like odour, colour, and nutritive value modified by viral infection impact vector behaviour and fitness (for review see Dáder et al., 2017; Fereres & Moreno, 2009; Mauck et al., 2018). The ways viruses modify or even manipulate plant hosts and vectors depend on the transmission mode and tissue tropism of the virus (Mauck et al., 2012). Transmission modes are classified by two criteria: retention time in the vector (persistence) and vector interaction, with circulative viruses cycling through the vector body before being inoculated as a saliva component into a new host plant and noncirculative viruses interacting only with the vector mouthparts. Circulative and persistent viruses are most often phloem-restricted and characterized by long acquisition and retention times in the vector, resulting in prolonged, often lifelong transmissibility. General predictions assume that these viruses would benefit from fast and prolonged access of vectors to the phloem, which would facilitate virus acquisition. The circulative and persistent viruses also tend to increase food quality of the host, resulting in an improvement in vector fitness and an increase in vector population (Dáder et al., 2017; Fereres & Moreno, 2009; Mauck et al., 2018). In contrast, noncirculative and nonpersistent viruses are often tissue generalists, with fast acquisition and short retention times. Plants infected with noncirculative and nonpersistent viruses may attract vectors for virus acquisition (Fereres & Moreno, 2009) and subsequently encourage them to leave the plants rapidly for fast dispersal of the virus, as shown for cucumber mosaic virus (Mauck et al., 2010). Vector departure is often related to the poor taste and low nutritive value of infected plants (Mauck et al., 2014). While many reports support these models, there are also a number of examples that do not follow the expectations. Outcome of virus–host–vector interactions may vary depending on the specific virus–host–vector combination and probably other factors (Mauck & Chesnais, 2020; Mauck et al., 2018).

Cauliflower mosaic virus (CaMV) (genus *Caulimovirus*, family *Caulimoviridae*) has features of nonpersistent and persistent viruses and is often classified as a semipersistent virus. Being a tissue generalist, CaMV can infect all cell types and is acquired from epidermis and mesophyll cells like nonpersistent viruses, but also from the phloem sap like persistent viruses (Palacios et al., 2002). With regard to vector interaction, CaMV is a noncirculative virus that binds to stylin receptors in the stylet tips of its aphid vectors (Uzest et al., 2010; Webster et al., 2018). Virus particles require the virus-encoded transmission helper protein P2 for vector interaction that forms a complex with the virions (Leh et al., 1999; Moreno et al., 2005). Formation of this P2–virus complex, mandatory for transmission, can occur in infected plant cells or in the stylets, allowing simultaneous or sequential binding of P2 and virus to the vector (Drucker et al., 2002). Simultaneous binding is associated with fast CaMV acquisition from epidermis and mesophyll, whereas sequential binding favours uptake of CaMV from the phloem sieve tubes that contain virions but are devoid of P2 (Palacios et al., 2002).

Whereas the molecular and cellular mechanisms of CaMV acquisition are well studied, information on the effect of CaMV infection on transmission-relevant changes in aphid behaviour and performance is scarce. Chesnais et al. (2019) reported that the green peach aphid *Myzus persicae* and the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* did not show any preference for CaMV-infected *Camelina sativa* plants. Both aphid species created more intracellular punctures, ingested less phloem sap, and displayed reduced fecundity on infected plants compared to healthy plants, as expected for a nonpersistent virus.

In this study, we tested how different isolates of CaMV affect *M. persicae* feeding behaviour and fitness on the model plant *Arabidopsis thaliana*. We then addressed the specific role of the multifunctional viral protein P6-TAV in modification of aphid traits. P6 is a key player in CaMV infection (for review see Pooggin & Ryabova, 2018; Schoelz et al., 2016). It is required for translation of the polycistronic CaMV 35S RNA and interacts, among others, with TOR kinase. TOR is involved in translation initiation, but plays also a pivotal role in controlling cell homeostasis of catabolic and anabolic processes. P6 binding triggers TOR phosphorylation, which then promotes protein translation and simultaneously suppresses potential antiviral autophagy and innate immunity (Hafren et al., 2017; Zvereva et al., 2016). P6 is also a suppressor of RNA silencing and sufficient to induce typical symptoms of infection by itself (Yu et al., 2003). Finally, P6 is the matrix protein of the viral factories, where replication occurs and virus particles are stored (Schoelz & Leisner, 2017). The P6 functions in dampening plant defences and in inducing symptom expression could impact aphid–plant interactions. P6 is, therefore, a perfect candidate to modify aphid behaviour and performance.

2 | RESULTS

2.1 | Effect of viral infection on *M. persicae*

We first compared the impact of CaMV infection on *M. persicae* feeding behaviour and performance. For this, we chose the well-characterized CaMV isolates Cabb B-JI (referred to as JI) and Cm1841 that accumulate in infected Brassicaceae at high and low levels (Lung & Pirone, 1973) and cause severe and mild symptoms in *Arabidopsis*, respectively (Cecchini et al., 1998). Unlike JI, Cm1841 is a nontransmissible CaMV isolate, due to a mutation of amino acid 94 in the transmission helper protein P2 (Woolston et al., 1987). For better comparison, we reverted this mutation to wild type (wt) and carried out all experiments with the revertant virus, Cm1841-Rev, hereafter referred to as CM. Figure 1a–c shows that, at 21 days post-inoculation, JI-infected *Arabidopsis* Col-0 plants displayed stronger symptoms compared to CM-infected plants with a reduced growth, intense yellowing, and leaf curling. In addition, we observed lower accumulation of P2, P4 capsid protein, and P6-TAV protein in CM-infected plants (Figure 1d).

We next evaluated aphid fecundity on infected and mock-inoculated plants by counting the number of offspring of synchronized adult wingless aphids after 5 days of infestation. Fecundity

FIGURE 1 Symptoms of CaMV infection and viral protein accumulation in *Arabidopsis* Col-0 plants. (a) Mock-inoculated, (b) CM-infected, and (c) JI-infected plant 21 days postinoculation with virus-free or viruliferous aphids. Scale bar = 5 cm. (d) Western blot analysis of accumulation of CaMV proteins in CM- and JI-infected *Arabidopsis* 21 days postinoculation. The membranes were stained for P2 (left panel), P4 (middle panel), and P6 (right panel). Ponceau red staining of the large RuBisCO subunit is shown as a loading control. Molecular weights are indicated on the right of the blots

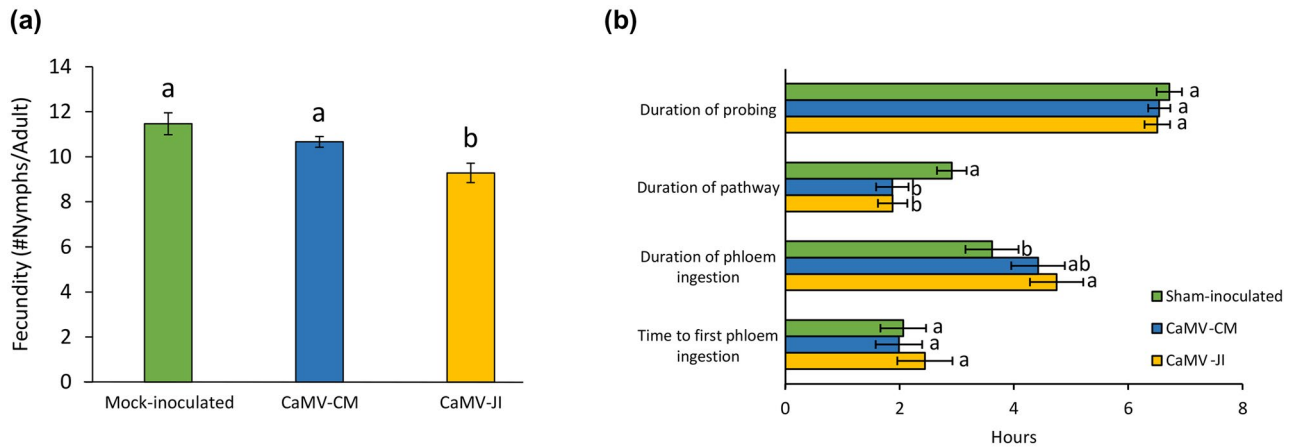
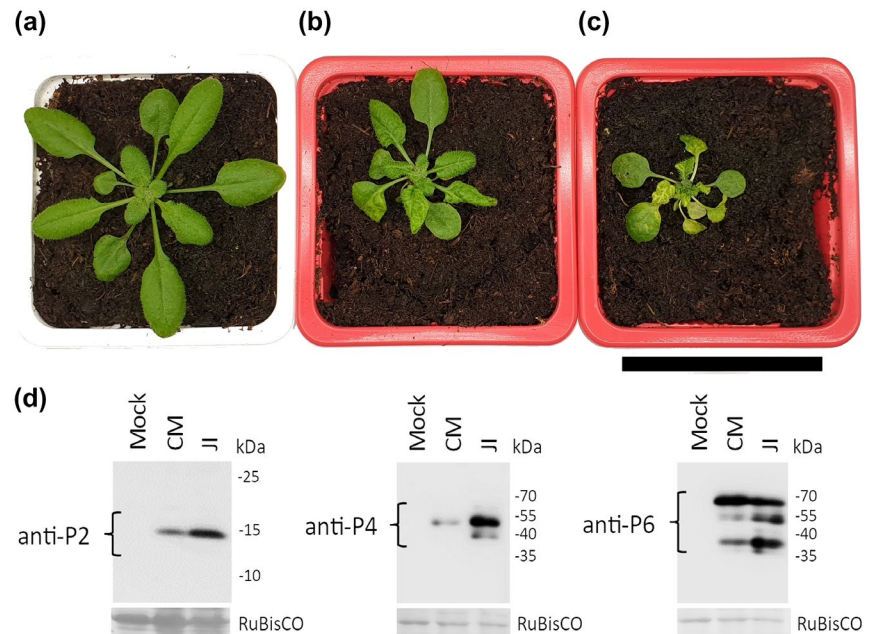


FIGURE 2 Fecundity and feeding behaviour of *Myzus persicae* on mock-inoculated or CaMV-infected *Arabidopsis*. Two-week-old plants were inoculated with the indicated isolate and used 3 weeks later for the experiments. (a) Aphid fecundity after 5 days of infestation ($n = 28\text{--}33$). (b) Aphid feeding behaviour parameters recorded with the electrical penetration graph (EPG) technique ($n = 22\text{--}27$). Letters show significant differences between plant infection status as tested by GLM followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < .05$; method: Tukey)

was significantly lower on JI-infected *Arabidopsis* compared to mock-inoculated control plants and CM-infected plants (generalized linear model [GLM], $df = 2$, $\chi^2 = 15.542$, $p < .001$; Figure 2a).

Then we assayed aphid feeding behaviour by the electrical penetration graph (EPG) technique. Behaviour of individual aphids was recorded for 8 hr on mock-inoculated or infected *Arabidopsis*. The total duration of probing in plant tissue and the time to the first phloem phase were not affected by either CaMV isolate (GLM, $df = 2$, $\chi^2 = 0.952$, $p = .621$; Cox model, $\chi^2 = 0.07$, $p = .96$; Figure 2b). The duration of the pathway phase was significantly reduced on infected *Arabidopsis* for both isolates (GLM, $df = 2$, $\chi^2 = 11.14$, $p = .004$). The duration of phloem ingestion was significantly longer on JI-infected *Arabidopsis* compared to CM-infected and mock-inoculated plants (GLM, $df = 2$, $\chi^2 = 6.27$, $p = .04$; Figure 2b).

2.2 | Effect of P6 on aphids

We used transgenic *Arabidopsis* expressing wt and mutant P6 proteins from the constitutive 35S promoter to determine whether P6 is involved in plant–aphid interactions. Figure 3a–h shows the phenotype of Col-0 plants expressing the P6 proteins 5 weeks after germination: Plants expressing wt P6 from JI or CM or P6 from CM with an N-terminal HA-tag (P6-CM-HA) were smaller and leaves showed yellowing but no leaf curling as CaMV-infected plants (Figure 3b,d,g). Plants expressing P6 from CaMV isolate D4 resembled untransformed plants (Figure 3c). *Arabidopsis* plants expressing mutated versions of P6 from isolate JI, JI-Eki (bearing three amino acid substitutions at P6’s N-terminus) and JI- Δ dsR (containing a deletion of the TOR- and RNA-binding region), displayed no or only

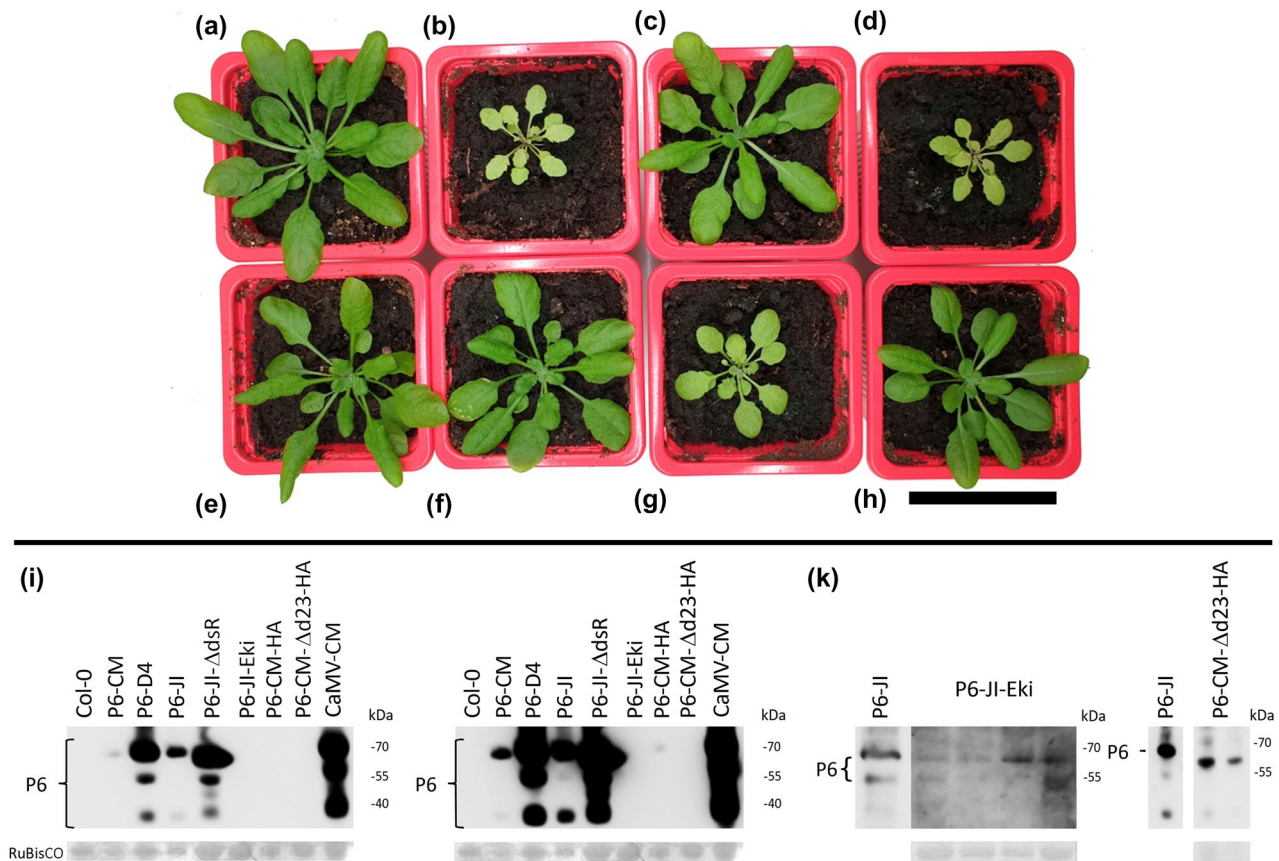


FIGURE 3 Phenotype of 5-week-old transgenic *Arabidopsis* plants expressing various P6 proteins. The images show (a) an untransformed Col-0 plant and (b–h) transgenic Col-0 plants expressing (b) P6 from the CaMV isolate CM; (c) P6 from isolate D4; (d) P6 from isolate JI; (e) the P6 dsR domain deletion mutant from isolate JI, referred to as JI-ΔdsR; (f) the P6 Eki mutant from isolate JI, referred to as JI-Eki; (g) HA-tagged wild-type P6 from CM (CM-HA), and (h) the HA-tagged P6 Vir/Avr domain deletion mutant from isolate CM, referred to as CM-Δd23-HA. Scale bar = 5 cm. (i) Western blot analysis of P6 protein accumulation in 5-week-old transgenic plants expressing the indicated P6 mutants. The figure shows the same blot revealed with a short (left) or a longer (right) exposure time to visualize weak bands. Extracts prepared from untransformed Col-0 and from CM-infected leaves were loaded as negative and positive controls, respectively. (j) Detection of P6-JI-Eki and P6-CM-Δd23-HA by western blot. The two proteins that were not detected in the blot shown in (i) could be revealed in a different experiment using more concentrated extracts. Each lane presents extract from a different transgenic plant. Signals from wild-type P6 loaded on the same blots are shown to the left of the panels and either the blots were exposed much shorter (P6-JI-Eki) or extracts were diluted (P6-CM-Δd23-HA). Note that the mutant P6 concentration varied considerably. Ponceau red staining of the large RuBisCO subunit is shown as a loading control

a weak phenotype compared to untransformed plants (Figure 3e,f). Also, the P6 CM-Δd23-HA mutant (containing an N-terminal HA-tag and a deletion of the virulence/avirulence region Vir/Avr) induced no visible phenotype (Figure 3h). Western blotting indicated strong accumulation of P6-D4 and P6-JI-ΔdsR and low accumulation of P6-CM and P6-JI in transgenic plants (Figure 3i). P6-CM-HA was visible after prolonged exposure of the blot, and P6-JI-Eki and P6-CM-Δd23-HA only after redoing the blots (Figure 3j).

M. persicae fecundity was assayed on the P6-expressing transgenic plants. In contrast to CaMV-infected plants, aphid fecundity was not affected on any transgenic plant when compared to untransformed plants (GLM, $df = 7$, $\chi^2 = 6.61$, $p = .478$; Figure 4).

Then, the feeding behaviour of *M. persicae* on the P6-transgenic plants was analysed by EPG (Figure 5). All aphid behaviour parameters on P6-D4 plants were similar to those on untransformed Col-0 plants. We detected significant differences in aphid feeding behaviour on the other transgenic plants. Compared to plants expressing P6-CM and

P6-CM-HA, aphids probed for significantly shorter times on P6-CM-Δd23-HA and P6-JI plants (GLM, $df = 7$, $\chi^2 = 23.07$, $p = .002$; Figure 5). The pathway phase was significantly reduced on P6-CM-HA plants, compared to P6-CM-Δd23-HA, JI, and untransformed Col-0 plants (GLM, $df = 7$, $\chi^2 = 24.33$, $p < .001$). The duration of phloem ingestion was significantly longer on P6-CM-HA plants compared to P6-JI and untransformed plants (GLM, $df = 7$, $\chi^2 = 25.12$, $p < .001$). Aphids reached the first phloem phase significantly faster on plants expressing P6-CM compared to untransformed Col-0 or plants expressing P6-JI and P6-CM-Δd23-HA (GLM, $df = 7$, $\chi^2 = 20.76$, $p = .04$).

3 | DISCUSSION

Many studies report changes in vector behaviour and performance after infection of plants with viruses, but only a few identify viral determinants involved in vector manipulation. Also, most work centres

on persistent and nonpersistent viruses; studies on semipersistent viruses are scarce. To fill this gap, we studied the feeding behaviour and fecundity of aphids on *Arabidopsis* infected with a severe and a mild isolate of CaMV, a virus with transmission properties of both nonpersistent and persistent viruses. Then, we studied the potential role of the multifunctional viral protein P6 in virus-induced alterations of host-plant traits and vector responses.

3.1 | Effect of CaMV infection on aphid fecundity

The severe and high-accumulating CaMV isolate JI reduced aphid fecundity on infected *Arabidopsis* significantly (c.2.5 fewer nymphs produced per adult after 5 days compared to mock-inoculated plants),

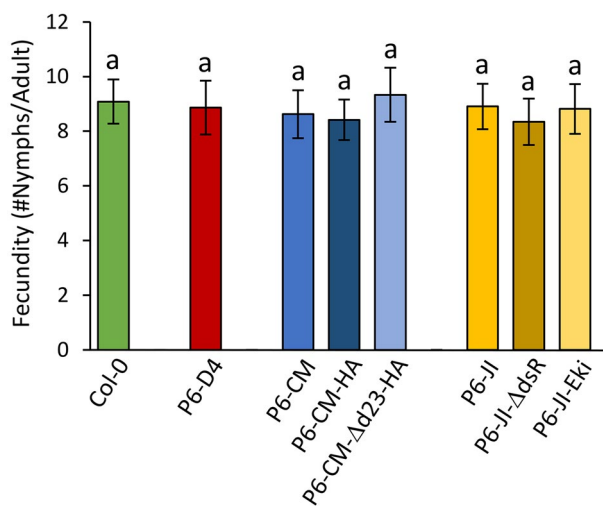


FIGURE 4 *Myzus persicae* fecundity 5 days after deposit on untransformed or transgenic 5-week-old *Arabidopsis* plants expressing P6 proteins. Different letters show significant differences between plants as tested by GLM followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < .05$; method: Tukey, $n = 21-24$). No statistically significant differences were recorded

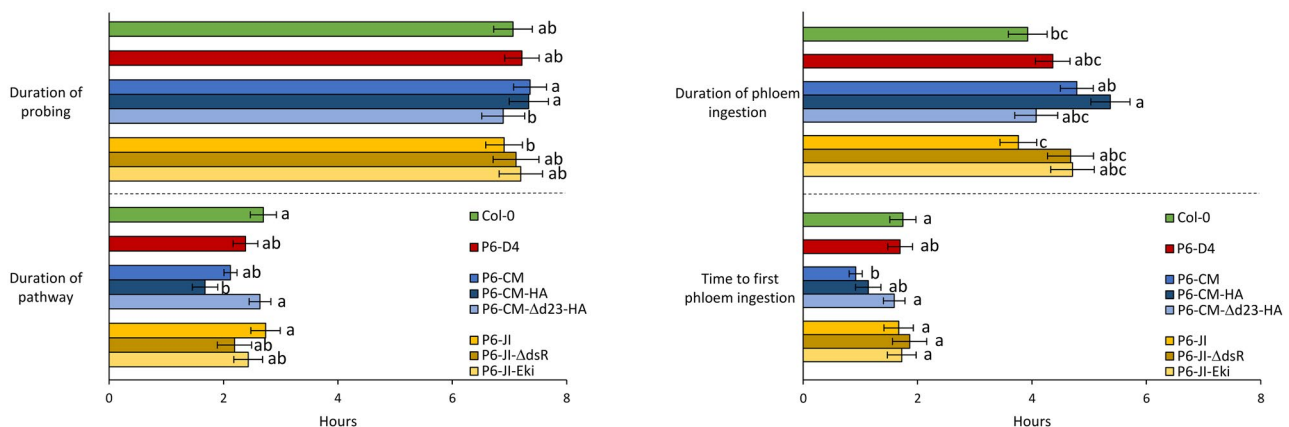


FIGURE 5 Aphid feeding behaviour parameters recorded by EPG on untransformed Col-0 and transgenic P6-expressing 5-week-old *Arabidopsis*. Different letters indicate significant differences between plants as tested by GLM followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < .05$; method: Tukey, $n = 25-31$)

while infection with the mild and low-accumulating isolate CM had only a moderate impact on aphid fecundity, below the significance threshold (c.1 nymph less produced per adult after 5 days compared to mock-inoculated plants; Figure 2a). Thus, both increased symptom severity and higher viral accumulation correlated with reduced aphid fecundity. Whether symptom severity is related to CaMV accumulation is still unclear and seems to depend on the host-virus association (Doumayrou et al., 2013). Lower fecundity and other negative effects of plant infection on vector performance such as reduced vector survival or delayed development are predicted for nonpersistent viruses. These modifications may promote rapid dispersion of vectors and subsequently virus transmission (Mauck et al., 2018). Indeed, mathematical models show that increasing departure rates from hosts lead to increased vector movements between host plants, which is beneficial for virus dissemination (Carr et al., 2020; Shaw et al., 2017). Whether this applies for CaMV on *Arabidopsis* remains to be determined because although reduced fecundity is a proxy for aphid fitness, it does not indicate that aphids will really leave CaMV-infected plants faster than healthy plants, as for example documented for *M. persicae* on cucumber mosaic virus-infected squash (Mauck et al., 2010). A negative effect of CaMV JI on *M. persicae* fecundity was already observed by Chesnais et al. (2019), albeit on another host plant, the Brassicaceae member *Camelina sativa*. This suggests that the effect on fecundity is not host plant-specific, but rather virus isolate-specific.

3.2 | Effect of CaMV infection on aphid feeding behaviour

M. persicae on CaMV-JI-infected plants spent significantly less time in the pathway phase in the leaf tissue and more time ingesting phloem sap than aphids on healthy plants (Figure 2b). This is expected to be counterproductive for transmission of nonpersistent viruses (Carr et al., 2020; Eigenbrode et al., 2018; Mauck et al., 2012). In fact, typical nonpersistent viruses like potyviruses or cucumber

mosaic virus (single-stranded RNA viruses of families Potyviridae and Bromoviridae, respectively) are acquired during short intracellular stylet punctures in plant epidermis and mesophyll (Martin et al., 1997). They are lost from the stylets when aphids stay on plants for longer times and when the stylets reach the sieve tubes that do not contain transmission-competent virus forms (Kloth & Kormelink, 2020; Wang & Ghabrial, 2002). The case is different for CaMV that is acquired efficiently from both cells and phloem sap and after both short and long acquisition periods (Bouchery et al., 1990; Markham et al., 1987; Palacios et al., 2002). Therefore, both improved palatability (characterized by few probes, rapid access to the phloem, and long phloem ingestion) and reduced palatability (characterized by many probes, impairment in phloem access, and reduced phloem ingestion) of infected plants can be conducive for CaMV transmission. In fact, Chesnais et al. (2019) observed, in contrast to our results here, a significantly lower number of probes and an increased sap ingestion of *M. persicae* feeding on CaMV-JI-infected *Camelina* plants. Yet transmission efficiency is high using either plant species as a virus source (Dáder et al., 2019; Verdier, 2020).

In summary, CaMV is, with regard to transmission, a special case combining characteristics of nonpersistent and persistent transmission modes. We propose that the particular acquisition mode of CaMV optimizes transmission by lowering its dependency on specific aphid feeding behaviours. Most noncirculative viruses (i.e., nonpersistent and semipersistent viruses) are transmitted by a large number of vectors (e.g., 27 for CaMV, 89 for TuMV; Edwardson & Christie, 2018; Kennedy et al., 1962) while circulative viruses are generally transmitted by less than a dozen. This means that these noncirculative viruses need to interact with multiple vectors, and it is unlikely that they can engage in manipulations that are specific for each vector species. Rather, they must target a common and accessible vector feature, for example a conserved receptor in the aphid stylets (Webster et al., 2018), to which they can bind easily and already after short vector-plant contact. This enables most aphids, even noncolonizers, to engage in behaviours conducive with nonpersistent virus acquisition and inoculation (e.g., epidermis and mesophyll probing). As a consequence, there may be little (or no) advantage and no strong selection pressure for CaMV and other noncirculative viruses to manipulate vector feeding behaviours (Mauck & Chesnais, 2020).

3.3 | A role for P6 in aphid manipulation

Aphid fecundity was unchanged on *Arabidopsis* plants expressing wt P6 from JI or CM (Figure 4), although these plants displayed dwarfing and bleaching, indicative of physiological modifications (Figure 3b,d). Three nonexclusive explanations are possible. The first one is that P6 alone is not involved in modifying aphid fecundity. This would mean that other viral determinants (proteins or RNAs), either independently or in concert with P6, induce changes in plants that reduce aphid fecundity. Indeed, it has been suggested that the CaMV proteins P1–5 are mainly responsible for leaf malformation,

while P6 causes chlorosis and dwarfism (Yu et al., 2003). The second explanation is that P6 levels in the transgenic plants were too low to reduce aphid fecundity. Indeed, we observed that P6 levels were considerably lower and variable in transgenic plants compared to infected plants (Figure 3i,j). However, in CaMV-infected plants a major fraction of P6 protein is located in inclusion bodies/replication factories (Schoelz & Leisner, 2017) and only a small fraction of P6 may be available in a soluble form to fulfil its other functions (reviewed by Pooggin & Ryabova, 2018). Finally, it is also possible that phloem sap composition (e.g., amino acid and/or sugar concentration and composition) was changed in infected but not in transgenic plants. Further experiments are required to solve this issue.

Some aphid feeding behaviour parameters were significantly altered on transgenic plants expressing P6 (Figure 5). Compared to control plants, the time to first phloem ingestion was reduced on transgenic P6-CM plants. Interestingly, no such effect was observed on plants infected with CaMV-CM (Figure 2b). This might indicate that other viral determinants counteracted the effect of P6. A second significantly changed parameter was the duration of phloem ingestion, which was longer on P6-CM plants than on P6-JI plants. Opposite results were obtained with infected plants, where the duration of phloem ingestion was longer on JI-infected than on mock-inoculated plants, with the duration of CM-infected *Arabidopsis* being intermediate. Again, this observation indicates that P6 contributes to the modifications in phloem sap ingestion, but that other viral determinants are involved as well.

3.4 | P6 domains involved in aphid manipulation

The comparison of the aphid feeding behaviour on transgenic *Arabidopsis* expressing various P6 versions yielded evidence for the involvement of its N-terminus in modification of plant-aphid interactions (Figure 5). P6 from the D4 isolate, although accumulating to much higher levels in transgenic plants than P6-JI or P6-CM (Figure 3i), had no effect on aphid behaviour, and plants displayed a wt phenotype (Figure 3c), as previously reported by Yu et al. (2003). Because P6-D4's RNA silencing suppression domains are functional in *Arabidopsis* (Shivaprasad et al., 2008; Zvereva et al., 2016), we conclude that the silencing suppression domain (probably located in the C-terminal portion of P6; see Figure 6 for an overview of P6's functional domains) has no impact on aphid behaviour or on symptom expression. P6-D4's Vir/Avr domain, responsible for symptom expression, and the mini-TAV domain, required for translation transactivation and TOR-mediated immunity, are nonfunctional in *Arabidopsis* (Yu et al., 2003; Zvereva et al., 2016), precluding any definitive conclusions but leaving a possibility that corresponding domains of P6-CM and P6-JI can contribute to modification of aphid feeding behaviour. Indeed, aphids spent more time in the pathway phase on P6-CM- Δ d23-HA plants (containing an N-terminal HA-tag and a deletion of the Vir/Avr domain), compared to P6-CM-HA plants, despite similar low accumulation in transgenic plants. Compared to untransformed plants, aphids had a shorter pathway

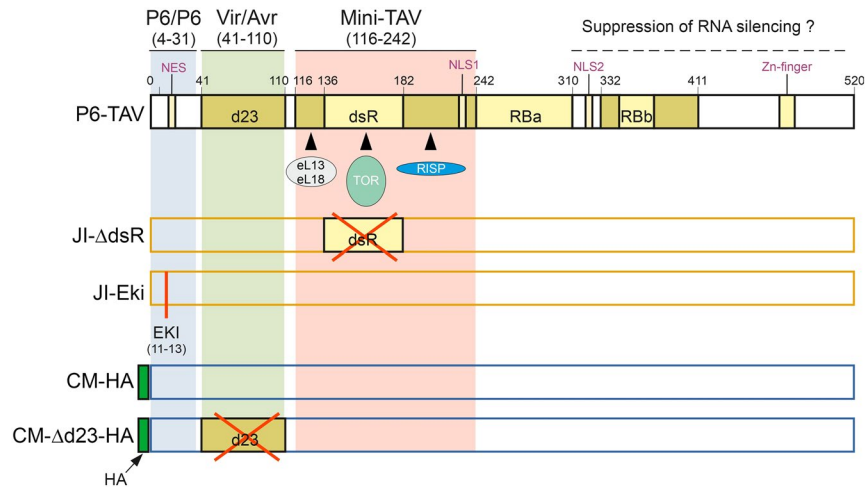


FIGURE 6 Functional domains of P6 and P6 mutants used in this study. Only relevant domains and interacting proteins are shown. The N-terminal half of P6 contains three major regions: The N-terminus (amino acids 4–31) contains one of several P6/P6 self-interaction domains required for P6's function as the matrix protein of virus inclusions. This region is followed by the Vir/Avr domain delimited by the d23 region, which is involved in chlorosis induction and dwarfism. The mini-TAV domain comprises amongst others an N-terminal region binding to ribosomal proteins eL13 and eL18, the central double-stranded RNA-binding (dsR) region that interacts with TOR kinase, and a C-terminal region that interacts with reinitiation supporting protein (RISP) and contains also a nuclear localization signal (NLS1). The mini-TAV region is important for antiviral autophagy, innate immunity, and polycistronic translation. One of the functions of the C-terminal half of P6 is probably suppression of RNA silencing, in which also the N-terminal nuclear export signal (NES) and the two nuclear localization signals (NLS1 in the mini-TAV domain and NLS2 in the C-terminal region) play a role. The dsR region is deleted in P6-JI-ΔdsR. In P6-JI-Eki, the conserved Eki motif just preceding the NES is substituted by three alanines. CM-HA contains an N-terminal HA-tag as modification and CM-Δd23-HA in addition a deletion of the d23 region. RBa, RBb, RNA-binding regions. Figure adapted from Pooggin and Ryabova (2018)

phase and longer phloem sap ingestion on P6-CM-HA but not on P6-CM-Δd23-HA plants. This is in favour of a role of the Vir/Avr region in altering aphid feeding behaviour. Neither P6-JI nor P6-JI-ΔdsR plants (functional Vir/Avr domain, no TOR interaction) had a significant effect on aphid behaviour, despite higher protein accumulation in transgenic plants compared to P6-CM-Δd23-HA. This might indicate that the effect of the Vir/Avr domain on aphid behaviour is CaMV isolate-specific. In fact, the Vir/Avr domain is one of the most variable domains of P6 among CaMV isolates. Notably, despite previous controversial evidence (Laird et al., 2013), the P6-CM Vir/Avr domain was found to be crucial for virus infectivity and virulence but not suppression of RNA silencing in *Arabidopsis* (Zvereva et al., 2016). Moreover, this domain contributes to suppression of salicylic acid-dependent autophagy and effector-triggered innate immunity in *Arabidopsis*, although it was not absolutely essential for this TOR-dependent function of P6-CM (Zvereva et al., 2016). We speculate P6-mediated dampening of pattern- and/or effector-triggered innate immunity may explain the observed changes in aphid feeding behaviour. Indeed, aphids are known to induce innate immunity responses in *Arabidopsis* and deliver effector proteins to suppress these responses (Mugford et al., 2016; Prince et al., 2014). A role for the P6 mini-TAV region with TOR-binding domain in modification of aphid behaviour remains disputed. Despite its high accumulation levels in transgenic plants, comparable to those in virus-infected plants, P6-JI-ΔdsR (no TOR interaction) only slightly affected aphid behaviour. This indicates that the TOR-binding domain is not required but other elements of the mini-TAV region preserved in the mutant might still be important for modification of aphid behaviour.

Finally, P6-JI-Eki did not change aphid behaviour significantly, suggesting that the extreme N-terminus of P6 may not be involved in aphid interactions. However, in this case the mutant protein accumulated in transgenic plants at extremely low levels, precluding any definitive conclusion.

Taken together, this report shows that aphid responses to CaMV infection depend on the virus isolate, and that part of the effects, but not the entire response, relies on P6.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Cloning

Cm1841-Rev, where the mutation of amino acid 94 in P2 in the Cm1841 genome is reverted to wt, was obtained by site-directed mutagenesis using the QuikChange Lightning Kit (Agilent) following the manufacturer's instructions and using the oligonucleotides QuikReve-F (5'-GTCAGTTTTTAATACTGCAAAAAACATTTTTAAAAGTGGGGGGTTGATTACTCG-') and QuikReve-R (5'-CGAGTAATCAACCCCCCACTTTTAAAAATGTTTTTGCAGTATTA AAACTGAC-3'). The two oligonucleotides contain a silent G → A mutation at nucleotide 277 of the P2 sequence to create a *DraI* restriction site for easy identification of recombinants and an A → G mutation at nucleotide 280 of P2 to revert amino acid R₉₄ to wt G₉₄. The pCa122 plasmid containing 1.2 copies of the Cm1841 genome (Tsuge et al., 1994) was used as a matrix. The cycling programme was 2 min at 95 °C; followed by 18 cycles of 20 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, and 7 min

at 69 °C; and a final extension step of 5 min at 68 °C. The plasmid pCa122rev was verified by sequencing the mutated region.

4.2 | Virus inoculation

Initial inoculation was performed with the pCa122rev plasmid or the pGreen-BJI plasmid (Khelifa et al., 2010) coding for the Cabb B-JI genome. The plasmids were rub-inoculated with carborundum into the first true leaf of turnip (*Brassica napus* 'Just Right') seedlings (20 µg plasmid per seedling at the 2-leaf stage). When disease symptoms were well developed, leaves were harvested and stored at -20 °C. The virus was passaged once by mechanical inoculation of *Arabidopsis* ecotype Col-0 plants at the 4- to 8-leaf stage. For this, frozen turnip leaves were thawed and ground in a mortar with carborundum in 10 mM HEPES buffer pH 8.0 at a ratio of 1 g leaf per 0.5 ml buffer, and used for rub inoculation. All further inoculations were by aphid transmission using infected *Arabidopsis* plants as virus source. Aphids were deposited on CaMV-infected plants overnight, and then five or six viruliferous aphids were placed on 2-week-old *Arabidopsis* for a few hours before being removed manually.

Plants infected with Cm1841-Rev (CM) or with Cabb B-JI (JI) were used 3 weeks after inoculation for experiments. Growth conditions were 8 hr light/16 hr dark at 22/20 °C.

4.3 | *Arabidopsis* mutant lines

The transgenic lines P6-CM-HA and P6-CM-Δd23-HA are described by Zvereva et al. (2016), P6-CM1841 (as lines CM-6 and CM-8) and P6-D4 (as D4-2) by Yu et al. (2003), and P6-JI (as AT7) and P6-JI-ΔdsR (as AT7ΔdsR) by Schepetilnikov et al. (2011). The P6-JI-Eki line is described as TAVm3 by Haas et al. (2008). Wt and mutant lines were all in the Col-0 background.

4.4 | Aphid rearing

The *M. persicae* green peach aphid clone was originally isolated in the Netherlands. Aphids were reared on Chinese cabbage (*Brassica rapa pekinensis*) in a growth chamber at 20 ± 1 °C, under a 16 hr photoperiod. Only wingless forms were used in assays. For synchronization, we placed adults on detached Chinese cabbage leaves that were spread on 1% agarose in a Petri dish. The adults were removed 24 hr later and the newborn larvae used in experiments after another 7 days when they had reached the adult stage.

4.5 | Aphid feeding behaviour

We used the electrical penetration graph DC-system as described by Tjallingii (1988) to investigate the effects of plant CaMV infection on the feeding behaviour of *M. persicae*. Eight aphids were

connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier and each one was placed on the leaf of an individual *A. thaliana* plant. The recordings were performed continuously for 8 hr during the photophase. Each aphid-plant system was placed inside a Faraday cage at 21 ± 1 °C. Acquisition and analysis of the EPG waveforms were carried out with PROBE 3.5 software (EPG Systems). Relevant aphid behaviour EPG parameters were calculated with EPG-Calc 6.1 software (Giordanengo, 2014) and were based on different EPG waveforms described by Tjallingii and Hogen Esch (1993). The following parameters were selected because they are relevant and important for the acquisition of CaMV by aphids: the total duration of "probing time", "pathway phase", and "phloem sap ingestion phase" and the time needed by the aphid to reach the phloem. For each condition (healthy or infected and wt or mutant, respectively), EPGs of 25–30 individual aphids were analysed. Aphids that produced signals (i.e., total duration of probing time) for fewer than 5 hr were excluded from the analysis.

4.6 | Aphid fecundity

Synchronized wingless adults (8 ± 1 days old) were randomly selected from the aphid pools and transferred onto *Arabidopsis* plants (one aphid per plant) to study adult fecundity. The number of nymphs produced were recorded after 5 days. Adult aphids that died before day 5 were excluded from the analysis. Data on CaMV-infected or mock-inoculated *Arabidopsis* were collected in three repetitions, and data on *Arabidopsis* mutants were collected in four repetitions, comprising altogether 21–33 aphids per condition (infected or mock-inoculated and wt or mutant, respectively).

4.7 | Statistical analysis

We used GLMs with a likelihood ratio and the chi-square (χ^2) test to assess whether there was an effect of plant infection or *Arabidopsis* mutants on *M. persicae* feeding behaviour. When a significant effect was detected, a pairwise comparison using estimated marginal means (R package "emmeans"; *p* value adjustment with Tukey method) at the .05 significance level was used to test for differences between treatments. Data on aphid feeding behaviour (probing, pathway, and phloem sap ingestion phases) were not normally distributed; accordingly we carried out a GLM using a gamma (link = "inverse") distribution. Data on aphid feeding behaviour ($t_1 < E_2$) were modelled using the Cox proportional hazards model and we treated cases where the given event did not occur as censored. The assumption of validity of proportional hazards was checked using the functions "coxph" and "cox.zph", respectively (R package "survival"). When a significant effect of one of the main factors was detected or when an interaction between factors was significant, a pairwise comparison using estimated marginal means (R package "emmeans") (*p* value adjustment with Tukey method) at the .05 significance level was used to test for differences between treatments. The fit of all GLMs was controlled

by inspecting residuals and QQ plots. All statistical analyses were performed using R software v. 3.3.2 (www.r-project.org/).

4.8 | Western blot

Total leaf extracts were prepared as follows: Leaves were frozen in a mortar with liquid N₂ and ground with a pestle to a fine powder. The powder was transferred to a 1.5 ml reaction tube and 2× Laemmli buffer (Laemmli, 1970) was added at a ratio of 1:1 (wt/vol). The samples were heated for 5 min at 80 °C and centrifuged for 10 min at 16,000 × g, and aliquots of the supernatants were charged on 6/12.5% discontinuous sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gels. Proteins were transferred after SDS polyacrylamide gel electrophoresis onto nitrocellulose membranes using the wet blotting technique (Towbin et al., 1979). Efficiency of transfer was controlled by Ponceau red staining. Membranes were blocked for 30 min with 5% low-fat milk powder in Tris-buffered saline (TBS) and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. After three washes with TBS, membranes were incubated for 3–4 hr at room temperature with secondary antibodies. After another three washes with TBS, protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence using a G-Box. The following 1:2,000 dilutions of primary antibodies were used: anti-P2 (Blanc et al., 1993), anti-P4 (Champagne et al., 2004), and anti-P6 (Khelifa et al., 2010). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugates, which were used at a 1:25,000 dilution.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Claire Villeroy for aphid care. This work was funded by Human Frontier Science Program grant RGP0013/2015 (to M.D.) and Agence Nationale de la Recherche grant ANR-18-CE20-0017-01 (to M.D. and M.P.). The funding sources had no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Martin Drucker  <https://orcid.org/0000-0002-9765-1189>

REFERENCES

- Blanc, S., Cerutti, M., Usmany, M., Vlak, J.M. & Hull, R. (1993) Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor expressed in a heterologous system. *Virology*, 192, 643–650.
- Bouchery, Y., Givord, L. & Monestiez, P. (1990) Comparison of short- and long-feed transmission of the cauliflower mosaic virus Cabb-S strain and S delta II hybrid by two species of aphid: *Myzus persicae* (Sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.). *Research in Virology*, 141, 677–683.
- Carr, J.P., Tungadi, T., Donnelly, R., Bravo-Cazar, A., Rhee, S.-J., Watt, L.G. et al. (2020) Modelling and manipulation of aphid-mediated spread of non-persistently transmitted viruses. *Virus Research*, 277, 197845.
- Cecchini, E., Al-Kaff, N.S., Bannister, A., Giannakou, M.E., McCallum, D.G., Maule, A.J. et al. (1998) Pathogenic interactions between variants of cauliflower mosaic virus and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 49, 731–737.
- Champagne, J., Benhamou, N. & Leclerc, D. (2004) Localization of the N-terminal domain of cauliflower mosaic virus coat protein precursor. *Virology*, 324, 257–262.
- Chesnaïs, Q., Couty, A., Uzest, M., Brault, V. & Ameline, A. (2019) Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Science*, 26, 86–96.
- Dáder, B., Burckbuchler, M., Macia, J.-L., Alcon, C., Curie, C., Gargani, D. & et al. (2019) Split green fluorescent protein as a tool to study infection with a plant pathogen, cauliflower mosaic virus. *PLoS One*, 14, e0213087.
- Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M., Ng, J.C.K. & Drucker, M. (2017) Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Science*, 24, 929–946.
- Doumayrou, J., Avellan, A., Froissart, R. & Michalakakis, Y. (2013) An experimental test of the transmission-virulence trade-off hypothesis in a plant virus. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 67, 477–486.
- Drucker, M., Froissart, R., Hébrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Espérandieu, P. et al. (2002) Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 2422–2427.
- Edwardson, J.R. & Christie, R.G. (2018) *CRC handbook of viruses infecting legumes*. Boca Raton: CRC Press.
- Eigenbrode, S.D., Bosque-Pérez, N.A. & Davis, T.S. (2018) Insect-borne plant pathogens and their vectors: ecology, evolution, and complex interactions. *Annual Review of Entomology*, 63, 169–191.
- Fereres, A. & Moreno, A. (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, 141, 158–168.
- Giordanengo, P. (2014) EPG-Cal: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, 8, 163–169.
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M. et al. (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO Journal*, 27, 2102–2112.
- Hafrén, A., Macia, J.-L., Love, A.J., Milner, J.J., Drucker, M. & Hofius, D. (2017) Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E2026–E2035.
- Kennedy, J.S., Day, M.F. & Eastop, V.F. (1962) *A conspectus of aphids as vectors of plant viruses*. London: Eastern Press Ltd.
- Khelifa, M., Massé, D., Blanc, S. & Drucker, M. (2010) Evaluation of the minimal replication time of cauliflower mosaic virus in different hosts. *Virology*, 396, 238–245.
- Kloth, K.J. & Kormelink, R. (2020) Defenses against virus and vector: a phloem-biological perspective on RTM- and SL11-mediated resistance to potyviruses and aphids. *Viruses*, 12, 129.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Laird, J., McNally, C., Carr, C., Doddiah, S., Yates, G., Chrysanthou, E. et al. (2013) Identification of the domains of cauliflower mosaic virus protein P6 responsible for suppression of RNA silencing and salicylic acid signalling. *Journal of General Virology*, 94, 2777–2789.

- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M. et al. (1999) Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO Journal*, 18, 7077–7085.
- Lung, M.C.Y. & Pirone, T.P. (1973) Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus isolates by aphids. *Phytopathology*, 63, 910–914.
- Markham, P.G., Pinner, M.S., Raccach, B. & Hull, R. (1987) The acquisition of a caulimovirus by different aphid species: comparison with a potyvirus. *Annals of Applied Biology*, 111, 571–587.
- 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. *Journal of General Virology*, 78, 2701–2705.
- Mauck, K., Bosque-Pérez, N.A., Eigenbrode, S.D., De Moraes, C.M. & Mescher, M.C. (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host–vector interactions: evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, 26, 1162–1175.
- Mauck, K.E. & Chesnais, Q. (2020) A synthesis of virus–vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Research*, 285, 197957.
- Mauck, K.E., Chesnais, Q. & Shapiro, L.R. (2018) Evolutionary determinants of host and vector manipulation by plant viruses. *Advances in Virus Research*, 101, 189–250.
- Mauck, K.E., De Moraes, C.M. & Mescher, M.C. (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3600–3605.
- Mauck, K.E., De Moraes, C.M. & Mescher, M.C. (2014) Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell and Environment*, 37, 1427–1439.
- 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. *Journal of Virology*, 79, 13587–13593.
- 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*, 29, 854–861.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A. & Fereres, A. (2002) Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83, 3163–3171.
- Pooggin, M.M. & Ryabova, L.A. (2018) Ribosome shunting, polycistronic translation, and evasion of antiviral defenses in plant pararetroviruses and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 9, 644.
- Prince, D.C., Drurey, C., Zipfel, C. & Hogenhout, S.A. (2014) The leucine-rich repeat receptor-like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE1 and the cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 contribute to innate immunity to aphids in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 164, 2207–2219.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M. et al. (2011) Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO Journal*, 30, 1343–1356.
- Schoelz, J.E., Angel, C.A., Nelson, R.S. & Leisner, S.M. (2016) A model for intracellular movement of cauliflower mosaic virus: the concept of the mobile virion factory. *Journal of Experimental Botany*, 67, 2039–2048.
- Schoelz, J.E. & Leisner, S. (2017) Setting up shop: the formation and function of the viral factories of cauliflower mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1832.
- Shaw, A.K., Peace, A., Power, A.G. & Bosque-Pérez, N.A. (2017) Vector population growth and condition-dependent movement drive the spread of plant pathogens. *Ecology*, 98, 2145–2157.
- Shivaprasad, P.V., Rajeswaran, R., Blevins, T., Schoelz, J., Meins, F., Hohn, T. et al. (2008) The CaMV transactivator/viroplasm interferes with RDR6-dependent trans-acting and secondary siRNA pathways in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 36, 5896–5909.
- Tjallingii, W.F. (1988) Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks, A.K. & Harrewijn, P. (eds). *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 95–108.
- Tjallingii, W.F. & Hogen Esch, T. (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, 18, 317–328.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*, 1992, 145–149.
- Tsuge, S., Kobayashi, K., Nakayashiki, H., Okuno, T. & Furusawa, I. (1994) Replication of cauliflower mosaic virus ORF I mutants in turnip protoplasts. *Japanese Journal of Phytopathology*, 60, 27–35.
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazeville, C., Cot, D. & Blanc, S. (2010) The “acrostyle”: a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure & Development*, 39, 221–229.
- Verdier, M. (2020) *Etude de la transmission des virus de plantes par puceron. Comment le virus manipule sa plante hôte (et son puceron vecteur pour optimiser sa transmission)?* Master's thesis. Paris, France: Muséum National D'Histoire Naturelle.
- Wang, R.Y., & Ghabrial, S.A. (2002) Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, *Aphis glycines*. *Plant Disease*, 86, 1260–1264.
- Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., Deshoux, M., Gargani, D. et al. (2018) Identification of plant virus receptor candidates in the stylets of their aphid vectors. *Journal of Virology*, 92, e00432–18.
- Woolston, C., Czaplowski, L., Markham, P., Goad, A., Hull, R. & Davies, J. (1987) Location and sequence of a region of cauliflower mosaic-virus gene-2 responsible for aphid transmissibility. *Virology*, 160, 246–251.
- Yu, W., Murfett, J. & Schoelz, J.E. (2003) Differential induction of symptoms in Arabidopsis by P6 of cauliflower mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 35–42.
- Zvereva, A.S., Golyaev, V., Turco, S., Gubaeva, E.G., Rajeswaran, R., Schepetilnikov, M.V. et al. (2016) Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytologist*, 211, 1020–1034.


How to cite this article: Chesnais Q, Verdier M, Burckbuchler M, Brault V, Pooggin M, Drucker M. Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected Arabidopsis. *Mol Plant Pathol*. 2021;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>

RESEARCH ARTICLE

The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission

Maxime Verdier¹, Quentin Chesnais¹^{*}, Elodie Pirolles², Stéphane Blanc², Martin Drucker¹^{*}

1 SVQV UMR 1131 INRAE Centre Grand Est–Colmar, Université Strasbourg, Colmar, France, **2** PHIM, INRAE Centre Occitanie–Montpellier, CIRAD, IRD, Université Montpellier, Institut Agro, Montferrier-sur-Lez, France

 These authors contributed equally to this work.

^{*} quentin.chesnais@inrae.fr (QC); martin.drucker@inrae.fr (MD)



OPEN ACCESS

Citation: Verdier M, Chesnais Q, Pirolles E, Blanc S, Drucker M (2023) The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission. PLoS Pathog 19(2): e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>

Editor: John P. Carr, University of Cambridge, UNITED KINGDOM

Received: November 22, 2022

Accepted: January 27, 2023

Published: February 6, 2023

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>

Copyright: © 2023 Verdier et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

There is growing evidence that plant viruses manipulate their hosts and vectors in ways that increase transmission. However, to date only few viral components underlying these phenomena have been identified. Here we show that cauliflower mosaic virus (CaMV) protein P2 modifies the feeding behavior of its aphid vector. P2 is necessary for CaMV transmission because it mediates binding of virus particles to the aphid mouthparts. We compared aphid feeding behavior on plants infected with the wild-type CaMV strain Cabb B-JI or with a deletion mutant strain, Cabb B-JIΔP2, which does not produce P2. Only aphids probing Cabb B-JI infected plants doubled the number of test punctures during the first contact with the plant, indicating a role of P2. Membrane feeding assays with purified P2 and virus particles confirmed that these viral products alone are sufficient to cause the changes in aphid probing. The behavior modifications were not observed on plants infected with a CaMV mutant expressing P2Rev5, unable to bind to the mouthparts. These results are in favor of a virus manipulation, where attachment of P2 to a specific region in the aphid stylets—the acrostyle—exercises a direct effect on vector behavior at a crucial moment, the first vector contact with the infected plant, which is essential for virus acquisition.

Author summary

Some pathogens including plant viruses manipulate vectors to optimize transmission. The manipulations can be indirect meaning that pathogens alter host traits such as color or odor that attract or deter vectors. Other modifications are direct, i.e. uptake of virus compounds changes vector behaviors. Direct effects have been reported for viruses that are internalized by their vectors and interact strongly with the vector from within, for example with the nervous system. Here we show that contact of a virus protein with the vector's exterior mouthparts suffices to induce a direct effect: binding of the non-structural

Funding: This work was funded by Agence Nationale de la Recherche grant Rome, grant number ANR-18-CE20-0017-01 (to MD). MV was financed by a Ph.D. fellowship from Université de Strasbourg. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

cauliflower mosaic virus protein P2 to aphid stylets during test punctures modifies probing activity instantly, thereby facilitating virus transmission. The fact that here no intimate virus-vector interactions are required for vector manipulation and transmission, could explain the broad vector range of CaMV and other non-circulative viruses.

Introduction

Plant viruses are economically important pathogens and most of them require a vector for transmission [1]. Insects are the most common vectors and, among these, Hemiptera such as aphids, whiteflies, plant- and leafhoppers account for the transmission of the majority of the vector-borne viruses [2,3]. This is likely due to their particular mouthparts, the stylets. The stylets' morphology is adapted to piercing-sucking feeding behavior and allows aphids and other hemipterans to acquire and inoculate viruses into plant tissues with great precision and without inflicting major damage.

A growing corpus of theoretical modelling and empirical research shows that viruses and other parasites modify hosts and vectors to optimize their transmission [4–7]. These modifications may be referred to as parasitic manipulation when two conditions are met. First, the phenotypic changes in the host or vector enhance the fitness of the pathogen and second, they are under the genetic control of the pathogen [8]. Evidence for the first criterion has been cumulated by numerous studies for plant viruses [9,10]. In contrast, the viral factors responsible for changes in vector fitness are often unknown [11]. Plant viruses alter host plant phenotype that in turn influences vector attraction and feeding behavior, and consequently virus acquisition [12–14]. Some viral genes have been implicated in these indirect plant-mediated alterations of vector traits [15–17].

Viruses can—after acquisition by vectors—also alter vector behavior directly. This has been studied in particular for plant viruses relying on the circulative transmission mode. Such viruses traverse the intestine, cycle through the hemocoel and accumulate in the salivary glands, before inoculation as a saliva component into new plant hosts. During their passage, they can interact with various host organs, for example the brain, the salivary glands or antenna and modify vector behavior in ways that are conducive to virus transmission [18–20]. Similar manipulations have also been described for other pathogens that replicate in their vectors [21]. To the best of our knowledge, there is no evidence that non-circulative viruses, i.e. viruses that bind to vector mouthparts for their passage to a new host, can change vector behavior directly, whereas plant-mediated effects are well-documented [22]. One report detected altered feeding behavior on healthy test plants of whiteflies viruliferous with a non-circulative crinivirus, but since the insects were raised for two generations on infected plants before the experiments, plant-mediated effects cannot be excluded [23].

Cauliflower mosaic virus (genus *Caulimovirus*) is transmitted by aphids using the non-circulative mode. CaMV virions are retained in the aphid mouthparts (stylets) by attaching to cuticular proteins (stylins) located at the stylet tip in a zone called the acrostyle [24–26]. Transient adherence of virions occurs via a helper component, the viral protein P2 [27,28]. P2 forms a protein bridge between the stylets and the virions, most likely by binding with its N-terminus to stylins and with its C-terminus to the virion, more precisely to the capsid-associated viral protein P3 (P3:virions) [29–31]. Aphids can acquire the helper component P2 and P3:virions simultaneously or sequentially, i.e. either preformed P2:P3:virions complexes or first P2 and in a second step P3:virions [32].

Aphids landing on a new plant will explore the plant's suitability with test punctures. For this, they insert the stylets in epidermis and mesophyll cells, salivate briefly into the cytoplasm and ingest actively some of the cellular contents. If the plant is susceptible, the stylets advance deeper into the tissue, doing more test punctures until they are inserted into the sieve tubes. Here the feeding behavior changes: after an active salivation phase, the aphids ingest phloem sap passively and continuously, their principal food source. Because P2 locates exclusively in infected cells, it can be acquired only during intracellular test punctures, whereas P3:virions can be acquired during test punctures and during phloem sap ingestion [33].

Our previous work showed that CaMV infection of the model plant *Arabidopsis thaliana* caused *Myzus persicae* aphids to feed longer from the phloem, which might enhance the acquisition of P3:virion complexes from the phloem sap. We demonstrated that the P6-TAV protein of CaMV contributes majorly to this altered feeding behavior [34]. P6-TAV is a multifunctional protein responsible for most CaMV symptoms and modifications of the physiology of the host [35,36]. Therefore, it is most likely that it exercises an indirect host-mediated effect on the behavior of the aphid vector. We were interested to investigate whether a non-circulative virus like CaMV could also encode factors having a direct effect on the vector. We chose P2 to test for this hypothesis, because it contains the interaction domain for binding to the aphid stylets, making it an excellent candidate.

Results

Aphid feeding behavior is different on plants infected with wild type CaMV expressing P2

To test for a possible effect of P2 on aphids, we chose to compare the behavior of aphids on turnip plants infected with wild type CaMV isolate Cabb B-JI (JI) or with the CaMV P2 deletion mutant Cabb B-JIΔP2 (JIΔP2). We first verified that the deletion did not affect the infectivity of the virus. No difference in symptoms was observed between plants infected with JI or JIΔP2. All plants displayed characteristic leaf bleaching that initially affected only the veins (mosaics) and that covered later in infection the entire leaf (Fig 1A). Fully infected plants showed, in addition, leaf curling and retarded plant growth. The first symptoms appeared 6 days after mechanical inoculation of plants with the viruses and a day later all plants were symptomatic (S1 Fig). Then, we studied the accumulation of the CaMV proteins P2, capsid protein P4 and P6-TAV by western blot in infected turnips (Fig 1B). As expected, P2 was detected in plants infected with JI, but not in plants infected with JIΔP2. Accumulation of P4 and P6-TAV was similar in JI and JIΔP2-infected turnips. Taken together, the deletion of the P2 coding sequence had no impact on the timing and severity of symptoms, and it did not affect CaMV replication as judged by the accumulation of P4 and P6-TAV. Thus, the experimental setup was suited to compare aphid behavior on infected plants expressing P2 vs. those that did not.

We placed aphids on mock-inoculated, JI and JIΔP2-infected plants and used EPG to evaluate the effect of the infection, and more specifically that of the presence of P2, on acquisition feeding behavior (Fig 1C and D). Aphids spent significantly more time ingesting phloem sap on plants infected with JI than on healthy plants (Fig 1C), consistent with our earlier report [34]. Deleting P2 from the viral genome had no effect on phloem sap ingestion. When analyzing the occurrence of events, the total numbers of stylet penetrations, pathway phases and intracellular test punctures were significantly lower on infected plants than on mock-inoculated ones, with no difference between JI and JIΔP2. However, we observed P2-specific alterations for the number of intracellular punctures during the first probe, which was twice as high on JI-infected plants than on JIΔP2-infected ones or mock-inoculated ones. Another feeding parameter, the number of phloem sap ingestion phases, was significantly lower on JI-

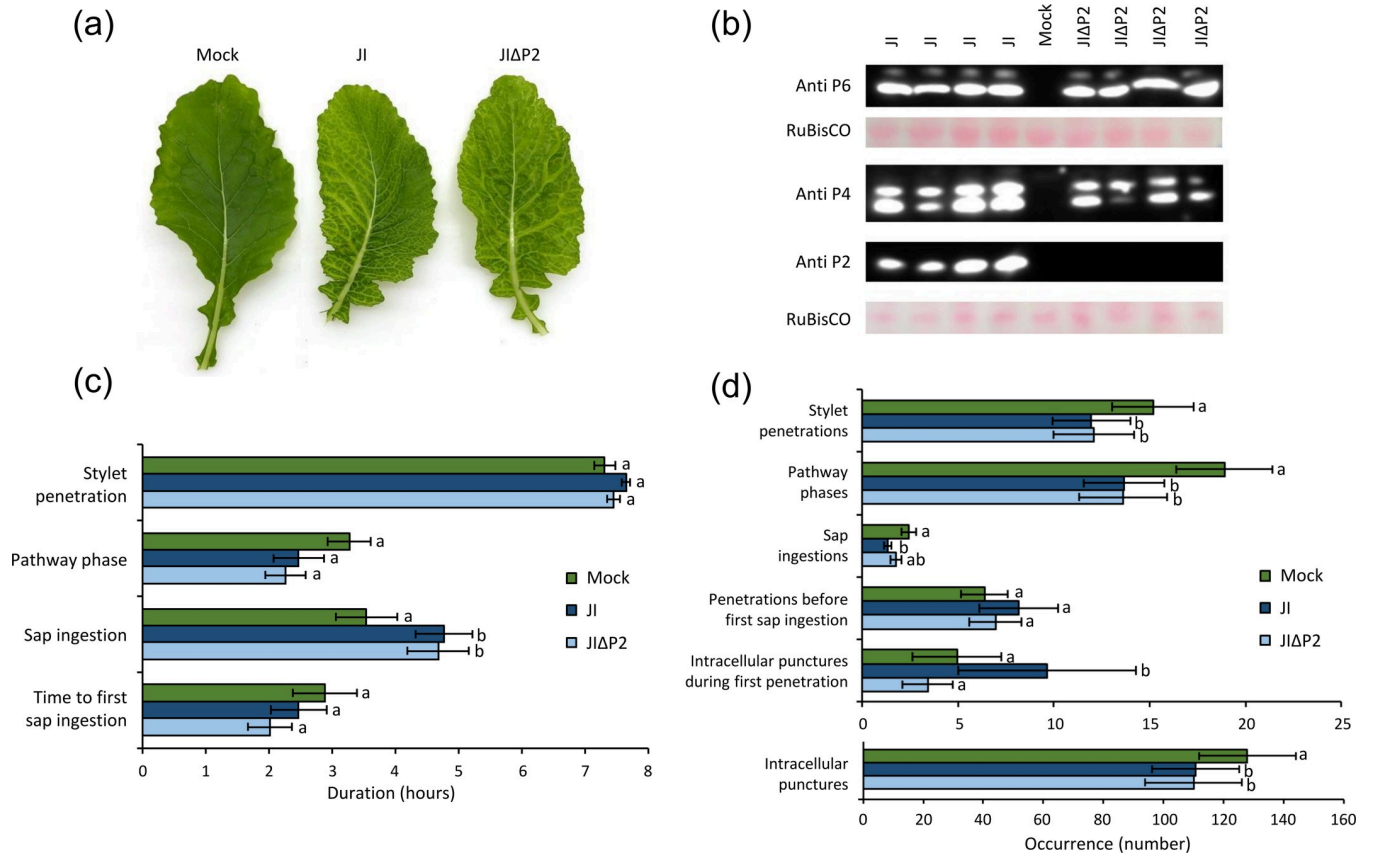


Fig 1. Feeding behavior of *Myzus persicae* on mock-inoculated, JI- or JIΔP2-infected turnip plants. (a) Symptoms on turnip leaves at 14 dpi. From left to right, mock-inoculated, JI-infected, JIΔP2-infected leaf. (b) Western blot analysis of the accumulation of P2 (18 kDa), P4 (37, 44 kDa) and P6-TAV (62 kDa) in JI- or JIΔP2-infected turnip plants at 14 dpi. Each lane corresponds to a total protein extract from a different plant. The large RuBisCO subunit is stained by Ponceau S and serves as a loading control. Mock is extract from a mock-inoculated healthy leaf. (c-d) The behavior of individual aphids was recorded by electrical penetration graph (EPG) for 8 h on turnip leaves infected or not with the indicated virus (N = 21–24). Selected EPG parameters are presented sorted according to (c) duration or (d) occurrence. The histogram bars display means and standard errors. Different letters indicate significant differences between plant infection status as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). Statistical analysis of the duration of events indicated significant differences for the duration of phloem sap ingestion on infected vs healthy plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 7.776$, $p = 0.020$) but no differences for the total duration of stylet penetration (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 3.868$, $p = 0.145$), the total duration of pathway phase (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 4.037$, $p = 0.133$) and the time to first sap ingestion from phloem (Cox, Df = 2, $\chi^2 = 0.373$, $p = 0.185$). Statistical analysis of events revealed significant differences for the numbers of stylet penetrations, pathway phases and intracellular test punctures on infected (JI and JIΔP2) vs mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 10.756$; $\chi^2 = 24.948$; $\chi^2 = 37.13$, $p < 0.001$, respectively), and a significant difference for the number of intracellular test punctures during the first stylet penetration on JI-infected plants vs JIΔP2-infected and mock-inoculated plants (0-inflated model, Df = 2, $\chi^2 = 35.958$, $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161.g001>

infected plants than on mock-inoculated turnips, their number on JIΔP2-infected leaves was intermediate (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 6.968$, $p = 0.031$). This indicated a possible, but only partial contribution of P2 to this behavior modification. Taken together, infection with JI and JIΔP2 significantly increased the duration of phloem sap ingestion. Only wild type infection (i.e. presence of P2) doubled the number of intracellular punctures in mesophyll and epidermis during the first stylet insertion, indicating that P2 was associated with this.

Post-acquisition effect of P2-expressing wild type CaMV on aphid inoculation behavior

The previous experiment indicated modified aphid feeding behavior on infected plants, i.e. during virus acquisition feeding. We wanted to know whether virus infection and P2 also

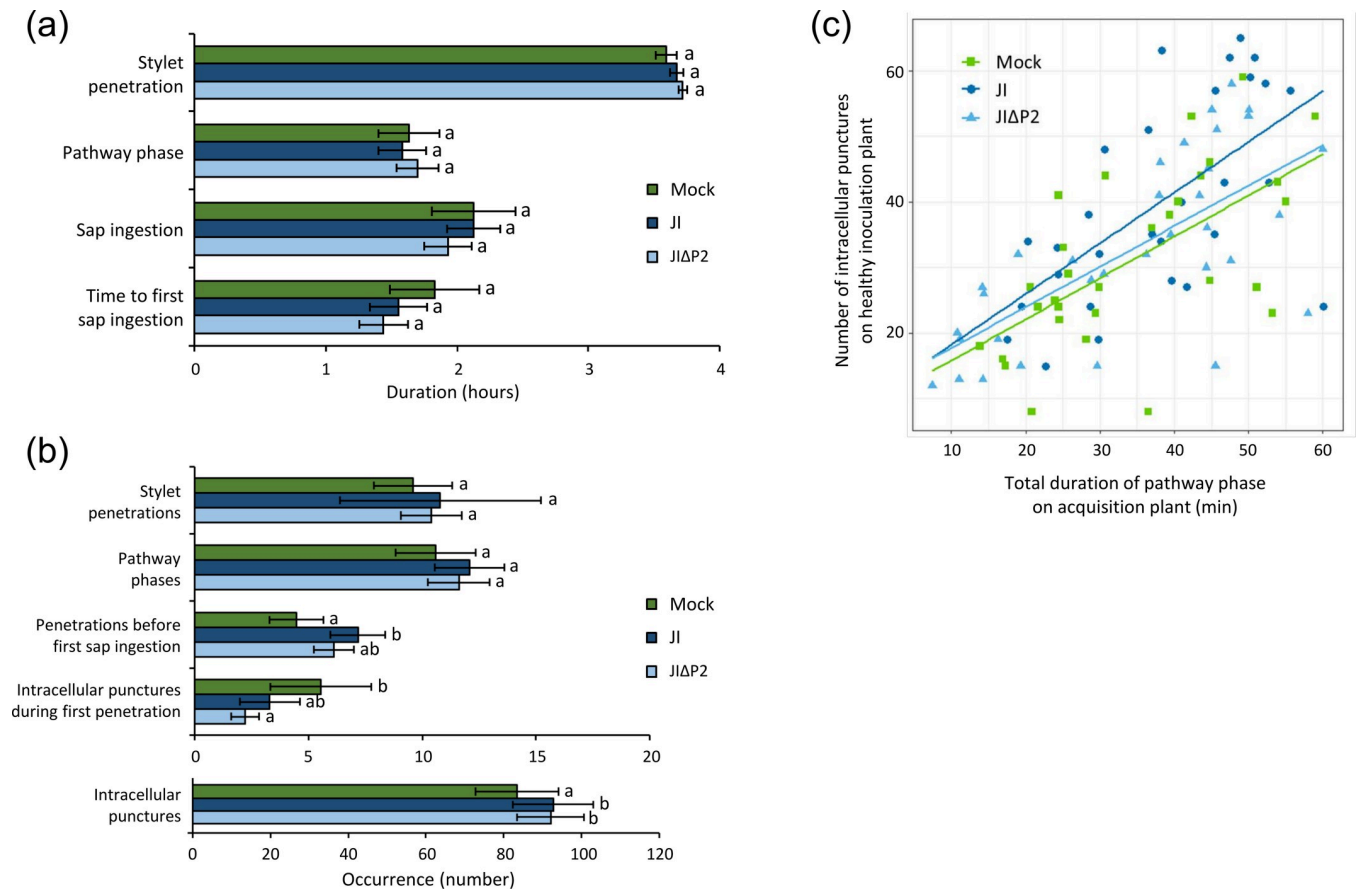


Fig 2. Feeding behavior during inoculation access period (IAP) of *Myzus persicae* on healthy plants after 1 h acquisition feeding on mock-inoculated, JI-infected or JIΔP2-infected plants (N = 22–26). (a) presents the duration and (b) the occurrence of behavior phases. The histogram bars show means and standard errors. Differing letters indicate significant differences between plant infection status as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). No significant differences were found for the duration of behavior phases (GLM and Cox models, $p > 0.05$). For the occurrence of events, significant differences were detected for the number of intracellular test punctures of aphids originating from infected (JI and JIΔP2) vs mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 12.629$, $p < 0.001$), for the number of intracellular punctures during first penetration (0-inflated, Df = 2, $\chi^2 = 39.740$, $p < 0.001$) and for the number of stylet penetrations before the first phloem sap ingestion for aphids transferred from JI-infected plants vs those transferred from mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 11.353$, $p < 0.001$). (c) Correlation between the number of intracellular test punctures during IAP on healthy plants and the total duration of pathway phase during acquisition access period (AAP) on mock-inoculated (green), JI-infected (dark blue) or JIΔP2-infected (light blue) plants. The coefficients of correlation are $r = 0.62$, $r = 0.61$ and $r = 0.69$ for mock-inoculated, JI-infected and JIΔP2-infected plants, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161.g002>

modifies feeding behavior post-acquisition, i.e. during the inoculation access period. Aphids were allowed a 1 h acquisition access period (AAP) (under EPG control) on mock-inoculated or infected plants and then transferred to healthy test plants for virus inoculation. The feeding behavior was recorded for another 4 h to assess the impact of viruliferous status on aphid behavior. The total duration of all feeding phases was similar for all conditions (Fig 2A). However, we detected differences in the occurrence of three probing parameters (Fig 2B). The total number of test punctures was significantly higher for aphids transferred from infected plants to healthy plants, compared to those originating from mock-inoculated ones. The number of intracellular punctures during the first stylet penetration was significantly lower for aphids transferred from infected plants compared to those transferred from healthy plants. This was due to infection and not to P2 because there was no difference between JI and JIΔP2 infections. The number of stylet penetrations before the first phloem sap ingestion was elevated for *Myzus persicae* having acquired from JI-infected plants compared to those coming from healthy

plants. Aphids having fed previously on JI Δ P2-infected plants required an intermediate number of penetrations until first phloem ingestion. Thus, there may be a tendency for P2 to increase probing events.

To better define a potential role of P2 on the aphid probing behavior, we performed a correlation analysis of the behavior of aphids during the 1 h AAP and the 4 h inoculation access periods (IAP) (Fig 2C). The number of intracellular punctures during IAP on healthy plants correlated strongly with the total duration of the pathway phase during AAP on infected plants (Pearson's correlation; $t = 7.988$, $Df = 90$, $p < 0.001$). Interestingly, the number of intracellular punctures per minute of the pathway phase was similar for aphids coming from healthy plants and JI Δ P2-infected plants, while this number was higher for aphids originating from JI-infected plants (LM, $\chi^2 = 755.500$, $Df = 2$, $p = 0.048$). This again is in favor of a role of P2 in modifying aphid probing behavior.

Feeding on purified P2 and virus particles modifies aphid probing behavior

Our results indicated that P2 altered aphid probing behavior on infected plants. This effect could be direct (P2 protein itself changes aphid behavior), indirect via P2-mediated changes in the host plant, or a combination of both. To test for a direct effect of P2, we allowed aphids to acquire recombinant P2 and purified P3:virions (the components of the CaMV transmissible complex) by membrane feeding on artificial medium. Then they were placed on healthy test plants and their feeding behavior was recorded by EPG (Fig 3). This approach eliminated all plant and virus factors that might modify aphid behavior by indirect action of P2. No significant differences for duration of feeding events were observed (GLM, $p > 0.05$) (S3 Fig). When analyzing the occurrence of events, we found that the number of phloem sap ingestions was not changed by acquisition of P2 (S3 Table). In contrast, the occurrence of several other behavior forms was different. Membrane acquisition of HP2 plus P3:virions increased significantly the total number of stylet penetrations, the number of brief stylet penetrations (< 3 min) (GLM, $Df = 4$, $\chi^2 = 19.636$, $p < 0.001$, S3 Table), and the number of stylet penetrations before the first phloem sap ingestion. Further, HP2 plus P3:virions augmented the number of intracellular test punctures and the number of intercellular pathway phases significantly. In general, the effect of HP2 plus P3:virions on aphid behavior was stronger than that of HP2 alone. An exception was the number of test punctures during the first stylet penetration that was significantly enhanced only for HP2.

Aphids feeding on plants infected with a CaMV mutant that expresses a P2 deficient in stylet binding show mostly normal probing behavior

Our results from the feeding experiment with artificial medium suggest a direct effect of P2 on aphid behavior. At this point, we consider two non-mutually exclusive hypotheses. P2 could modify behavior by binding to the stylets or by interacting with vector factors in the more posterior parts of the digestive tract. To test the first hypothesis, we used the mutant protein P2Rev5, which contains a single Q \rightarrow Y mutation at amino acid position 6, which abolishes P2 interaction with the stylets, but maintains all other properties of P2 [37]. Since the original P2Rev5 mutation was characterized in the CaMV CabbS background, we introduced the mutation into the JI genome and obtained the CaMV mutant JI-P2Rev5. Turnip plants infected with JI-P2Rev5 displayed symptoms identical to the wild type-infected plants (Fig 4A). Accumulation of the capsid protein P4 and P6-TAV was identical in JI and JI-P2Rev5-infected plants (Fig 4B). However, P2 accumulation was somewhat lower in JI-P2Rev5-infected plants than in wild type-infected plants (Fig 4B).

Infection with JI-P2Rev5 being similar to wild type virus infection, we assessed aphid behavior on JI-P2Rev5-infected turnip plants. Like in the previous experiment (Fig 1), no

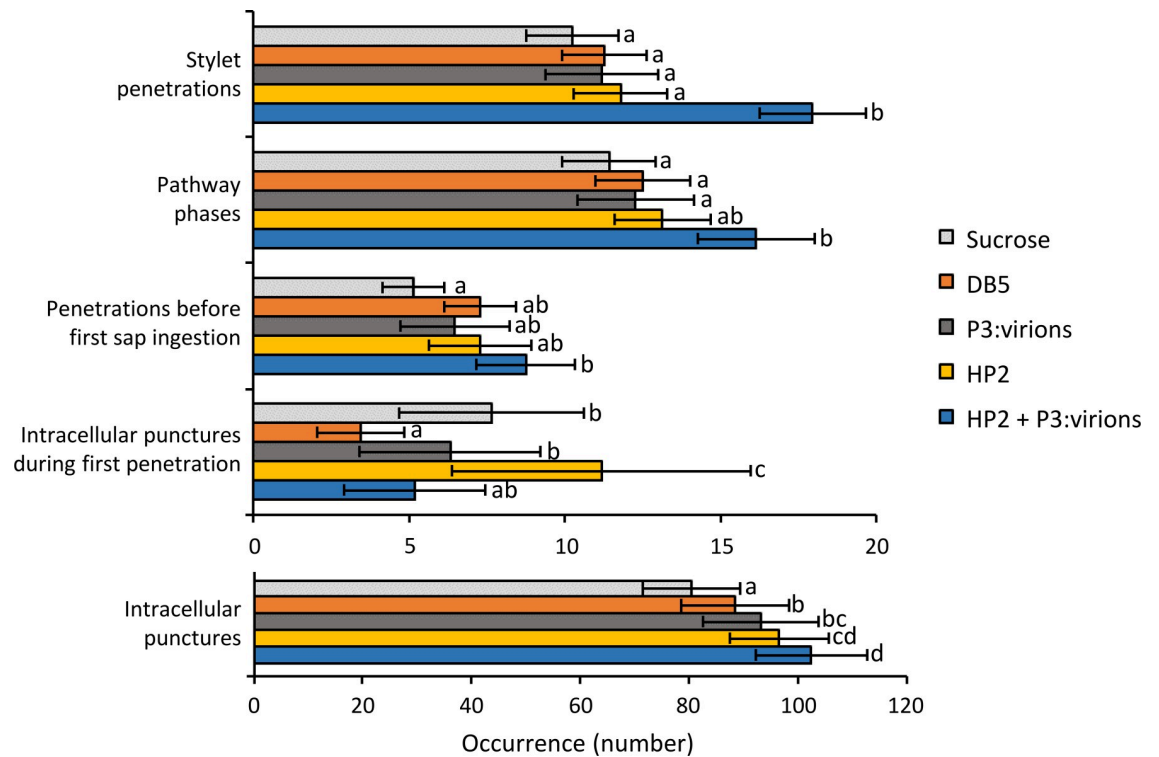


Fig 3. Feeding behavior of *Myzus persicae* on healthy plants after acquisition of P2 and P3:virions in artificial medium. The histogram bars display means and standard errors. Before recording aphid feeding behavior on healthy plants, aphids were allowed to feed under electrical penetration graph (EPG) control for 1 h on different artificial media: 15% sucrose in water (light grey); 15% sucrose in DB5 buffer (orange) or 15% sucrose (final) in DB5 buffer supplemented with P3 and purified virus particles (P3:virions, dark grey); his-tagged P2 (HP2, yellow); or HP2 and P3:virions (blue). Purity of the viral components used for aphid feeding assays on artificial medium is shown in S2 Fig. Only aphids having inserted their stylets for at least 5 min in the artificial media were used for the experiments (N = 21–26). Letters indicate significant differences between artificial media as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). Analysis of behavior occurrences indicated a significant effect of HP2+P3:virions on the total number of stylet penetrations (GLM, Df = 4, $\chi^2 = 23.228$, $p < 0.001$), the number of stylet penetrations before the first phloem phase (GLM, Df = 4, $\chi^2 = 20.090$, $p < 0.001$), the number of intracellular test punctures (GLM, Df = 4, $\chi^2 = 72.429$; $p < 0.001$) and the number of pathway phases (GLM, Df = 4, $\chi^2 = 21.336$, $p < 0.001$). HP2 alone had a significant effect on the number of intracellular test punctures during the first stylet penetration (0-inflated model, Df = 4, $\chi^2 = 72.430$, $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161.g003>

virus effect on the duration of probing events was found (see S4 Fig), so only those related to occurrence are shown here. Aphids on JI-infected plants performed more than twice as many intracellular punctures during the first stylet penetration than on JI-P2Rev5-infected or healthy plants (GLM, 0-inflated model, Df = 2, $\chi^2 = 77.32$, $p < 0.001$), which is the same result as obtained with JIAP2 (Fig 1).

The number of aphid stylet penetrations and pathway phases was lower on JI-infected plants than on JI-P2Rev5-infected or healthy plants. This was similar as in Fig 1, but whereas there the differences were statistically significant they were here marginally insignificant (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 1.146$, $\chi^2 = 5.452$, $p = 0.059$ and 0.065 , respectively). The number of penetrations before the first phloem feeding was significantly reduced for JI, but not for JI-P2Rev5, compared to mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 13.709$, $p = 0.001$). Except for the total number of intracellular punctures which was slightly (~10%) but significantly elevated for JI-P2Rev5, compared to JI and healthy plants, aphid probing behavior was very similar on JI-P2Rev5-infected and mock-inoculated plants. To sum up, the aphid behavior modifications

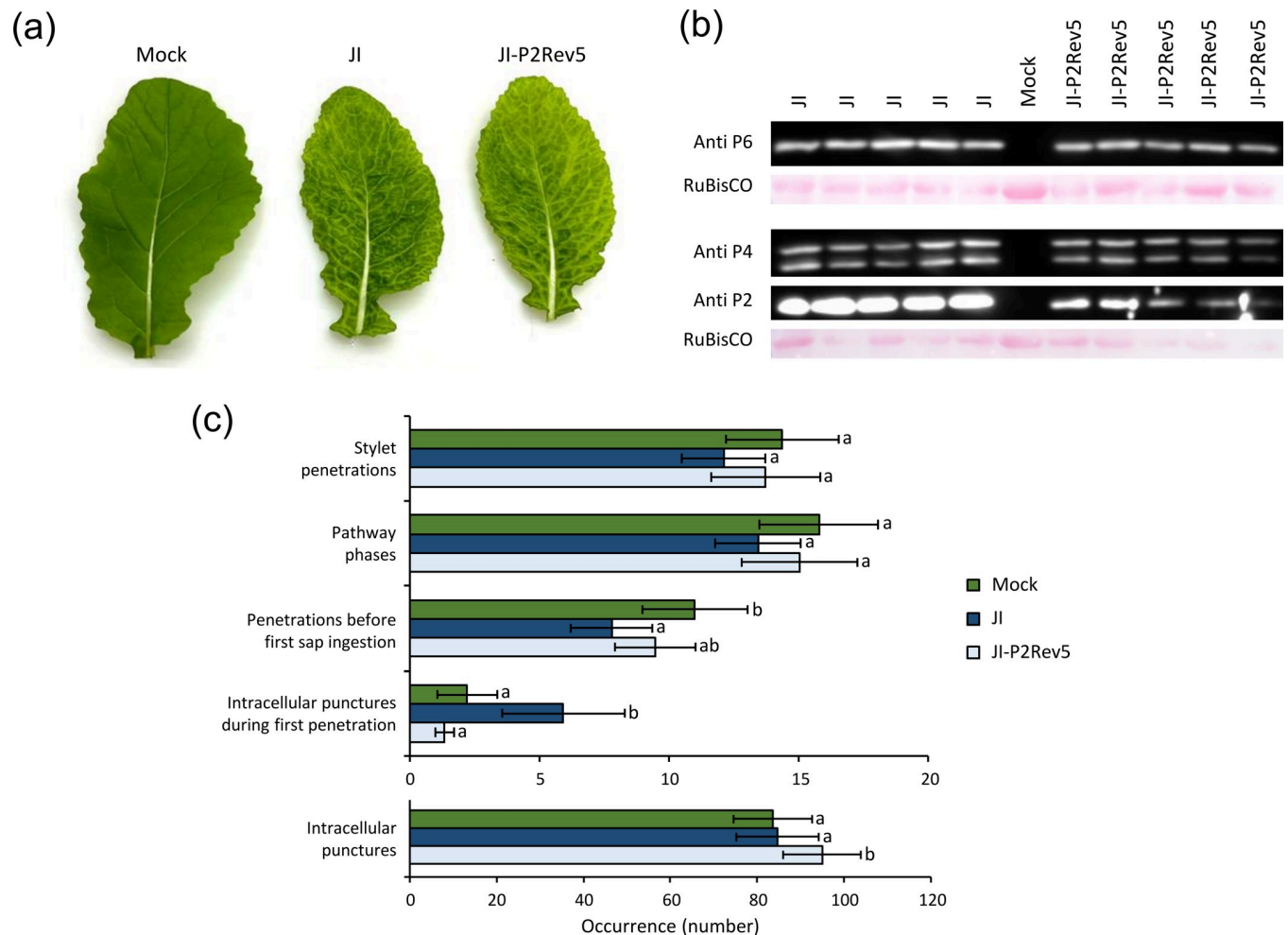


Fig 4. Probing behavior of aphids on turnips infected with non-transmissible JI-P2Rev5. (a) Mock-inoculated, JI- and JI-P2Rev5-infected turnip leaves at 14 dpi. (b) Western blot analysis of the accumulation of P2 (18 kDa), P4 (37, 44 kDa) and P6-TAV (62 kDa) in JI- or JI-P2Rev5-infected turnip plants at 14 dpi. Total leaf extracts from 5 infected plants per condition were analyzed. Ponceau S staining of the large RuBisCO subunit is shown as a loading control. Mock, extract from mock-inoculated leaf. (c) Feeding behavior of *Myzus persicae* on mock-inoculated, JI- or JI-P2Rev5-infected turnip plants at 14 dpi. The histogram bars present means and standard errors. The behavior of individual aphids was recorded by electrical penetration graph (EPG) for 4 h (N = 26–28). Different letters indicate significant differences between plant infection status as tested by GLM (generalized linear model), followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). The number of intracellular punctures during the first penetration is significantly higher for JI-infected vs mock- and JI-P2Rev5-infected plants (0-inflated model, Df = 2, $\chi^2 = 77.32$, $p < 0.001$). The number of penetrations before first sap ingestion is significantly lower for JI-infected compared to mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 13.709$, $p = 0.001$). The total number of intracellular punctures is similar for aphids on JI-infected and mock-inoculated turnips, but elevated for JI-P2Rev5-infected plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 23.692$, $p < 0.001$). Statistical analysis revealed no differences for the number of stylet penetrations and pathway phases (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 1.146$, $\chi^2 = 5.452$, $p = 0.059$ and 0.065 , respectively).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161.g004>

observed for JI were not found for P2Rev5, in particular the twofold increase in the number of intracellular punctures during the first penetration. The observed behavioral changes indicate that the acrostyle-binding capacity of P2 is important for this. This is supported by the fact that a CaMV isolate harboring the P2Rev5 mutation is not transmissible [37] and that recombinant GFP-tagged P2Rev5 does not bind to dissected stylets in *in vitro* interaction assays [24]. We set up membrane feeding assays using baculovirus-expressed P2Rev5 to confirm these observations. Unfortunately, the results were not conclusive, probably because we could use for this experiment only crude P2 extracts containing many contaminating proteins and other compounds (S5 Fig; S5 Table).

Discussion

CaMV infection alters the overall aphid feeding behavior, while the P2 helper component modulates exclusively aphid probing behavior

Analysis of feeding behavior on infected plants showed significant modification of three feeding activities that are directly related with CaMV acquisition (Fig 1). One, the duration of phloem ingestion increased, two, the total number of test punctures during the entire eight hour observation period decreased, while, three, their number during the first stylet penetration doubled.

Prolonged phloem ingestion might be advantageous for CaMV transmission because the phloem sap contains virus particles and uptake of CaMV from the phloem has been reported before [33]. Prolonged phloem ingestion was observed previously with the same CaMV isolate on two other hosts, *Arabidopsis thaliana* and *Camelina sativa* [34]. This could therefore highlight potential adaptive virus effects. The second observation, reduction of intracellular test punctures over the entire observation period, might be considered counterproductive to acquisition because it should decrease chances to acquire P2, which is absent from the sieve tubes. However, the work by Palacios and coworkers showed that combined uptake of CaMV from tissue and phloem sap might even be more efficient than uptake from epidermis and mesophyll cells alone. Thus, potential negative effects of decreased intracellular test punctures seem to be outweighed by earlier and longer phloem ingestion. This differentiates CaMV from typical non-circulative viruses that are acquired during test punctures in the tissue and lost rapidly when vectors reach the phloem (see for example [38]). These two parameters, phloem ingestion and total number of test punctures, were altered similarly for aphids feeding on plants infected with JI and with JIΔP2. This demonstrates that P2 plays no role in this and that other viral factors are involved. A candidate is P6-TAV, which contributes to the modification of aphid feeding behavior although it alone is not sufficient to induce all behavior changes [34].

The third parameter, the number of test punctures during the first stylet penetration, was doubled on plants infected by JI, but not on healthy plants or those infected by JIΔP2. As removing the coding sequence of P2 from the CaMV genome did not affect other parameters of the infection (Fig 1), we suggest that the increase in test punctures during the first penetration may be caused exclusively by P2. Test punctures are mandatory for acquisition of P2 (which is found only in epidermis and mesophyll cells [33]) and their increase during the first stylet penetration might speed up P2 acquisition and consequently the acquisition of P3:virions. Virus acquisition during the first stylet penetration is also favorable for virus transmission by non-host aphids that reject incompatible plants after the first test punctures and leave them [39,40]. Carmo-Sousa et al. [41] reported similar results for the non-circulative cucumber mosaic virus (CMV). They observed that aphids exhibited during the first 15 minutes—but not later—twice as many test punctures on CMV-infected plants than on mock-inoculated plants. Therefore, this change in aphid behavior during its first contact with the infected plant may be very important for the acquisition of viruses transmitted in a non-circulative manner like CaMV and CMV. An interesting point is that the behavior change is in both cases immediate since it is observed from the very first test punctures onwards. This suggests that the ‘active compound’ does not need to traverse the digestive tract to induce behavior modification.

We also studied aphid inoculation behavior. We found no differences in phloem feeding behavior of *M. persicae* on healthy test plants, no matter whether the aphids had fed before on mock-inoculated, JI-infected or JIΔP2-infected plants. This is expected because the phloem feeding behavior is essentially influenced by plant quality and phloem sap composition [42], and this is similar for all healthy inoculation plants. However, some relevant probing parameters were modified. First, the total number of test punctures was higher for aphids coming

from infected plants compared to those from mock-inoculated ones. There was no difference between JI and JIΔP2, indicating that not P2 but other viral or plant factors increased the number of test punctures. Second, the number of stylet penetrations before the first phloem sap ingestion was higher when aphids had previously fed on JI-infected plants compared to mock-inoculated plants, whereas this number was intermediate after acquisition feeding JIΔP2-infected plants. P2 might therefore be partially involved in the modification of this parameter. Furthermore, the correlation between the number of intracellular punctures on healthy inoculation plants and the duration of the pathway phase on infected JI but not JIΔP2 acquisition plants (Fig 2C) suggests that P2 (i.e. JI-infected turnips) alters subsequent aphid probing behavior. The increased number of probes and intracellular punctures on a healthy plant by CaMV-carrying aphids might increase the chances for successful inoculation and be beneficial for transmission.

Evidence for a direct effect of P2 on aphid behavior

P2 might directly or indirectly change aphid probing behavior. Our membrane feeding assays present evidence for a direct effect of P2. Aphids having acquired different combinations of purified P2 or P3:virions through feeding on the artificial medium (thus excluding any interference from other plant or virus factors), showed altered subsequent probing behavior, compared to aphids that had access to artificial medium without viral compounds (Fig 3). Compared to inoculation feeding on healthy test plants after CaMV acquisition from infected plants (Fig 2), inoculation feeding after membrane feeding changed more behavioral parameters. We propose that this is due to the unphysiological conditions of the artificial feeding medium (high salt content, presence of detergent), necessary to maintain P2 active [43]. Therefore, although the membrane feeding experiments do show a direct effect of P2 on aphids, interpretation of the altered behaviors is difficult.

Hypotheses on the mode of action of P2

How could P2 change aphid probing behavior? P2 binds to a specific region in the stylets, the acrostyle in the common canal in the stylet tips [24,25,44]. The acrostyle at the tip of the maxillary stylets is very restricted in size (~0.2 μm x 5 μm) and located in a stylet region whose diameter does not exceed ~0.5 μm [25]. Binding of P2 and especially of P3:virions (about 35–60 nm in diameter [45,46]) might cause steric hindrance and impede the flows in the common channel during the active ingestion phases (i.e. intracellular test punctures [47]). The changed probing behavior might be an effort of the aphid to compensate for this. In favor of this hypothesis is that membrane acquisition of P2 plus P3:virions had globally a stronger effect on aphid probing behavior than P2 alone. Furthermore, P2 is known to form long paracrystalline filaments that even alone could induce some alteration of the flux in the common canal [43,48]. We observed no effect of P2 on phloem ingestion. An explanation is that this feeding behavior is passive and driven by the high hydrostatic pressure of the phloem sap, which might outweigh steric hindrance effects [49]. An alternative, but not mutually exclusive hypothesis is that binding of P2 or transmissible complexes to the acrostyle affects stylet proteins. The acrostyle is covered with cuticular proteins entangled with the chitin fibers of the stylets [50]. Two of these proteins (called stylins) have been identified and at least one of them—Stylin-1—can interact with P2 [26]. The binding of P2 to stylins might interfere with their natural function, which is yet unknown. The lack of nerve cells in the maxillary stylets harboring the acrostyle makes it implausible that stylins are signaling receptors and that P2 binding is perceived as a signal [51]. Instead, P2 might displace or compete with attachment of natural stylin ligands—for example saliva effectors [52]—thus making foraging for the aphid more difficult and resulting in an

increased number of test punctures [53,54]. It is interesting to note that the binding of P2 to the acrostyle and the concomitant changes in aphid behavior is evidence that the acrostyle is needed for proper probing activity. P2 might also exercise an effect by binding further down in the digestive tract. However, we believe this is unlikely because aphids on plants infected with the JI-P2Rev5 mutant, which abolishes interaction with the acrostyle, displayed similar behavior as those on mock-inoculated or JI Δ P2-infected plants. In particular, they did not show the twofold increase in intracellular punctures during the first stylet penetration (compare Figs 1D and 4C). Taken together, aphid behavior on JI Δ P2- and JI-P2Rev5-infected plants seems to show that the interaction of P2 with the acrostyle stylin increases frequency of some characteristic aphid probing behaviors facilitating an efficient virus acquisition.

Concluding remarks

To our knowledge, a direct and immediate effect on vector behavior of a protein from a virus or other pathogen by simple binding to the latter's mouthparts has not been reported before. The protozoan parasite *Leishmania* infects the gut of its sand fly vector and secretes a gelling protein that together with promastigotes obstructs and damages the mouthparts and gut, inciting the sand fly to increase biting frequency on mammal hosts and with it transmission [55]. A similar 'plugging' phenomenon is observed for transmission of the bacterium *Yersinia pestis* by flea vectors [56]. However, there are significant differences to CaMV. First, *Leishmania* and *Yersinia* infect their vectors and establish rather intimate relationships with them, contrary to non-circulative CaMV. Second, the *Leishmania* and *Yersinia* gelling proteins are produced on-site in the intestine, whereas P2 production takes place exclusively in the plant host and seems to affect vector behavior only during and shortly after the vector-host encounter. Thus, the 'site of assault' on the vector is distinctly different in the CaMV pathosystem. It would be interesting to explore whether other plant and animal viruses and other pathogens modify vectors directly through host-expressed pathogen factors, as this could be a means to broaden vector specificity since the intimate interactions to prepare subsequent transmission (in this case allocation of P2) take place in the host and not in the vector (as for circulative viruses). This type of manipulation would appear particularly relevant for non-circulative viruses such as CaMV that are transmitted generally by numerous aphid vector species (at least 27 for CaMV, [57]). This could impact transmission biology and related fields.

Materials and methods

Plant growth and virus inoculation

Turnip seeds (*Brassica rapa* L. var. "Just Right") were provided by Takii Europe B.V. (de Kwakel, Netherlands), sown in TS 3 fine substrate (Klasmann-Deilmann, Geeste, Germany) in pots (70 mm x 70 mm x 65 mm) and cultivated at 8 h light / 16 h dark photoperiod at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Plants were inoculated at the first true leaf stage (9-day-old) and then grown under 14/10 h light/dark cycle at $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Plants were used for experimentation 14 ± 2 days post-inoculation (dpi), when they showed clear symptoms. Initial mechanical inoculation was performed with infectious plasmids. Subsequent inoculations were mechanical and used plant extracts prepared from infected turnips. For this, 1 g of infected leaves (21 dpi) were ground with 1 ml 10 mM HEPES pH 7.2 and carborundum and rub-inoculated on 9-day-old turnip seedlings.

Infectious plasmids

Infectious plasmids for initial inoculation of turnip plantlets were pGreen-35S-B-JI [58] and pGreen-35S-B-JI- Δ P2 [59] that encode the CaMV Cabb B-JI wild type sequence [60], called JI

in the text, and a mutant virus sequence where the P2 sequence is deleted and replaced by an *ApaI* restriction site (referred to as JIΔP2 in the text), respectively, both under control of the 35S promoter. For construction of pGreen-35S-B-JI-P2Rev5, containing a Q→R mutation of amino acid 6 of P2 [37] the P2 sequence of JI was PCR-amplified with Q5 polymerase (NEB, Evry, France) with primers 5'-AGAGGGCCCATGAGCATTACGGGT**TACCCGCATG**-3' and 5'-TTAGGGCCCTTAGCCAATAATAT**TCTTTAATCC**-3' containing the P2Rev5 mutation (in bold) and 5' and 3' *ApaI* restriction sites (underlined). The amplicon was gel-purified (Machery-Nagel, Hoerdt, France) digested with *ApaI* (NEB) and ligated with T2 ligase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) into pGreen-35S-B-JI-ΔP2 cut with the same restriction enzyme and gel-purified. *Escherichia coli* XL10-Gold were transformed with the ligation product, recombinant colonies identified by colony PCR, and the P2 sequence verified by Sanger sequencing.

Aphid rearing

The *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: *Aphididae*) clone was originally isolated in the Netherlands. Aphids were reared on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *pekinensis* var. "Granaat") in a growth chamber at 20 ± 1°C and a 14/10 h light/dark photoperiod.

Aphid feeding behavior

The electrical penetration graph DC-system (EPG) was used as described by [61] to investigate the effects of CaMV infection on the feeding behavior of *M. persicae*. To integrate one aphid and one plant into an electrical circuit, a thin gold wire electrode (12.5 μm diameter and 2 cm long) was attached with water-based silver glue to the dorsum of an adult apterous aphid that had been immobilized on a 10 μl pipette tip by applying a slight negative air pressure with a vacuum pump. Eight aphids were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier (EPG Systems, Wageningen, Netherlands) and each one was placed directly on the adaxial leaf surface of an individual turnip plant. A second copper rod electrode was inserted into the soil of each potted plant to close the electrical circuit. For the EPG experiments "Acquisition feeding experiment" and "JI-P2Rev5 experiment", the recordings were performed continuously for 8 h and 4 h respectively, during the photophase inside a Faraday cage at 21 ± 1°C. In the second EPG experiment ("Inoculation feeding experiment"), aphids' probing and feeding behaviors were recorded two times. First, aphids were allowed a 1 h acquisition access period on a test plant (either mock-inoculated, JI-infected or JIΔP2-infected). Then the aphid (still attached to the gold wire) was moved to a healthy plant for a 4 h inoculation access period. In the third EPG experiment ("Artificial medium experiment"), aphids were first allowed to feed on an artificial medium during a 1 h acquisition access period and then moved onto a healthy plant for a 4 h inoculation access period. For this setup, the second electrode (copper wire) was inserted in 20 μl medium contained in a sachet formed by two Parafilm membranes spanned over a plastic ring. The feeding medium consisted of 15% sucrose in water or 15% sucrose in DB5 buffer, to which virus components were added as indicated. Acquisition and analysis of the EPG waveforms were carried out with PROBE 3.5 software (EPG Systems). Relevant aphid behavior EPG parameters were calculated with EPG-Calc 6.1 software [62] and were based on the different EPG waveforms described by Tjallingii and Hogen Esch [47]. Aphids that produced signals (i.e. total duration of stylet penetration) for less than 5 h out of 8 h in the first EPG experiment (or 2.5 h out of the 4 h recordings in the second, third and fourth EPG experiments) were excluded from the analysis. This criterion was set at 30 min for the AAP duration on plants whereas for aphids on artificial medium, the threshold was 5 min. For an example of an EPG waveform for aphids on a plant or artificial medium, see S6 and S7 Figs.

Statistical analysis

The proportion of plants expressing symptoms was analyzed using a Pearson's chi-squared test with Yates's correction ($p < 0.05$). Data on the number of days until the appearance of symptoms on infected turnip plants was not normally distributed. Therefore, we used a non-parametric Wilcoxon rank-sum test ($p < 0.05$).

We used Generalized Linear Model (GLM) with the likelihood ratio and the chi-squared (χ^2) test to determine a statistically significant difference for EPG data. As feeding duration parameters were not normally distributed we used GLM using a gamma (link = "inverse") distribution. Because of the large number of 0's for the "Intracellular punctures during the first penetration" parameter, we used the "zeroinfl" function based on a zero-inflated Poisson model (R package: "pscl"). Parameter "time to first sap ingestion" was modelled using the Cox proportional hazards (CPH) model and we treated cases where the given event did not occur as censored. The assumption of the validity of proportional hazards was checked using the functions "coxph" and "cox.zph", respectively (R packages: "survival" and "RVAideMemoire"). When a significant effect was detected, a pairwise comparison using estimated marginal means (R package "emmeans"; p-value adjustment with Tukey method) at the 0.05 significance level was used to test for differences between treatments (p-values are shown in [S6 Table](#)). A total of 28 EPG parameters were calculated ([S1–S5 Tables](#)).

Correlation between EPG parameters from inoculated or healthy plants was carried out with a Linear Model (LM). A pairwise comparison using estimated marginal means (R package "emmeans"; p-value adjustment with Tukey method) at the 0.05 significance level was used to test for differences between the three treatments. The coefficient of correlation ("r") was calculated by the function cor.test.

The application conditions of all LM and GLM were verified by inspecting residuals and QQ plots. All statistical analyses were performed using R software v. 4.0.5 (www.r-project.org/).

Western Blot analysis of infected plants and artificial feeding media

Total protein extracts were prepared from leaves as described previously [34], separated by 15% (P2 and P4) or 12% (P6-TAV) SDS polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes as described in [63]. Western blots were performed using antisera raised against P2, P4 and P6-TAV (all diluted 1:2,000, [34]). Secondary antibodies were horseradish peroxidase conjugates, which were used at a 1:10,000 dilution. The same blot was cut into two stripes to test simultaneously for P2 and P4. Bound antibodies were revealed by enhanced chemiluminescence using a G-Box.

Purification of recombinant proteins and virions

N-terminal his-tagged P2 (HP2) was expressed in baculovirus-infected *Sf9* cells as described previously [43]. Cells from three 75 cm² cell culture flasks were harvested by centrifugation for 5 min at 500 g and lysed in 9 ml DB5 buffer (50 mM HEPES pH 8.0, 500 mM Li₂SO₄, 0.5 mM EGTA, 0.2% CHAPS) supplemented with SigmaFast Protease Inhibitor (EDTA-free) and frozen at -80°C until purification. For purification, the thawed cell lysate was centrifuged for 20 min at 24,000 g and the supernatant charged on a column loaded with 300 μ l Ni-NTA resin (Macherey-Nagel) pre-equilibrated with DB5. The column was washed with 5 ml DB5 supplemented with 25 mM imidazole. HP2 was eluted with DB5 supplemented with 250 mM imidazole, the protein-containing fractions combined and the imidazole removed by gel filtration with a Sephadex G25 column. Purity and concentration of HP2 were estimated by Instant Blue staining of gels after SDS-PAGE, using BSA as standard.

Wild type P3 was purified from *E. coli* BL21 cells as described [46]. Briefly, cells induced with 1 mM IPTG for 4 h were harvested by centrifugation for 15 min at 4,000 g, washed once with PBS and the pellets were frozen and stored at -80°C. Cells were lysed by ultrasonication in PBS pH 8 supplemented with 15% glycerol, 0.2 mM DTT, 0.1% Tween20 and SigmaFast Protease Inhibitor (EDTA-free) and centrifuged for 10 min at 18,000 g. The supernatant was heated for 10 min at 65°C and insoluble proteins were removed by centrifugation for 15 min at 18,000 g. Finally, P3 was purified by differential ammonium sulfate precipitation from 25–40% saturation and ammonium sulphate removed by gel filtration with Sephadex G25 or ultrafiltration with a Vivaspin column.

CaMV particles were purified essentially following the protocol of Gömec described previously [64]. One hundred grams of infected turnip leaves were homogenized in two volumes of phosphate buffer (0.5 M KH_2PO_4 pH 7.2, 7.5 g/l Na_2O_3) and filtered through four layers of cheesecloth and one layer of Miracloth. Urea and Triton X-100 were added to final concentrations of 1 M and 2.5%, respectively, and the sap was stirred overnight at 4°C. Then the liquid was clarified by centrifugation for 10 min at 5,000 g and the supernatant was centrifuged for 70 min at 110,000 g. The pellets were resuspended overnight at 4°C in 12 ml 10 mM HEPES pH 7.2. After centrifugation for 5 min at 10,000 g, the supernatants were loaded on 10–40% sucrose gradients in water and centrifuged for 3 h at 100,000 g in a swing-out rotor. The whitish band visible in the gradients by transillumination was collected with a Pasteur pipette, diluted 1:3 with water and centrifuged for 70 min at 110,000 g. The pellets containing the virus were resuspended in 10 mM HEPES pH 7.2.

Supporting information

S1 Fig. Kinetics of symptom onset on turnip plants. Kinetics of symptom onset on turnip plants after mechanical inoculation with leaf extracts revealed no significant differences between JI and JIΔP2, neither for the percentage of infected plants ($N = 29\text{--}30$) (Pearson's Chi-squared test, $\chi^2 = 0.01$, $Df = 1$, $p = 0.92$) nor the day of symptom onset (Wilcoxon rank sum test, $W = 437$, $p = 0.970$).

(PDF)

S2 Fig. Viral components used for aphid feeding assays on artificial medium. (a) Instant Blue stained protein gel after SDS-PAGE. The slots were loaded with the indicated components. (b) Western blot analysis of purified recombinant his-tagged P2 (HP2), partially purified recombinant P3, and purified virus particles. The blots were developed with the indicated antisera.

(PDF)

S3 Fig. Feeding behavior of *Myzus persicae* on healthy plants after membrane acquisition of P2 and P3:virions. Bars show means and standard errors. Before recording aphid feeding behavior on healthy plants, aphids were allowed to feed under EPG control for 1 h on different artificial media: 15% sucrose in DB5 buffer (light grey); DB5 buffer alone (orange) or DB5 buffer supplemented with P3 and purified virus particles (P3:virions, dark grey); his-tagged P2 (HP2, yellow); or HP2 and P3:virions (blue). Viral components used for aphid feeding assays on artificial medium are shown in S3 Fig. Only aphids having inserted their stylets for at least 5 min in the artificial media were used for the experiments ($N = 21\text{--}26$). EPG parameters related to duration are displayed. Letters indicate significant differences between artificial media as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey).

(PDF)

S4 Fig. Feeding behavior of *Myzus persicae* on mock-inoculated, JI- or JI-P2Rev5-infected turnip plants at 14 dpi. Bars show means and standard errors. The behavior of individual

aphids was recorded by electrical penetration graph (EPG) for 4 h (N = 26–28). EPG parameters related to duration are displayed. Different letters indicate significant differences between plant infection status as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey).
(PDF)

S5 Fig. Effect of recombinant P2Rev5 on aphid behavior. Bars show means and standard errors. (a-b) Feeding behavior of *Myzus persicae* on healthy plants after membrane acquisition of wild type P2 and P3:virions (P2+P3:virions), P2 carrying the mutation Rev5 and P3:virions (P2Rev5+P3:virions) or of an irrelevant protein (CLINK). Before recording aphid feeding behavior on healthy plants, aphids were allowed to feed under EPG control for 1 h on the different artificial media. Only aphids having inserted their stylets for at least 5 min in the artificial media were used for the experiments (N = 29–34). Selected EPG parameters are presented sorted according to (a) duration or (b) occurrence. Different letters show significant differences between treatments as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). (a) Statistical analysis of the duration of events revealed no difference for parameters shown (GLM, $p > 0.05$). (b) Statistical analysis of the occurrence of events revealed significant differences for the numbers of intracellular punctures during first penetration and total intracellular punctures (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 95.247$, $\chi^2 = 49.683$, $p < 0.001$, respectively). None of the other statistically processed parameters showed a significant difference between treatment (see S5 Tables). (c) Instant Blue stained protein gel after SDS-PAGE of Sf9 crude extracts used for aphid feeding assays on artificial medium. Black arrows point to the position of P2 and P2Rev5, P2:GFP and P2Rev5:GFP, and CLINK, respectively. P2:GFP and P2Rev5:GFP were not used in our experiment.
(PDF)

S6 Fig. Example of a typical EPG waveform recorded on a leaf. The aphid inserted the stylets into tissue after a few seconds (red arrow) and did probing during the rest of the record (red line). In chronological order, behaviors recorded were a pathway phase (dark grey line) with interspersed intracellular test punctures (green arrows), then salivation into the phloem (medium grey line), and finally a long period of passive phloem sap ingestion (light grey line).
(PDF)

S7 Fig. Typical EPG waveform recorded during membrane feeding. At each insertion of the aphid stylets into the artificial medium a signal was observed (red line). Thus, the duration of presence or absence of aphid stylets in the medium could be measured but no behavior phases could be discerned. This might have been due to the high conductivity of the DB5 buffer that was used as a medium.
(PDF)

S1 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the dataset “Acquisition feeding experiment”.
(PDF)

S2 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the dataset “inoculation feeding experiment”.
(PDF)

S3 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the dataset “artificial medium experiment”.
(PDF)

S4 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the dataset “JI-P2Rev5 experiment”.

(PDF)

S5 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the dataset “recombinant P2Rev5 experiment”.

(PDF)

S6 Table. List of p-values of different pairwise comparisons performed when a significant effect was detected with GLM (p-value adjustment with Tukey method at the 0.05 significance level).

(PDF)

S1 Text. Production of recombinant P2Rev5 and CLINK.

(PDF)

Acknowledgments

We thank Claire Villeroy for aphid rearing and Takii Europe seed company for gracefully providing turnip seeds. We are also thankful to Maria Dimitrova (IBMP Strasbourg) for initial plant inoculation and to Marilyn Uzest (PHIM Montpellier) for critical reading of the manuscript. Part of the plants were provided by the experimental unit of INRAE Grand Est-Colmar (UEAV).

Author Contributions

Conceptualization: Maxime Verdier, Quentin Chesnais, Martin Drucker.

Formal analysis: Maxime Verdier, Quentin Chesnais.

Funding acquisition: Martin Drucker.

Investigation: Maxime Verdier, Quentin Chesnais.

Methodology: Maxime Verdier, Quentin Chesnais, Martin Drucker.

Project administration: Martin Drucker.

Resources: Elodie Pirolles, Stéphane Blanc.

Supervision: Quentin Chesnais, Martin Drucker.

Validation: Maxime Verdier, Quentin Chesnais.

Visualization: Maxime Verdier.

Writing – original draft: Maxime Verdier, Quentin Chesnais, Martin Drucker.

Writing – review & editing: Maxime Verdier, Quentin Chesnais, Stéphane Blanc, Martin Drucker.

References

1. Bragard C, Caciagli P, Lemaire O, Lopez-Moya JJ, MacFarlane S, Peters D, et al. Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annual Review of Phytopathology*. 2013; 51: 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102346> PMID: 23663003
2. Ng JCK, Perry KL. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*. 2004; 5: 505–511. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x> PMID: 20565624

3. Ray S, Casteel CL. Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell*. 2022; koac058. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058> PMID: 35277714
4. Gandon S. Evolution and manipulation of vector host choice. *American Naturalist*. 2018; 192: 23–34. <https://doi.org/10.1086/697575> PMID: 29897804
5. Lefèvre T, Koella JC, Renaud F, Hurd H, Biron DG, Thomas F. New prospects for research on manipulation of insect vectors by pathogens. *PLoS Pathogens*. 2006; 2: 0633–0635. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020072> PMID: 16895446
6. Mauck KE, Chesnais Q, Shapiro LR. *Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses*. 1st ed. *Advances in Virus Research*. Elsevier Inc.; 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007> PMID: 29908590
7. Roosien BK, Gomulkiewicz R, Ingwell LL, Bosque-Pérez NA, Rajabaskar D, Eigenbrode SD. Conditional vector preference aids the spread of plant pathogens: Results from a model. *Environmental Entomology*. 2013; 42: 1299–1308. <https://doi.org/10.1603/EN13062> PMID: 24246613
8. Poulin R. *Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions*. 1st ed. *Advances in the Study of Behavior*. Elsevier Inc.; 2010. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
9. Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, Davis TS. Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*. 2018; 63: 169–191. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043119> PMID: 28968147
10. Mauck K, Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC. Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: Evidence from plant viruses. *Functional Ecology*. 2012; 26: 1162–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>
11. Mauck KE, Kenney J, Chesnais Q. Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*. 2019; 33: 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.001> PMID: 31358199
12. Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC. Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107: 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107> PMID: 20133719
13. Mauck K, De Moraes CM, Mescher M. Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell and Environment*. 2014; 37: 1427–1439. <https://doi.org/10.1111/pce.12249> PMID: 24329574
14. Mauck K, De Moraes C, Mescher M. Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016; 32: 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.012> PMID: 27362574
15. Wu D, Qi T, Li WX, Tian H, Gao H, Wang J, et al. Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. *Cell Research*. 2017; 27: 402–415. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.2> PMID: 28059067
16. Westwood JH, Groen SC, Du Z, Murphy AM, Anggoro DT, Tungadi T, et al. A trio of viral proteins tunes aphid-plant interactions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 2013; 8: 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083066> PMID: 24349433
17. Arinaitwe W, Guyon A, Tungadi TD, Cunniffe NJ, Rhee S, Khalaf A, et al. The Effects of Cucumber Mosaic Virus and Its 2a and 2b Proteins on Interactions of Tomato Plants with the Aphid Vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Viruses*. 2022; 14: 1703. <https://doi.org/10.3390/v14081703> PMID: 36016326
18. Hu K, Yang H, Liu S, He H, Ding W, Qiu L, et al. Odorant-Binding Protein 2 is Involved in the Preference of *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae) for Rice Plants Infected with the Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus. *flen*. 2019; 102: 353–358. <https://doi.org/10.1653/024.102.0210>
19. Wang S, Guo H, Ge F, Sun Y. Apoptotic neurodegeneration in whitefly promotes the spread of TYLCV. VijayRaghavan K, editor. *eLife*. 2020; 9: e56168. <https://doi.org/10.7554/eLife.56168> PMID: 32729829
20. Wu W, Yi G, Lv X, Mao Q, Wei T. A leafhopper saliva protein mediates horizontal transmission of viral pathogens from insect vectors into rice phloem. *Commun Biol*. 2022; 5: 204. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03160-y> PMID: 35246603
21. Herbison R, Lagrue C, Poulin R. The missing link in parasite manipulation of host behaviour. *Parasites & Vectors*. 2018; 11: 222. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2805-9> PMID: 29615121
22. Dáder B, Then C, Berthelot E, Ducouso M, Ng JCK, Drucker M. Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Sci*. 2017; 24: 929–946. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12470> PMID: 28426155

23. Lu S, Chen M, Li J, Shi Y, Gu Q, Yan F. Changes in *Bemisia tabaci* feeding behaviors caused directly and indirectly by cucurbit chlorotic yellows virus. *Virology*. 2019; 16: 106. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1215-8> PMID: 31438971
24. Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hébrard E, Garzo E, Candresse T, et al. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104: 17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104> PMID: 17962414
25. Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevielle C, Cot D, Blanc S. The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure and Development*. 2010; 39: 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.02.005> PMID: 20170746
26. Webster CG, Pichon E, Munster M Van, Monsion B, Deshoux M, Gargani D. Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets. *Journal of Virology*. 2018; 92: 1–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18> PMID: 29769332
27. Armour SL, Melcher U, Pirone TP, Lyttle DJ, Essenberg RC. Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA. *Virology*. 1983; 129: 25–30. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90392-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90392-6) PMID: 18639087
28. Lung MCY, Pirone TP. Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus. *Virology*. 1974; 60: 260–264. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90383-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90383-3) PMID: 4841178
29. Leh V. Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *The EMBO Journal*. 1999; 18: 7077–7085. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.7077> PMID: 10601029
30. Leh V, Jacquot E, Geldreich A, Haas M, Blanc S, Keller M, et al. Interaction between the Open Reading Frame III Product and the Coat Protein Is Required for Transmission of Cauliflower Mosaic Virus by Aphids. *Journal of Virology*. 2001; 75: 100–106. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.1.100-106.2001> PMID: 11119578
31. Pirone TP, Blanc S. Helper-Dependent Vector Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*. 1996; 34: 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.227> PMID: 15012542
32. Drucker M, Froissart R, Hébrard E, Uzest M, Ravallec M, Espérandieu P, et al. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002; 99: 2422–2427. <https://doi.org/10.1073/pnas.042587799> PMID: 11842201
33. Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A, Fereres A. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*. 2002; 83: 3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163> PMID: 12466494
34. Chesnais Q, Verdier M, Burckbuchler M, Brault V, Pooggin M, Drucker M. Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*. 2021; 1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069> PMID: 33993609
35. Schoelz JE, Leisner S. Setting up shop: The formation and function of the viral factories of cauliflower mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8: 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01832> PMID: 29163571
36. Pooggin MM, Ryabova LA. Ribosome shunting, polycistronic translation, and evasion of antiviral defenses in plant pararetroviruses and beyond. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00644> PMID: 29692761
37. Moreno A, Hébrard E, Uzest M, Blanc S, Fereres A. A Single Amino Acid Position in the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus Can Change the Spectrum of Transmitting Vector Species. *Journal of Virology*. 2005; 79: 13587–13593. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13587-13593.2005> PMID: 16227279
38. Wang RY, Ghabrial SA. Effect of aphid behavior on efficiency of transmission of Soybean mosaic virus by the soybean-colonizing aphid, *Aphis glycines*. *Plant Disease*. 2002; 86: 1260–1264. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1260> PMID: 30818478
39. Fereres A, Perez P, Gemeno C, Ponz F. Transmission of Spanish Pepper- and Potato-Pvy Isolates by Aphid (Homoptera: Aphididae) Vectors: Epidemiological Implications. *Environmental Entomology*. 1993; 22: 1260–1265. <https://doi.org/10.1093/ee/22.6.1260>
40. Pitt WJ, Kairy L, Villa E, Nalam VJ, Nachappa P. Virus Infection and Host Plant Suitability Affect Feeding Behaviors of Cannabis Aphid (Hemiptera: Aphididae), a Newly Described Vector of Potato Virus Y. *Environmental Entomology*. 2022; nvac001. <https://doi.org/10.1093/ee/nvac001> PMID: 35243512
41. Carmo-Sousa M, Moreno A, Garzo E, Fereres A. A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*. 2014; 186: 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.012> PMID: 24373951

42. Dinant S, Bonnemain J-L, Girousse C, Kehr J. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C R Biol.* 2010; 333: 504–515. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.008> PMID: 20541162
43. Hébrard E, Drucker M, Leclerc D, Hohn T, Uzest M, Froissart R, et al. Biochemical characterization of the helper component of Cauliflower mosaic virus. *J Virol.* 2001; 75: 8538–8546. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8538-8546.2001> PMID: 11507199
44. Forbes AR. The stylets of the green peach aphid, *myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *The Canadian Entomologist.* 1969; 101: 31–41. <https://doi.org/10.4039/Ent10131-1>
45. Nikolai N, Ekaterina T, Evgeniy E, Mikhail K, Joseph A, Olga K. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size. *PLoS ONE.* 2015; 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142415> PMID: 26545232
46. Plisson C, Uzest M, Drucker M, Froissart R, Dumas C, Conway J, et al. Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology.* 2005; 346: 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.052> PMID: 15663943
47. Tjallingii F, Hogen-Esch T. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology.* 1993; 18: 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
48. Blanc S, Cerutti M, Usmany M, Vlak JM, Hull R. Biological Activity of Cauliflower Mosaic Virus Aphid Transmission Factor Expressed in a Heterologous System. *Virology.* 1993; 192: 643–650. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1080> PMID: 8421904
49. Froelich DR, Mullendore DL, Jensen KH, Ross-Elliott TJ, Anstead JA, Thompson GA, et al. Phloem ultrastructure and pressure flow: Sieve-element-occlusion-related agglomerations do not affect translocation. *Plant Cell.* 2011; 23: 4428–4445. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093179> PMID: 22198148
50. Ioannidou ZS, Theodoropoulou MC, Papandreou NC, Willis JH, Hamodrakas SJ. CutProtFam-Pred: Detection and classification of putative structural cuticular proteins from sequence alone, based on profile Hidden Markov Models. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 2014; 52: 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.06.004> PMID: 24978609
51. Forbes AR. Electron microscope evidence for nerves in the mandibular stylets of the green peach aphid. *Nature.* 1966; 212: 726. <https://doi.org/10.1038/212726a0>
52. Deshoux M, Monsion B, Pichon E, Jiménez J, Moreno A, Cayrol B, et al. Role of Acrostyle Cuticular Proteins in the Retention of an Aphid Salivary Effector. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23: 15337. <https://doi.org/10.3390/ijms232315337> PMID: 36499662
53. Wang Z, Lü Q, Zhang L, Zhang M, Chen L, Zou S, et al. Aphid salivary protein Mp1 facilitates infestation by binding phloem protein 2-A1 in Arabidopsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2021; 572: 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.066> PMID: 34364288
54. Will T, Furch ACU, Zimmermann MR. How phloem-feeding insects face the challenge of phloem-located defenses. *Frontiers in Plant Science.* 2013; 4: 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00336> PMID: 24009620
55. Rogers ME, Bates PA. Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 2007; 3: e91. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030091> PMID: 17604451
56. Hinnebusch BJ, Jarrett CO, Bland DM. Molecular and Genetic Mechanisms That Mediate Transmission of *Yersinia pestis* by Fleas. *Biomolecules.* 2021; 11: 210. <https://doi.org/10.3390/biom11020210> PMID: 33546271
57. Bak A, Emerson JB. Cauliflower mosaic virus (CaMV) Biology, Management, and Relevance to GM Plant Detection for Sustainable Organic Agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems.* 2020; 4. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00021>
58. Khelifa M, Massé D, Blanc S, Drucker M. Evaluation of the minimal replication time of Cauliflower mosaic virus in different hosts. *Virology.* 2010; 396: 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.09.032> PMID: 19913268
59. Then C, Bak A, Morisset A, Dáder B, Ducouso M, Macia JL, et al. The N-terminus of the cauliflower mosaic virus aphid transmission protein P2 is involved in transmission body formation and microtubule interaction. *Virus Research.* 2021; 297. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198356> PMID: 33667624
60. Delseny M, Hull R. Isolation and characterization of faithful and altered clones of the genomes of cauliflower mosaic virus isolates Cabb B-JI, CM4-184, and Bari I. *Plasmid.* 1983; 9: 31–41. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(83\)90029-x](https://doi.org/10.1016/0147-619x(83)90029-x) PMID: 6300943
61. Tjallingii WF. Electrical recording of stylet penetration activities. *Aphids, their biology, natural enemies and control.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1988. pp. 95–108.
62. Giordanengo P. EPG-Calc: A PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions.* 2014; 8: 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9298-z>

63. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *PNAS*. 1979; 76: 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350> PMID: 388439
64. Hull R, Shepherd RJ, Harvey JD. Cauliflower mosaic virus: an improved purification procedure and some properties of the virus particles. *Journal of General Virology*. 1976; 31: 93–100. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-31-1-93>

Chapitre 2 : Effets du TuYV sur le
comportement de son vecteur *Myzus*
persicae

Résumé du chapitre 2

CONTEXTE

Un nombre croissant d'études montre que les virus de plantes modifient le comportement de leurs vecteurs de manière favorable à leur transmission. En ce qui concerne le TuYV, plusieurs travaux ont décrit que l'infection altérait des réponses comportementales et physiologiques du puceron vecteur *Myzus persicae* telles que l'orientation, le comportement alimentaire ou les performances. De plus, des modifications de comportement du vecteur suivant l'acquisition du virus (effets post-acquisitions) ont également été mises en évidence pour la dispersion, l'établissement et le comportement alimentaire de *M. persicae* vers/sur de nouveaux hôtes. Cependant, les mécanismes et les déterminants viraux responsables de ces altérations n'ont pas été identifiés.

HYPOTHESE(S) ET OBJECTIF(S)

L'hypothèse de travail est similaire à celle du chapitre précédent. Si les modifications physiologiques ou comportementales du vecteur induites en présence du TuYV sont adaptatives (et non pas des sous-produits de l'infection), cela implique qu'elles soient sous l'influence de déterminants viraux. Sachant que le TuYV est un virus limité aux tissus du phloème et persistant dans son vecteur, on peut proposer deux hypothèses sur les effets « manipulatoires » qu'il devrait induire. Premièrement, il est attendu que le TuYV favorise l'accès aux tissus infectés par les particules virales pour faciliter son acquisition par *M. persicae* (i.e., les tissus du phloème). Deuxièmement, on peut supposer que l'infection améliore la qualité de la plante hôte pour le puceron afin d'augmenter la taille de la population de vecteurs virulifères à moyen/long terme. Les objectifs de ce chapitre sont d'identifier la ou les protéines influençant le comportement alimentaire et les performances de *M. persicae* mais également d'établir le(s) mode(s) d'action de la/les protéines impliquées.

METHODE

Afin d'observer les effets des protéines individuelles du TuYV, nous avons produit des Arabidopsis transgéniques exprimant indépendamment des protéines virales. Nous avons choisi la protéine majeure de la capsid (CP) et la protéine multifonctionnelle « readthrough » (RT) car elles interagissent toutes les deux avec le vecteur et des facteurs de la plante. La protéine suppresseur de silencing P0 a été choisie car elle pourrait moduler les relations plante-insecte en interférant avec les voies de défense de la plante. L'électropénétrographie (EPG) est une technique permettant de suivre en temps réel le déplacement des stylets du puceron dans les tissus de la plante et ainsi d'observer son comportement alimentaire. Elle a été utilisée ici pour comparer le comportement de puceron sur des plantes saines, des plantes infectées ou des plantes exprimant les protéines virales seules. Les performances des pucerons ont été évaluées en comptant le nombre de juvéniles produits sur les différentes plantes tests. Enfin, une étude métabolomique a été conduite sur les plantes saines, infectées, ainsi que les différents mutants, pour identifier les altérations potentiellement responsables des modifications comportementales et/ou physiologiques observées chez le vecteur.

Nous avons confirmé que le TuYV modifiait le comportement alimentaire de son vecteur *Myzus persicae*. Les pucerons placés sur des plantes infectées accèdent plus rapidement aux tissus

du phloème et passent plus de temps à ingérer de la sève en comparaison des pucerons sur des plantes saines. Cette modification du comportement alimentaire est reproduite pour les pucerons s'alimentant sur les plantes transgéniques exprimant la protéine CP. Les pucerons sur les plantes RT ont un comportement strictement similaire aux pucerons sur les plantes saines. Enfin, les pucerons sur les plantes PO ont un comportement intermédiaire entre ceux observés sur plantes saines ou sur plante infectées. La fécondité de *M. persicae* est identique en présence des protéines virales seules, ou de l'infection sauvage d'Arabidopsis en comparaison de celle mesurée sur des plantes saines. Enfin, l'étude métabolomique a montré qu'il était possible de discriminer les plantes des différentes modalités selon leurs métabolomes. Les dérégulations dans les plantes mutantes (CP, RT et PO) en comparaison des plantes saines sont faibles, cependant, quelques métabolites différenciellement accumulés sont communs dans les plantes TuYV et les plantes CP.

Les modifications du comportement alimentaire des pucerons sur les plantes infectées par le TuYV, à savoir un accès facilité au site d'alimentation principal (tissus vasculaires du phloème) et une ingestion de sève augmentée, devraient être favorables à la transmission. En effet, ces deux caractéristiques permettent aux pucerons d'être plus rapidement en contact avec les particules virales du TuYV (restreintes aux tissus du phloème) et augmente la quantité de particules virales transitant dans le corps du puceron, ce qui peut améliorer le phénomène d'internalisation, nécessaire à l'acquisition. Ce comportement est reproduit à l'identique pour les pucerons sur les plantes n'exprimant que la protéine CP, elle semble donc être impliquée dans cette modification du comportement du vecteur. En parallèle, l'analyse métabolomique a mis en évidence quelques composés métaboliques accumulés similairement dans les plantes infectées et dans les plantes CP, qui sont donc de bons candidats concernant l'amélioration de l'alimentation. En ce qui concerne notre deuxième hypothèse, nous n'avons pas observé d'effets du TuYV sur la performance des pucerons, contrairement aux autres études sur ce virus. Une explication serait que les autres travaux utilisaient des plantes hôte du TuYV différentes (Cameline et Claytonia). Les effets manipulateurs semblent donc être plante-hôte dépendant, un paramètre à prendre en compte pour des études futures.

Les points marquants :

- ◆ L'infection d'Arabidopsis par le TuYV facilite l'accès aux tissus infectés et augmente l'ingestion de sève des pucerons *Myzus persicae*, ce qui pourrait favoriser l'acquisition virale.
- ◆ La fécondité de *Myzus persicae* n'est pas influencée par le TuYV lorsqu'elle est étudiée sur Arabidopsis infectée.
- ◆ Les effets du virus sur le comportement alimentaire de *Myzus persicae* peuvent être entièrement reproduits en n'exprimant que la protéine de la capsid du virus (CP).
- ◆ Les dérégulations du métabolome des plantes infectées et des plantes mutantes corrélerent avec les effets comportementaux. Cependant l'identification des composés potentiellement impliqués dans la manipulation sont nécessaires.

Article 3: The turnip yellows virus capsid protein promotes access of its aphid vector to phloem tissues

Authors:

Maxime Verdier^a, Sylvaine Boissinot^{a#}, Raymonde Baltenweck^a, Véronique Brault^a, Véronique Ziegler-Graff, Philippe Hugueney^a, Quentin Chesnais^{a*}, Martin Drucker^{a*}

^a SVQV UMR 1131 INRAE Centre Grand Est – Colmar, Université de Strasbourg, 68000 Colmar, France

^b Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

[#] Present affiliation: UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie INRAE, Université de Bordeaux, 33882 Villenave d'Ornon, France

* Corresponding authors: Martin Drucker, Quentin Chesnais

Email: martin.drucker@inrae.fr; quentin.chesnais@inrae.fr

Abstract

Many plant viruses modify the phenotype of their hosts, which may influence the behavior of their vectors and facilitate transmission. Among them is turnip yellows virus (TuYV) that can modify the orientation, feeding, and performance of its aphid vector, *Myzus persicae*. However, the virus factors driving these mechanisms have not been elucidated. In this study, we compared feeding behavior and fecundity of aphids on TuYV-infected and transgenic *Arabidopsis thaliana* expressing individual TuYV proteins (CP, RT, and P0) to define a role of these proteins in aphid-plant interactions. Aphids on TuYV-infected plants had shorter pathway phases and ingested phloem sap for longer times, which is expected to be favorable for the acquisition of phloem-limited viruses such as TuYV. No change in aphid fecundity was observed on TuYV-infected plants. The transmission-conducive feeding behavior changes could be fully reproduced by phloem-specific expression of the capsid protein (CP) in transgenic plants, whereas vascular expression of P0 had only minor and RT no effects on aphid feeding behavior. We then carried out a metabolomic analysis to determine plant compounds that could be involved in the modification of the aphid behavior. A few metabolites were specific for TuYV-infected or CP-transgenic *A. thaliana*. These molecules are good candidates for inducing behavior changes, however, their identification is still pending.

Introduction

Vector-borne plant pathogens, such as viruses, and their vectors, mostly insects, have coevolved complex relationships (Eigenbrode et al., 2018; Perilla-Henao & Casteel, 2016; Ray & Casteel, 2022). On one hand, viruses are in competition with their vectors because they share the same host plants (and their resources) for reproduction (Basu et al., 2021; Stout et al., 2006). On the other hand, the vast majority of plant viruses (> 75%) rely on insect vectors mostly in the *Hemiptera* order, such as aphids, and whiteflies, to be transmitted over one host to another and to cross physical barriers such as the cuticle and cell walls to be directly inoculated into a plant cell (Bragard et al., 2013; Hogenhout et al., 2008). Based on their

interaction with their vectors, plant viruses have been classified into two categories (Stéphane Blanc et al., 2014a). Non-circulative viruses bind extracellularly to the insect cuticle in the foregut or stylets of their vector (Ng & Falk, 2006; Zhou et al., 2018). Circulative viruses are internalized into vector cells and cross the intestine and the salivary gland cells successively before being released into another plant as a saliva component (Gray et al., 2014; Gray & Gildow, 2003). The internalization of circulative virions in the insect body results in long-term persistence of the virions in the vector (generally the whole vector life) while the superficial interactions between non-circulative viruses and the vector mouthparts lead to a short retention time (minutes to hours).

Several studies demonstrated that plant viruses affect host-vector interactions in ways that are conducive to their transmission (reviewed in Eigenbrode et al., 2018; Mauck et al., 2012; 2018). Some evidence suggest that viruses can alter the vector behavior directly, i.e., a viral component interacts with a vector component (Ingwell et al., 2012; Stafford et al., 2011; Verdier et al., 2023) or indirectly, by altering the plant host phenotype such as color, volatile organic compounds (VOC), or primary and secondary metabolites that then have an impact on plant-vector interactions (Fereses & Moreno, 2009; Mauck et al., 2016). Nearly all plant virus infections tend to increase vector preference towards infected plants, regardless of the transmission mechanism (Mauck et al., 2012; 2018). In a few cases, the viral protein affecting vector attraction has been identified. An example is the NIa-Pro protein of turnip mosaic virus (TuMV, genus *Potyvirus*) which induces an increase in plant ethylene production (Bak et al., 2019). In contrast to generalized attraction of vectors to virus-infected plants, the virus-induced changes in plant palatability, influencing the vector feeding and settling behaviors (and consequently virus acquisition/inoculation), differ depending on the virus biology (i.e., viral tissue tropism and/or virus's persistence in the vector). Non-circulative viruses, also referred to as non-persistent viruses, are acquired and inoculated during brief intracellular punctures of the vector in the epidermal and mesophyll cells. They tend to reduce host plant palatability and encourage fast vector dispersal following virion acquisition, because these viruses are usually detached easily from the mouthparts when the vector engages sustained phloem sap ingestion phase. This is exemplified in the case of plants infected with potato virus Y (PVY, genus *Potyvirus*) and cucumber mosaic virus (CMV, genus *Cucumovirus*), on which aphids show increased numbers of short superficial probes and also for CMV, the number of intracellular punctures during the first few minutes of aphid probing (Boquel et al., 2011; Michele Carmo-Sousa et al., 2014). In contrast, circulative-persistent viruses, that are acquired by the vectors after sustained periods of phloem sap ingestion, tend to increase host-plant palatability and to facilitate access to vascular tissues containing virus particles. These behavioral effects, together with the increased host quality, are expected to enhance viruliferous vector population and virus dispersion. These effects have been documented in particular for aphids feeding on diverse crop plants (Poaceae, Brassicaceae, Solanaceae...) infected with members of the *Solemoviridae* virus family (Bosque-Pérez & Eigenbrode, 2011; Mauck & Chesnais, 2020a). However, to date, we are only beginning to understand how viruses control hosts phenotypes and vector behaviors (Mauck et al., 2019; Patton et al., 2020; Ziegler-Graff, 2020).

Turnip yellows virus (TuYV, genus *Polerovirus*, family *Solemoviridae*) is a circulative and phloem-limited virus, transmitted by at least twenty aphid species including the green peach aphid, *Myzus persicae*, which is its most efficient vector (Schliephake et al., 2000). This virus forms icosahedral particles enclosing a single-stranded RNA genome. Several studies have shown that TuYV infection alters some behavioral and

physiological responses of aphid vectors, such as their orientation and settling preferences, feeding behavior and fecundity (Bogaert et al., 2020; Chesnais, Couty, et al., 2019; Claudel et al., 2018), in ways that are conducive to transmission. The effects of TuYV on host phenotypes and aphid behaviors are plant and aphid species-specific (Chesnais, Couty, et al., 2019; Chesnais, Mauck, et al., 2019; Claudel et al., 2018). In addition, TuYV infection causes post-acquisition effects and virus-carrying aphids show altered dispersion, settling, and feeding behaviors after departure from the infected plant (Chesnais et al., 2020).

To date, no study has elucidated the molecular mechanisms explaining the TuYV effects on its aphid vector. We were interested to know which viral factors are involved in changing aphid-plant interactions. To address this question, we used transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing TuYV proteins and studied aphid feeding behavior and fecundity on them. We chose three TuYV proteins, P3, RT and P0. P3 is the major coat protein (CP) forming icosahedral virions (Boissinot et al., 2020). Capsid formation is a prerequisite for virus systemic movement and is required for aphid transmission (Brault et al., 2003; Hipper et al., 2014). The RT “read-through” protein is synthesized by a readthrough mechanism of the CP stop codon and the fusion protein contains the CP at its N-terminus. A C-terminally truncated form of the RT protein is incorporated into the virus particles as a minor component. The RT protein is dispensable for capsid formation but is involved in symptom development, virus movement and it is necessary for aphid transmission, in particular by allowing the internalization of virions in the intestine (Brault et al., 1995; van den Heuvel et al., 1997). The C-terminal part of the RT protein is also involved in phloem tropism of PLRV (Peter et al., 2009). Besides CP and RT that are both relevant for transmission, we also chose P0, a multifunctional protein, mainly studied for its involvement in the suppression of RNA silencing by inducing the degradation of the argonaute protein AGO1 (Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007; Pfeffer et al., 2002). In this function, P0 might modulate aphid-plant interactions by interfering with plant defenses.

Results

Characterization of transgenic plants expression TuYV proteins

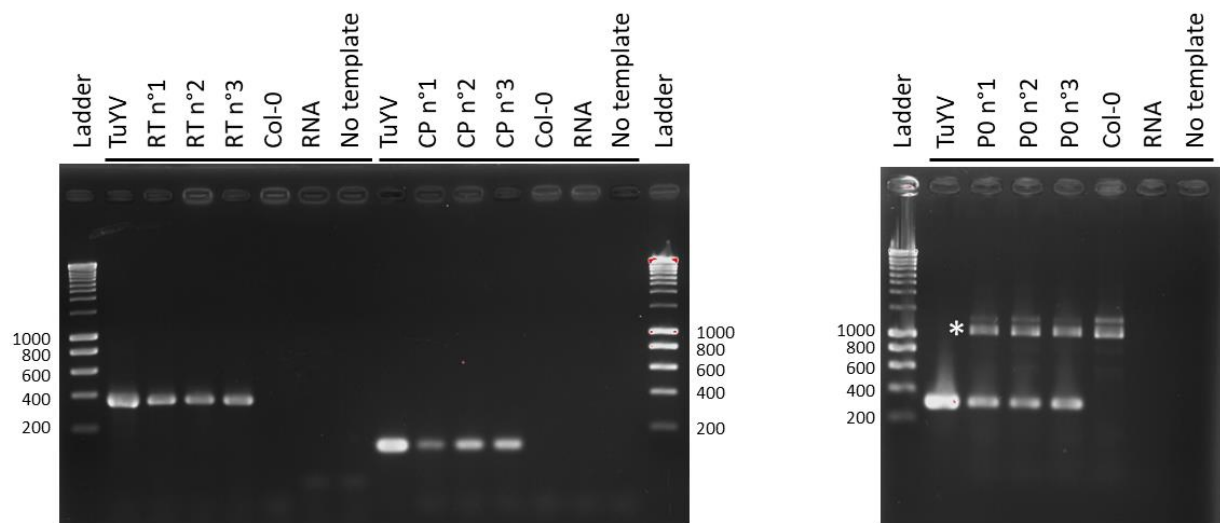


Figure 1. Detection of TuYV RT, CP and PO transcripts in transgenic Arabidopsis plants by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). In each lane, RT-PCR products from a different plant were loaded. The primers used for RT-PCR were specific for the viral sequences inserted in Arabidopsis Col-0 genome (Table S1) and are predicted to prime the amplification of 360, 140 and 301 bp products for RT-, CP- and PO-transgenic plants, respectively. A RT-PCR reaction with viral RNA from a TuYV-infected plant was performed as a positive control (“TuYV”). Lanes named Col-0, RNA and No template were negative controls corresponding to the RT-PCR product of RNA extracted from non-infected Col-0 (“Col-0”), the PCR product of the same RNA omitting the reverse transcription step (“RNA”), and the PCR product without the cDNA matrix (“No template”). *: aspecific amplification product at about 1000 bp.

To see whether individual TuYV proteins had an effect on aphid feeding, we obtained transgenic Arabidopsis plants expressing CP, PO and RT under control of the phloem-specific promoter SUC2 from *A. thaliana*. We first confirmed expression of TuYV-CP, -PO and -RT in the transgenic Arabidopsis lines by RT-PCR (Figure 1). Each transgenic plant accumulated the expected transgene-mRNAs at similar levels. Transgene-mRNAs accumulated to lower levels than viral RNA in TuYV-infected plants (compare TuYV line with the bands corresponding to the transgenic plants; Figure 1). We observed an aspecific band with a size of about 1000 bp in PO-transgenic plants (indicated with an asterisk), however, this did not alter the detection of the PO-specific amplicon with a size of 301 bp. The absence of this aspecific band in TuYV-infected plants may be explained by the presence of more abundant matrix available for reaction, limiting aspecific hybridization. The transgenic plants did not display any abnormal phenotype, while TuYV-infected Arabidopsis were smaller and two to three weeks post-inoculation the lower face of the older leaves turned purple (probably due to anthocyanin accumulation) as already reported before (Claudel et al., 2018).

Modification of aphid feeding behavior induced by TuYV infection can be mimicked by CP expression

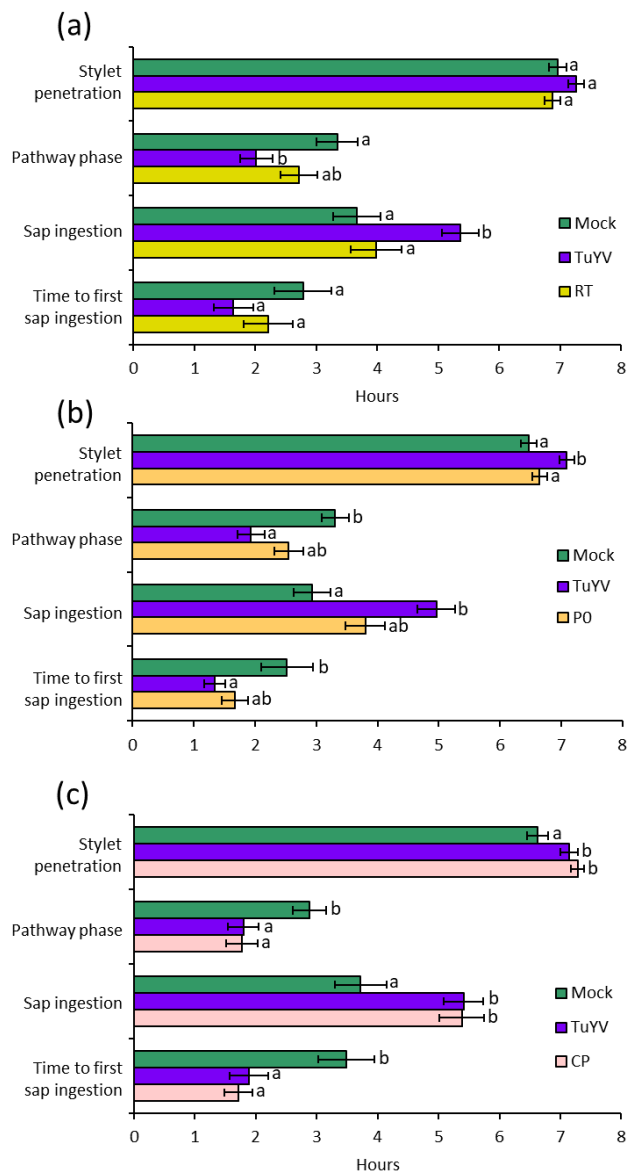


Figure 2. Feeding behavior of *Myzus persicae* on mock-inoculated, TuYV-infected or transgenic Arabidopsis plants expressing (a) RT, (b) P0 and (c) CP proteins. The behavior of individual aphids was recorded by electrical penetration graph (EPG) for 8 hours. The selected EPG parameters present the total duration of each phase. Different letters show significant differences as tested by GLM (generalized linear model) followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). Each mutant was tested individually with $N = 24-26$ (RT), $N = 29-31$ (P0) and $N = 29-32$ (CP).

To address the effect of the viral sequences expression in the transgenic plants on aphid feeding behavior we conducted electrical penetration graph (EPG) experiments with aphids deposited on the transgenic plants. We did not test the P0, RT and CP transgenic plants together in a single experiment, but studied each transgenic plant independently. TuYV-infected and mock-inoculated plants were included as controls. On RT-transgenic Arabidopsis plants, the total duration of stylet penetration and the time to first phloem sap ingestion were neither affected on TuYV-infected nor on RT-transgenic Arabidopsis (GLM, Df

= 2, $\chi^2 = 3.568$, $p = 0.168$ and Cox, Df = 2, $\chi^2 = 2.883$ $p = 0.237$, respectively) (Figure 1a). The duration of pathway phase was significantly shorter on TuYV-infected compared to mock-inoculated Arabidopsis (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 8.652$, $p = 0.013$) and conversely, the duration of phloem sap ingestion was longer on TuYV-infected compared to mock-inoculated Arabidopsis (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 9.152$, $p = 0.010$) (Figure 1a). Since these effects were not observed on RT-transgenic plants, we concluded that aphids behaved similarly on RT-transgenic plants and on mock-inoculated Arabidopsis, discarding a potential impact of the RT alone on aphid feeding behavior.

In the second set of EPG experiments, comparing the effect of P0 against TuYV-infected and mock-inoculated wild type Arabidopsis, we observed the same aphid behavioral changes caused by TuYV infection as in the first set of experiments, notably the significant reduction of pathway phase duration (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 17.021$, $p < 0.001$) and the increase of sap ingestion duration (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 18.434$, $p < 0.001$) (Figure 1b). Moreover, aphids on TuYV-infected plants required shorter pathway phases to reach phloem tissues than aphids on mock-inoculated plants (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 8.040$, $p = 0.018$), and spent more time in total stylet penetration (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 13.601$, $p = 0.001$). For all selected parameters, with the exception of stylet penetration, aphids on P0-transgenic plants showed intermediate feeding behaviour, compared to those on mock-inoculated and those on TuYV-infected plants, without statistically significant differences between the two conditions (Figure 1b).

In the third set of EPG experiments, we tested CP-transgenic plants. Aphids on CP-transgenic plants exhibited the same behavior than aphids on TuYV-infected plants. They spent more time in stylet insertion and ingesting sap from the phloem tissues, compared to mock-inoculated Arabidopsis (GLM, Df = 2, $\chi^2 = 11.523$, $p = 0.003$; $\chi^2 = 12.38$, $p = 0.002$) (Figure 1c). Conversely, the duration of pathway phases and the time needed for reach the phloem tissue were significantly reduced for aphids on TuYV-infected or CP-transgenic, compared to mock-inoculated plants (GLM, Cox, Df = 2, $\chi^2 = 9.780$, $p = 0.007$; $\chi^2 = 12.983$, $p = 0.002$) (Figure 1c). Thus, the presence of CP alone was sufficient to reproduce the feeding behavior modifications induced by TuYV infection.

TuYV infection or viral protein expression in Arabidopsis has no influence on aphid fecundity

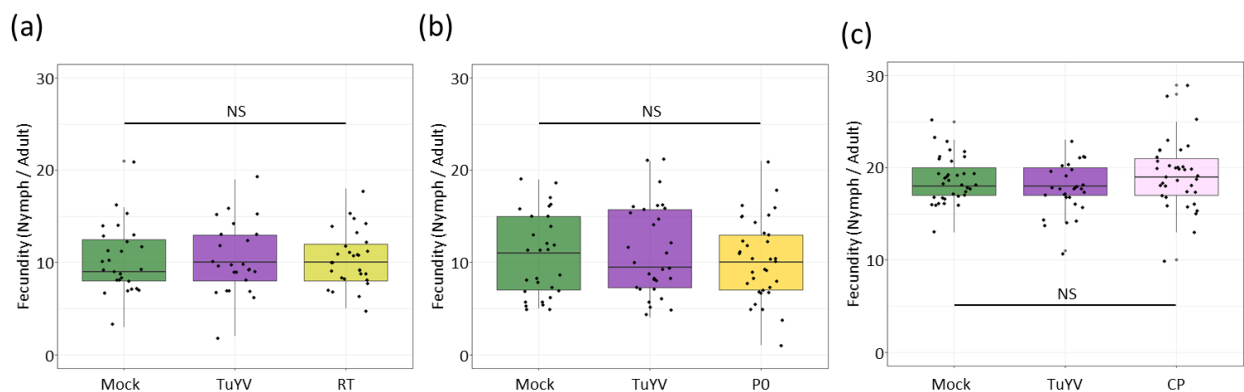


Figure 3. Fecundity of *Myzus persicae* on mock-inoculated, TuYV-infected, or transgenic Arabidopsis plants expressing (a) RT, (b) P0 and (c) CP proteins. One synchronized adult aphid was placed on an individual plant and all newborns were counted after 5 days of infestation. Positive and negative controls (aphid fecundity on TuYV-infected or mock-inoculated Col-0 plants) were run

for all comparisons. Analysis by GLMM (generalized linear mixed model) revealed no statistically significant differences; NS: $p > 0.05$. $N = 25-29$ for RT, $N = 29-35$ for P0 and $N = 29-37$ for CP.

Since aphids reached the phloem faster and spent more time ingesting phloem sap on TuYV-infected and CP-transgenic plants (Figure 1), we hypothesized that aphid performance could also be positively impacted by TuYV infection because phloem sap is the main food source for aphids. Therefore, we evaluated aphid fecundity on TuYV-infected, mock-inoculated, and CP-, P0- and RT-transgenic plants by counting the number of offspring produced by synchronized adults after 5 days of infestation. No statistical differences were observed in the three data sets (Figure 3). On RT- or P0-transgenic plants (Figure 3a-b), the average fecundity was 10 nymphs, regardless of the condition (i.e., 2 juveniles per adult per day) (GLMM, $Df = 2$, $\chi^2 = 2.423$, $p = 0.298$ and $\chi^2 = 2.255$, $p = 0.880$, respectively). In the third set of experiments (Figure 3c), the average fecundity was about 18 nymphs in 5 days, which was almost twice more than in the other two sets of experiments (Figure 3a and b). However, the number of newborns remained unchanged on TuYV-infected plants compared to CP-transgenic plants or mock-inoculated plants (GLMM, $Df = 2$, $\chi^2 = 4.760$, $p = 0.093$).

Aphid feeding behavior on TuYV-infected and CP-transgenic plants correlates with accumulation of specific plant metabolites

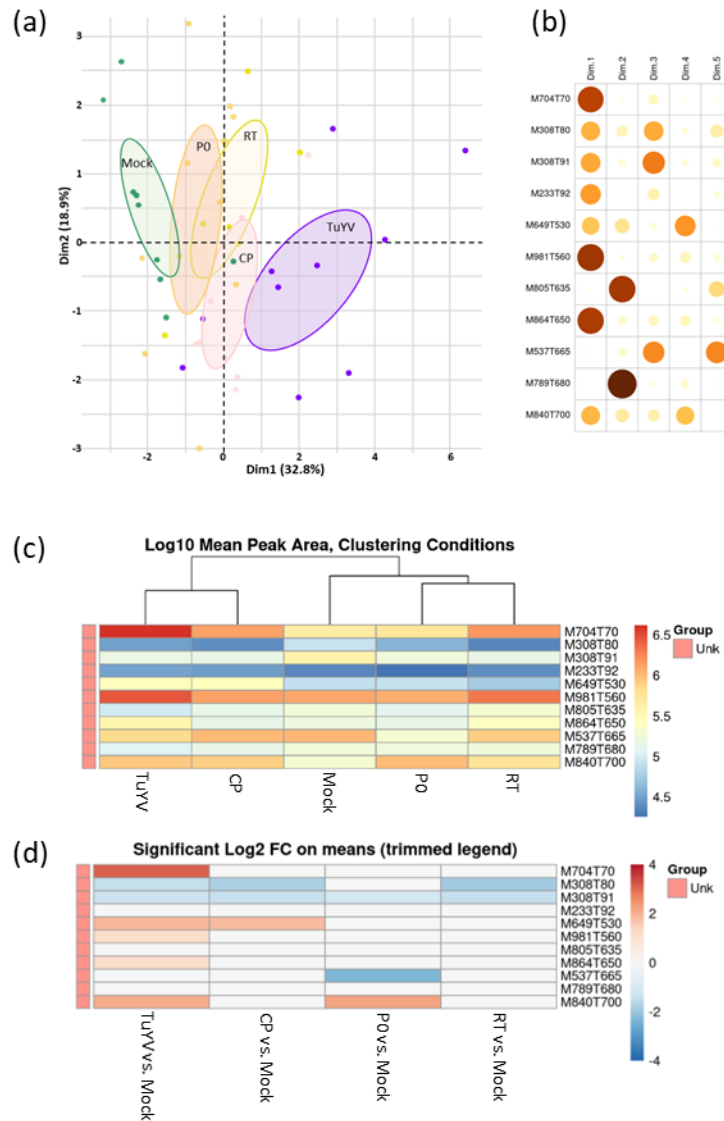


Figure 4. Metabolomic analysis of mock-inoculated, TuYV-infected, RT-, PO and CP-transgenic plants. (a) Principal component analysis (PCA) of selected metabolites (i.e., differentially accumulated in TuYV-infected and at least one of the transgenic Arabidopsis compared to mock-inoculated Arabidopsis plants) using the first two dimensions. (b) Representativeness of the different metabolites in the five dimensions of the principal components. The implication of each metabolite is proportional to the circle size and the color intensity. (c) Heatmap of metabolite mean Peak Area in Arabidopsis plants. Gradient from blue to red colors indicates increasing accumulation of the metabolites. (d) Heatmap of metabolite fold changes in Arabidopsis plants compared to mock-inoculated plants. Red and blue colors indicate significant up- and down-regulation, respectively, presented as Log₂ fold changes. Pairwise comparisons were performed using Tukey's Honest Significant Difference method followed by a false discovery rate (FDR) correction, with FDR < 0.05. For FDR ≥ 0.05, Log₂ fold changes were set to 0. Five-week-old plants were analyzed which corresponds to three weeks post-inoculation. Mock-inoculated (M); CP-transgenic plants (CP); RT-transgenic plants (RT), PO-transgenic plants (PO); or TuYV- infected (TuYV); Dim: principal component, N = 9-10.

We then analyzed whether the aphid feeding behavior observed on the CP-expressing transgenic plants could be attributed to specific metabolites composition. To test this, a metabolic analysis was performed on mock-inoculated, TuYV-infected, and the three transgenic Arabidopsis lines expressing TuYV-CP, -RT or -P0 in conditions similar to those used for aphid behavior and performance experiments. Segregation of the different conditions in the principal component analysis (PCA) was attributed to eleven unknown metabolites (Figure 4a & b). The metabolites corresponded to compounds differentially accumulated in TuYV-infected plants and in at least one of the mutants compared to mock-inoculated plants and named MxxxTxxx. The first two dimensions of the PCA on plant metabolites (Figure 4a) clearly separated mock-inoculated from TuYV-infected plants. Metabolite profiles of Transgenic Arabidopsis positioned in-between mock and TuYV-infected plants, with CP-transgenic plants being more closely related to TuYV-infected ones, and P0-transgenic plants being closer to mock-inoculated plants. This separation of plant metabolite profiles reflected the results from the EPG experiments, where feeding behavior of aphids on TuYV-infected Arabidopsis and on CP-transgenic plants was very similar and different from the other conditions (i.e., feeding behaviors on P0- or RT-transgenic plants and mock-inoculated wild type Arabidopsis). The metabolites responsible for the grouping on the first dimension (separation of mock-inoculated from TuYV-infected and CP-transgenic Arabidopsis plants) are M704T70, M981T560 and M864T650 (Figure 4b), while M805T635 and M789T680 are responsible for clusterisation on the second dimension. Heatmap of metabolite mean Peak Area show that RT- and P0-transgenic plants cluster together while TuYV-infected plants and CP-transgenic plants cluster also together but are distant from other modalities (Figure 4c). Heatmap analysis of the log-fold changes showed the metabolites that were specifically deregulated in the different conditions analyzed. Interestingly, metabolite M649T530 was the only compound specifically over-accumulated in TuYV-infected and CP-transgenic plants, which suggested that it could be implicated in the specific feeding behavior observed on TuYV-infected and CP-transgenic plants (Figure 4d). Accumulation of M840T700 was induced in TuYV-infected and P0-transgenic plants, whereas no specific metabolites were shared by TuYV-infected and RT-transgenic plants (Figure 4d). M308T80 and M308T91 were down-regulated in TuYV-infected and RT-transgenic plants but also in CP-transgenic Arabidopsis. Last, 537T665 was only down-accumulated in P0-transgenics plants (Figure 4d).

Discussion

In our study, we addressed the role of individual proteins of the phloem-limited TuYV in the feeding behavior of its main vector, *M. persicae*, and consequently in virus acquisition.

We first compared our results obtained here on changes in aphid feeding behavior by TuYV infection with our previous results (Chesnais et al., 2022). In both works, aphids on TuYV-infected plants found the phloem faster and spent more time ingesting phloem sap (Figure 2). These changes in behavior are crucial because they could confer a benefit for TuYV, by increasing virus acquisition time and, with it, insect transmission. Previous studies have also shown that TuYV infection alters behavioral responses of *M. persicae*, such as the settling preferences and the feeding behavior (Bogaert et al., 2020; Chesnais, Couty, et al., 2019), in ways that are conducive to transmission. These effects on host phenotypes and aphid behaviors are plant and aphid species-specific (Chesnais, Mauck, et al., 2019; Claudel et al., 2018) and plant palatability is sometimes unrelated to plant quality as already observed for *M. persicae* on CaMV-infected Arabidopsis (Chesnais et al., 2021).

Very interestingly, the aphid feeding behavior modifications observed on TuYV-infected plants were also observed on Arabidopsis plants constitutively expressing TuYV CP in the vascular tissue, whereas aphids on transgenic RT plants displayed no changes and aphids on transgenic P0 plants only minor behavior changes. This indicates that CP might play a major role in modifying aphid feeding. A few proteins or components of other plant viruses have already been shown to alter the behavior of vectors but their precise mode of action has not always been unveiled. For example, the CMV 2b protein, which is required for sustained phloem sap ingestion by aphids was reported to inhibit JA signaling by directly interacting with, and repressing, JA-induced degradation of host jasmonate ZIM-domain proteins (Ziebell et al. 2011; Wu et al. 2017). CMV 2b also interplayed with 1a and 2a proteins to induce antixenosis which promotes transmission (Westwood et al., 2013, 2014). We also recently demonstrated that the P6-TAV protein of CaMV (specifically the N-terminal domain), which is responsible for dampening plant defenses and for symptom expression, improves aphid feeding (Chesnais, Verdier, et al., 2021). These former examples concerned non-circulative viruses but a few proteins or components affecting vector behavior of other circulative non-propagative viruses have been characterized as well. The tomato yellow leaf curl virus (TYLCV, genus *Begomovirus*) C2 protein has been shown to be responsible for the suppression of plant defenses and to contribute to the virus–vector mutualism (Li et al., 2019). The TYLCV C4 protein interacts with RCC1-like domain-containing (RLD) proteins of host plant, resulting in an attraction of the whitefly vector to them (Gao et al. 2022). The β C1 of the begomovirus tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV), expressed from the TYLCCNV β satellite, repressed JA responses and improved whitefly performances on infected plants (Zhang et al., 2012).

For potato leaf roll virus (PLRV), a virus closely related to TuYV, Patton et al. (2020) demonstrated that three of its seven proteins, P0, P1 and P7, when transiently expressed in *N. benthamiana*, altered vector settling and fecundity. In our study, we found no effect of TuYV infection or TuYV proteins P0, CP and RT on fecundity (we did not test P1); settling was not tested. The discrepancy in the results might be explained by the different experimental approaches. Patton and coworkers used transient expression under the constitutive 35S promoter in agro-infiltrated leaves, whereas we used transgenic plants and phloem-specific expression, a situation that resembles natural infection conditions, since TuYV replicates and moves only in the phloem. The differences in protein expression levels and tissue distribution, but also the differences in the viral protein sequences, may account for the discrepancies between the two studies.

How could TuYV CP, and to a minor extent P0, affect the vector behavior? DeBlasio et al. (2016a, b) used proteomic approaches to identify interactions between PLRV particles and the host plant. They identified 65 proteins with high confidence scores (indicating stable interactions) and over a hundred other proteins with medium confidence scores (indicating transient interactions) co-purifying with PLRV. Many localized to ribosomes and nucleus and nucleolus, but also to plasmodesmata, the cytosol and plastids (DeBlasio et al., 2016). Their assumed functions include membrane transport, translation, signaling and mRNA processing, but also functions in metabolism. Since TuYV and PLRV are closely related, TuYV CP might interact with similar host proteins like PLRV CP. While interactions with ribosomes are probably related to virus replication, the other interactions are not and might induce directly (by CP interacting with metabolic enzymes and transporters) or indirectly the observed metabolic changes that subsequently affect aphid feeding behavior. CP could exercise these functions in the cytosol and in the nucleus because

it is found in both cell compartments (Haupt et al., 2005). One of the CP interaction partners with a very high confidence score and candidate for indirect interaction was the WD40 domain protein RBV which is involved in miRNA biogenesis and in loading miRNAs into AGO1 (Liang et al., 2022). The argonaute protein AGO1 itself was also a CP-interacting protein with a high confidence score. AGO1 is not only involved in cytoplasmic siRNA silencing, but also in nuclear transcription regulation and miRNA processing (Bajczyk et al., 2019). It is therefore possible that the nuclear localization of TuYV-CP and its interaction with RBV and AGO1 might induce host modifications by transcriptional reprogramming that change plant traits and modulate the aphid behavior. Transcriptional reprogramming and alteration of transporter activities could have effects beyond the phloem tissue, explaining why also aphid feeding activities outside the phloem were affected in infected and CP-expressing plants.

Curiously, AGO1 is also a target of TuYV P0, which acts, when ectopically expressed, as a silencing suppressor by inducing degradation of AGO1 (Bortolamiol et al., 2007). However, P0 might have other functions in an authentic TuYV infection, where vascular AGO1 is stabilized (Clavel et al., 2021). Phloem-specific expression of P0 as in this report had only a slight effect on aphid behavior. Whether P0-AGO1 interaction is involved in it and whether these interactions and their outcome are the same in TuYV-infected plants, where also CP interacts with AGO1, remains to be determined.

As indicated above, we hypothesize that TuYV effects on aphids could be CP-induced plant deregulations that spread from the phloem to other tissues. We indeed observed in whole leaves a specific metabolite profile of CP-transgenic plants that resembles that of TuYV-infected plants. One component (M649T530 (C30H50O15)), not yet identified, was shown to over-accumulate only in CP-transgenic and TuYV-infected plants. This metabolite is therefore a good candidate to explain the modified aphid feeding behavior. We did not observe any modification of the metabolic profile of hormones (JA or SA pathways) or glucosinolates in TuYV-infected or CP-transgenic plants. Also Patton and coworkers (2020) did not observe changes in JA, SA and ethylene in PLRV-infected plants. However, aphid-induced activation of JA, SA and ethylene was suppressed in PLRV-infected plants and P0, P1 and P7 contributed to it. Which TuYV proteins play a role in suppression of aphid-induced defense reactions, remains to be determined. Finally, another compound, M840T700 is also of interest as it is upregulated in P0-transgenic *Arabidopsis* as well as in TuYV-infected plants and could be responsible for the intermediate effect of P0 on aphid feeding behavior. Identification and characterization of these metabolites might shed more light on their role in plant aphid interactions.

In conclusion, this study represents the first example showing that phloem expression of a single protein of a circulative virus induces host-plant metabolic changes correlating with transmission-favorable alteration of its aphid vector's feeding behavior.

Materials and methods

Plant growth and virus inoculation

Arabidopsis thaliana (referred elsewhere as *Arabidopsis*) Col-0 seeds were germinated in TS 3 fine substrate (Klasmann-Deilmann, Geeste, Germany) in pots (70 mm x 70 mm x 65 mm) and grown at 20 ± 1°C with an 8 h light / 16 h dark photoperiod. Two-week-old plants were inoculated with 3-5 wingless

Myzus persicae aphids that had been allowed a 24 h acquisition access period on TuYV-infected Arabidopsis or healthy Arabidopsis. After a 24 h inoculation period, aphids were manually removed using a brush. The studies were conducted on 5-week-old plants (i.e., three weeks after TuYV inoculation).

Aphid rearing

The *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: *Aphididae*) clone was originally isolated in the Netherlands. Aphids were reared on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *pekinensis* var. "Granaat") in a growth chamber at 20 ± 1 °C and a 14/10 h light/dark photoperiod. For synchronization, adults were placed on detached Chinese cabbage leaves that were laid on 1 % agarose in a Petri dish. The adults were removed 24 h later and the newborn larvae were used in experiments 8 days later.

Transgenic lines

All transgenic lines expressed the viral protein (wild-type CP and RT, N-terminally myc-tagged P0) under control of the AtSUC2 promoter (Truernit & Sauer, 1995) for phloem-specific expression. The viral sequences were inserted by restriction enzyme-mediated ligation of PCR fragments into the binary plasmid pbin-Suc (Stadler et al., 2004). Arabidopsis Col-0 plants were transformed using the floral dip method (Clough & Bent, 1998), and transgenic plants were selected by kanamycine selection.

Floral dip method was used to transform *A. thaliana* Col-0 and produce the stable homozygous CP-transgenic lines (Clough & Bent, 1998). *Agrobacterium tumefaciens* (strain C58C1 (Holsters et al., 1980)) carrying the recombinant helper plasmid pLX-suc-CP were grown in 50 ml of LB media to an $OD_{600} = 1.5$. Pellet of bacteria was suspended in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with acetosyringone (200 μ m), saccharose (5 %) and Silwet L-77 (250mg/ml) to an $OD_{600} = 0.8$. Transgenic seeds were selected on agar plates (0.5 MS medium supplemented with 50 μ g/mL kanamycin). F2 seedlings with 3:1 alive/dead segregation (evidence of single insertion) were taken forward to the F3 stage by self-fertilization. Seeds from F3 with 100% survival ratio (homozygous) were selected.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted from 100 mg of fresh plant samples ground in liquid nitrogen. Extraction was performed using "NucleoSpin RNA Plant Kit" (Macherey-Nagel, Hœrdt, France) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified at 260 nm with the Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WI, USA). First-strand cDNA was synthesized from 1 μ g of RNA using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, with the relevant reverse primers (Supplementary Tables 1). Thirty μ l of Milli-Q water was added to the resulting cDNA and 4 μ l of this mix was used for the PCR. The PCR reactions were carried out in a total volume of 25 μ l [5 μ l of 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega), 2.5 μ l 10 mM forward and reverse appropriate primers, 0.5 μ l 10 mM dNTPs (2.5 mM each), 0.2 μ l (5 U/ μ l) GoTaq DNA Polymerase (Promega), and Milli-Q water to adjust the volume]. The reaction mixture was denatured at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 20 sec at 95 °C, 20 sec at 53 °C and 1 min at 72 °C, and a final cycle at 72 °C for 2 min. Eight microliters of the DNA product were run on a 1% agarose gel and amplicons were visualized with ethidium bromide under UV light.

Aphid feeding behavior

The electrical penetration graph DC-system (EPG) was used as described by (Tjallingii, 1988). A tiny gold wire electrode (12.5 μ m diameter and 2 cm length) was tethered to the dorsum of an adult apterous aphid with water-based silver glue to integrate one aphid and one plant into an electrical circuit. Eight aphids were connected to the Giga-8 DC-EPG amplifier (EPG Systems, Wageningen, Netherlands) and each was deposited on an Arabidopsis leaf of the same developmental stage. A second copper rod electrode was inserted into the soil of each potted plant to close the electrical circuit. The recordings were performed continuously for 8 h within the photophase inside a Faraday cage at 21 ± 1 °C. The EPG waveforms were acquired and analyzed with PROBE 3.5 software (EPG Systems). Based on TuYV characteristics (circulative and phloem limited), relevant aphid behaviour EPG parameters were calculated with EPG- Calc 6.1 software (Giordanengo, 2014) and were based on different EPG waveforms described by Tjallingii and Hogen Esch (1993). The parameters displayed in this study are as follows: the total duration of “stylet penetration”, “pathway phase”, and “sap ingestion” and the time needed by the aphid to reach the phloem. For each condition, EPGs of 24– 32 individual aphids were analyzed. Aphids that generated signals for less than 5 hours (total duration of probing time) were excluded from the analysis.

Fecundity

Synchronized wingless adults (8 ± 1 days old) were randomly selected from the aphid pools and transferred onto Arabidopsis plants (one aphid per plant) to study adult fecundity. The number of nymphs produced was recorded after 5 days. Adult aphids that died before day 5 were excluded from the analysis. Experiments on P0 and RT mutants were repeated three times. The total number of aphids per condition was 25 – 35. Experiments on CP mutants were repeated twice, with a total of 29 – 37 aphids per condition.

Metabolomic analysis

Lyophilized Arabidopsis leaf samples were ground using a bead mill (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Germany). Ten mg of leaf powder were extracted with 500 μ L of methanol supplemented with 5 μ g/mL of chloramphenicol as an internal standard. The homogenate was sonicated in an ultrasonic bath (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) for 10 min, then centrifuged at 12 000 rpm for 10 min. 200 μ L of the supernatants were recovered for LCMS analyses. Analyses were performed using a Vanquish Flex binary UHPLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA). Chromatographic separations were performed on a Nucleodur C18 HTec column (150 \times 2 mm, 1.8 μ m particle size; Macherey-Nagel, Duren, Germany) maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v) (eluant A), and water/formic acid (0.1%, v/v) (eluant B), at a flow rate of 0.25 mL/min. The gradient elution program was as follows: 0 to 4 min, 80% to 70% B; 4 to 5 min, 70% to 50% B; 5 to 6.5 min, 50% B isocratic; 6.5 to 8.5 min, 0% B; and 8.5 to 10 min, 0% B isocratic. The injected volume of samples was 1 μ L. The liquid chromatography system was coupled to an Exploris 120 Q-Orbitrap MS system (Thermo Scientific, Waltham, MA). The mass spectrometer was operated with a heated electrospray ionization source in positive and negative ion modes. The key parameters were as follows: spray voltage, + 3.5 and –3.5 kV; nitrogen sheath gas flow rate, 40 arbitrary units (arb. unit); auxiliary-gas flow rate, 10 arb. unit; sweep-gas flow rate, 1 arb. unit; capillary temperature, 360°C and auxiliary-gas-heater temperature, 300 °C. The scan modes were full MS with a resolution of 60 000 FWHM (at m/z 200) and the scan range was m/z 85–1200. Internal mass calibration was operated using EASY-IC internal calibration source allowing single

mass calibration for full mass range. Data acquisition and processing were carried out with Xcalibur 4.5 and Free Style 1.7 (Thermo Scientific, Waltham, MA), respectively.

UHPLC-HRMS raw data were processed using the Compound Discoverer 3.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Data processing for positive and negative modes were performed separately. QC samples were analyzed to determine the extent of retention time variability, and to control mass accuracy throughout the data set. Untargeted metabolomics workflows were used for peaks detection, peaks extraction and peaks alignment. Background compounds found in the blank samples were filtered out from the data set. Peaks alignment parameters mainly included mass tolerance and retention time (RT), which were set at 5 ppm and at 0.1 min, respectively. Peaks detection was performed using a signal-to-noise ratio (S/N) of 2 and peak intensity thresholds at 10,000. Poorly repeatable features were filtered out by keeping those with a peak rating greater or equal to 4 in at least 4 samples and by keeping features with a coefficient of variation (CV) $\leq 30\%$ in all QC samples. Using these settings, 1229 and 527 features were obtained in positive and negative modes, respectively.

Statistical analysis

We used Generalized Linear Model (GLM) with the likelihood ratio and the chi-squared (χ^2) test to determine a statistically significant difference for EPG data. As feeding duration parameters were not normally distributed we used GLM using a gamma (link = “inverse”) distribution. Occurrence parameters were analyzed with a Poisson distribution to correct for overdispersion (link = “log”). Parameter “time to first sap ingestion” was modelled using the Cox proportional hazards (CPH) model and we treated cases where the given event did not occur as censored. The assumption of the validity of proportional hazards was checked using the functions “coxph” and “cox.zph”, respectively (R packages: “survival” and “RVAideMemoire”). For aphid fecundity essay we used the “glmer” function (R package: “lme4”) for performed Generalized Linear Mixed Model (GLMM) to determine a statistically significant difference between modalities. We included the factor “session” as a random variable (corresponding to the different repetitions), all other factors being considered as fixed effects. When a significant effect was detected, a pairwise comparison using estimated marginal means (R package “emmeans”; p-value adjustment with Tukey method) at the 0.05 significance level was used to test for differences between treatments. A total of 16 EPG parameters were calculated (Supplementary Tables 2-4). Statistical analyses from metabolomic, including principal component analysis (PCA) and differential analysis were obtained using the Compound Discoverer software. Peak areas were normalized using Systematical Error Removal using Random Forest (SERRF) QC correction (random Forest with 200 trees). P-values were calculated by a one-way-ANOVA model with Tukey's post-hoc test, and were adjusted using the Benjamini-Hochberg procedure. Metabolites were considered differentially accumulated when the false discovery rate was below 5% (FDR ≤ 0.05).

The application conditions of all GLM and GLMM were verified by inspecting residuals and QQ plots. All statistical analyses except metabolomics were performed using R software v. 4.0.5 (www.r-project.org/).

Acknowledgments

We thank Claire Villeroy for aphid rearing, the experimental unit of INRAE Grand Est-Colmar (UEAV) for help with plant production, Danièle Scheidecker for pbinSuc2::RT construction, Célia Krieger for

pbinSuc2::P0myc construction. This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) (reference ROME ANR-18-CE20-0017-01) (to MD). MV was supported by a Ph.D. fellowship from Université de Strasbourg. QC was supported by Région Grand Est (Soutien aux jeunes chercheurs, reference 18_GE5_013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Bajczyk, M., Bhat, S. S., Szewc, L., Szweykowska-Kulinska, Z., Jarmolowski, A., & Dolata, J. (2019). Novel Nuclear Functions of Arabidopsis ARGONAUTE1: Beyond RNA Interference. *Plant Physiology*, *179*(3), 1030–1039. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01351>
- Bak, A., Patton, M. K. F., Perilla-Henao, L. M., Aegerter, B. J., & Casteel, C. L. (2019). Ethylene signaling mediates potyvirus spread by aphid vectors. *Oecologia*, *190*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04405-0>
- Basu, S., Clark, R. E., Bera, S., Casteel, C. L., & Crowder, D. W. (2021). Responses of pea plants to multiple antagonists are mediated by order of attack and phytohormone crosstalk. *Molecular Ecology*, *30*(19), 4939–4948. <https://doi.org/10.1111/mec.16103>
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., & Baulcombe, D. C. C. (2007). The Polerovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology*, *17*(18), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.039>
- Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>
- Bogaert, F., Marmonier, A., Pichon, E., Boissinot, S., Ziegler-Graff, V., Chesnais, Q., Villeroy, C., Drucker, M., & Brault, V. (2020). Impact of mutations in arabidopsis thaliana metabolic pathways on polerovirus accumulation, aphid performance, and feeding behavior. *Viruses*, *12*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/v12020146>
- Boissinot, S., Brault, V., & Herrbach, E. (2020). Luteovirids. In *eLS* (Vol. 1, Issue 2, pp. 327–339). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029206>
- Boquel, S., Giordanengo, P., & Ameline, A. (2011). Divergent effects of PVY-infected potato plant on aphids. *European Journal of Plant Pathology*, *129*(4), 507–510. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9732-8>
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology*, *17*(18), 1615–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.061>
- Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2011). The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Research*, *159*(2), 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.020>
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J. J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., & Torrance, L. (2013). Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annual Review of Phytopathology*, *51*(1), 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102346>

- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K. E., & Ziegler-Graff, V. (2003). Effects of Point Mutations in the Major Capsid Protein of Beet Western Yellows Virus on Capsid Formation, Virus Accumulation, and Aphid Transmission. *Journal of Virology*, *77*(5), 3247–3256. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3247-3256.2003>
- Brault, V., van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, a, Herrbach, E., Garaud, J. C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., Brault, V., Heuvel, J. F. J. M. Van Den, Verbeek, M., Reutenauer, a, Herrbach, E., Garaud, J. C., Guilley, H., Richards, K., Jonard, G., ... Jonard, G. (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO Journal*, *14*(4), 650–659.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E., & Fereres, A. (2014). A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, *186*, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.012>
- Chesnais, Q., Caballero, G., Roxane, V., Michel, C., Kerry, Y., Brault, V., & Ameline, A. (2020). Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia*, *0123456789*. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>
- Chesnais, Q., Couty, A., Uzest, M., Brault, V., & Ameline, A. (2019). Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Science*, *26*(1), 86–96. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12508>
- Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Comparative Plant Transcriptome Profiling of Arabidopsis thaliana Col-0 and Camelina sativa var. Celine Infested with Myzus persicae Aphids Acquiring Circulative and Noncirculative Viruses Reveals Virus- and Plant-Specific Alterations Relevant to Aphid Fe. *Microbiology Spectrum*, *10*(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00136-22>
- Chesnais, Q., Mauck, K. E., Bogaert, F., Bamière, A., Catterou, M., Spicher, F., Brault, V., Tepfer, M., & Ameline, A. (2019). Virus effects on plant quality and vector behavior are species specific and do not depend on host physiological phenotype. *Journal of Pest Science*, *92*(2), 791–804. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01082-z>
- Chesnais, Q., Verdier, M., Burckbuchler, M., Brault, V., Pooggin, M., & Drucker, M. (2021). Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, *March*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>
- Claudel, P., Chesnais, Q., Fouché, Q., Krieger, C., Halter, D., Bogaert, F., Meyer, S., Boissinot, S., Hugueney, P., Ziegler-Graff, V., Ameline, A., & Brault, V. (2018). The aphid-transmitted turnip yellows virus differentially affects volatiles emission and subsequent vector behavior in two brassicaceae plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms19082316>
- Clavel, M., Lechner, E., Incarbone, M., Vincent, T., Cognat, V., Smirnova, E., Lecorbeiller, M., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Genschik, P. (2021). Atypical molecular features of RNA silencing against the phloem-restricted polerovirus TuYV. *Nucleic Acids Research*, *49*(19), 11274–11293. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab802>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *16*(6), 735–743.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>

- DeBlasio, S. L., Chavez, J. D., Alexander, M. M., Ramsey, J., Eng, J. K., Mahoney, J., Gray, S. M., Bruce, J. E., & Cilia, M. (2016). Visualization of Host-Poliovirus Interaction Topologies Using Protein Interaction Reporter Technology. *Journal of Virology*, *90*(4), 1973–1987. <https://doi.org/10.1128/jvi.01706-15>
- DeBlasio, S. L., Johnson, R. S., MacCoss, M. J., Gray, S. M., & Cilia, M. (2016). Model System-Guided Protein Interaction Mapping for Virus Isolated from Phloem Tissue. *Journal of Proteome Research*, *15*(12), 4601–4611. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00715>
- Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A., & Davis, T. S. (2018). Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, *63*, 169–191. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043119>
- Fereres, A., & Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, *141*(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calc: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, *8*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9298-z>
- Gray, S., Cilia, M., & Ghanim, M. (2014). Circulative, “Nonpropagative” virus transmission: An orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 89). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5>
- Gray, S., & Gildow, F. E. (2003). LUTEOVIRUS-APHID INTERACTIONS*. *Annual Review of Phytopathology*, *41*(1), 539–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815>
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H., & Taliansky, M. (2005). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology*, *86*(10), 2891–2896. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81101-0>
- Hipper, C., Monsion, B., Bortolamiol-Bécet, D., Ziegler-Graff, V., & Brault, V. (2014). Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *Journal of General Virology*, *95*(PART 2), 496–505. <https://doi.org/10.1099/vir.0.058867-0>
- Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, *46*(1), 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G., Villarroel, R., Van Montagu, M., & Schell, J. (1980). The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid*, *3*(2), 212–230. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(80\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0147-619X(80)90110-9)
- Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D., & Bosque-Pérez, N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, *2*. <https://doi.org/10.1038/srep00578>
- Li, P., Liu, C., Deng, W.-H., Yao, D.-M., Pan, L.-L., Li, Y.-Q., Liu, Y.-Q., Liang, Y., Zhou, X.-P., & Wang, X.-W. (2019). Plant begomoviruses subvert ubiquitination to suppress plant defenses against insect vectors. *PLOS Pathogens*, *15*(2), e1007607. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007607>

- Liang, C., Cai, Q., Wang, F., Li, S., You, C., Xu, C., Gao, L., Cao, D., Lan, T., Zhang, B., Mo, B., & Chen, X. (2022). Arabidopsis RBV is a conserved WD40 repeat protein that promotes microRNA biogenesis and ARGONAUTE1 loading. *Nature Communications*, *13*(1), 1217. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28872-x>
- Mauck, K. E., Bosque-Pérez, N. A., Eigenbrode, S. D., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2012). Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: Evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, *26*(5), 1162–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>
- Mauck, K. E., De Moraes, C., & Mescher, M. (2016). Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*, *32*, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.012>
- Mauck, K. E., & Chesnais, Q. (2020). A synthesis of virus-vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Research*, *285*(March), 197957. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197957>
- Mauck, K. E., Chesnais, Q., & Shapiro, L. R. (2018). Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>
- Mauck, K. E., Kenney, J., & Chesnais, Q. (2019). Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, *33*(Figure 1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.001>
- Ng, J. C. K., & Falk, B. W. (2006). Virus-Vector Interactions Mediating Nonpersistent and Semipersistent Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>
- Ontiveros, I., Pan, S., Tan, H., & Roepenack-lahaye, E. Von. (2022). A plant virus causes symptoms through the deployment of a host-mimicking protein domain to attract the insect vector. 1–29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2022.12.16.520777>
- Patton, M. F., Bak, A., Sayre, J. M., Heck, M. L., & Casteel, C. L. (2020). A polerovirus, Potato leafroll virus, alters plant–vector interactions using three viral proteins. *Plant, Cell & Environment*, *43*(2), 387–399. <https://doi.org/10.1111/pce.13684>
- Perilla-Henao, L. M., & Casteel, C. L. (2016). Vector-borne bacterial plant pathogens: Interactions with hemipteran insects and plants. *Frontiers in Plant Science*, *7*(August), 1163. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01163>
- Peter, K. A., Gildow, F., Palukaitis, P., & Gray, S. M. (2009). The C Terminus of the Polerovirus P5 Readthrough Domain Limits Virus Infection to the Phloem. *Journal of Virology*, *83*(11), 5419–5429. <https://doi.org/10.1128/JVI.02312-08>
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G., & Ziegler-Graff, V. (2002). PO of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of Virology*, *76*(13), 6815–6824. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6815-6824.2002>
- Ray, S., & Casteel, C. L. (2022). Effector-mediated plant–virus–vector interactions. *The Plant Cell*, *34*(5), 1514–1531. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac058>
- Schliephake, E., Graichen, K., & Rabenstein, F. (2000). Investigations on the vector transmission of the

- Beet mild yellowing virus (BMV) and the Turnip yellows virus (TuVY). *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*, *107*(1), 81–87.
- Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K. J., & Sauer, N. (2004). Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *The Plant Journal*, *41*(2), 319–331. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02298.x>
- Stafford, C. A., Walker, G. P., & Ullman, D. E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(23), 9350–9355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100773108>
- Stout, M. J., Thaler, J. S., & Thomma, B. P. H. J. (2006). Plant-Mediated Interactions Between Pathogenic Microorganisms And Herbivorous Arthropods. *Annual Review of Entomology*, *51*(1), 663–689. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151117>
- Tjallingii, w. F., & esch, t. H. (1993). Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, *18*(3), 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Truernit, E., & Sauer, N. (1995). The promoter of the Arabidopsis thaliana SUC2 sucrose-H⁺ symporter gene directs expression of β -glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta: An International Journal of Plant Biology*, *196*(3), 564–570. <https://doi.org/10.1007/BF00203657>
- van den Heuvel, J. F., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., & Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology*, *71*(10), 7258–7265. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7258-7265.1997>
- Verdier, M., Chesnais, Q., Piroilles, E., Blanc, S., & Drucker, M. (2023). The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector Myzus persicae to facilitate transmission. *PLOS Pathogens*, *19*(2), e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>
- Westwood, J. H., Groen, S. C., Du, Z., Murphy, A. M., Anggoro, D. T., Tungadi, T., Luang-In, V., Lewsey, M. G., Rossiter, J. T., Powell, G., Smith, A. G., & Carr, J. P. (2013). A trio of viral proteins tunes aphid-plant interactions in arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, *8*(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083066>
- Westwood, J. H., Lewsey, M. G., Murphy, A. M., Tungadi, T., Bates, A., Gilligan, C. A., & Carr, J. P. (2014). Interference with jasmonic acid-regulated gene expression is a general property of viral suppressors of RNA silencing but only partly explains virus-induced changes in plant-aphid interactions. *Journal of General Virology*, *95*(PART3), 733–739. <https://doi.org/10.1099/vir.0.060624-0>
- Wu, D., Qi, T., Li, W. X., Tian, H., Gao, H., Wang, J., Ge, J., Yao, R., Ren, C., Wang, X. B., Liu, Y., Kang, L., Ding, S. W., & Xie, D. (2017). Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. *Cell Research*, *27*(3), 402–415. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.2>
- Zhou, J. S., Drucker, M., & Ng, J. C. (2018). Direct and indirect influences of virus–insect vector–plant interactions on non-circulative, semi-persistent virus transmission. *Current Opinion in Virology*, *33*,

129–136. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.004>

Ziebell, H., Murphy, A. M., Groen, S. C., Tungadi, T., Westwood, J. H., Lewsey, M. G., Moulin, M., Kleczkowski, A., Smith, A. G., Stevens, M., Powell, G., & Carr, J. P. (2011). Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports*, 1, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep00187>

Ziegler-Graff, V. (2020). Molecular insights into host and vector manipulation by plant viruses. *Viruses*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/v12030263>

Supporting information

S1 Table. List of primer used.

Experiment	Primer Sequence 5' > 3'	Length amplicon
RT-PCR "RT-transgenic plant"	F-5'-GGAACGTGGGGATTTACA-3'	360 pb
	R-5'-GTCTCCCAGGTTGAGACTG-3'	
RT-PCR "P0-transgenic plant"	F-5'-CCTGCCACTGAACCAGAGTT-3'	140 pb
	R-5'-GCCAAGATTAGCGAGCTCCA-3'	
RT-PCR "CP-transgenic plant"	F-5'-AAGACAATCTCGCGGGAAG-3'	301 pb
	R-5'-GGAGACGAACTCCAAAATGAC-3'	
PCR "Insertion CP sequence"	F-5'-TTTTGCTAGCATGAATACGGTCGTGGGTAGG-3'	629 pb
	R-5'-AAAAGTCGACCTATTTGGGGTTGTGGAATTGAC-3'	

S2 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the RT-transgenic plants dataset.

EPG parameters	Model	Statistiques (Stat, Df, P-value)	Mock (n = 26)	TuYV (n = 24)	RT (n = 24)
General probing behaviour (Pr)					
Number of probes (n_Pr)	Poisson	2.456 ; 2 ; 0.293	23.69 ± 3.40	21.36 ± 4.65	24.08 ± 2.91
Number of brief probes (< 3 min) (n_bPr)	Poisson	2.182 ; 2 ; 0.336	13.35 ± 2.27	13.72 ± 3.37	14.92 ± 2.19
Total duration of probes (s_Pr) (min)	Gamma	3.568 ; 2 ; 0.168	417.62 ± 8.63	435.54 ± 7.64	412 ± 7.83
Time to first probe (t>1Pr) (min)	Cox	3.272 ; 2 ; 0.195	4.32 ± 1.44	3.27 ± 0.47	5.57 ± 0.97
Number of probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_Pr>1E)	Poisson	14.616 ; 2 ; < 0.001	13.12 ± 2.57 b	9.21 ± 1.47 a	11.70 ± 1.67 b
Number of brief probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_bPr>1E)	Poisson	4.8469 ; 2 ; 0.089	8.56 ± 1.71	9.79 ± 1.09	8.35 ± 1.21
Pathway phase (C)					
Number of pathway phase (n_C)	Poisson	2.488 ; 2 ; 0.288	26.96 ± 3.49	24.48 ± 4.77	27.54 ± 3.17
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	Gamma	8.652 ; 2 ; 0.013	200.54 ± 20.36 a	120.82 ± 15.90 b	162.67 ± 17.93 ab
Feeding behaviour (E: E1 = salivation ; E2 = ingestion)					
Number of salivation in the phloem tissues (n_E1)	Poisson	0.082 ; 2 ; 0.960	3.81 ± 0.53	3.84 ± 0.76	3.83 ± 0.55
Total duration of salivation in the phloem tissues (s_E1) (min)	Gamma	6.627 ; 2 ; 0.036	6.78 ± 1.33	3.86 ± 0.65	4.21 ± 0.49
Number of sap ingestion in the phloem tissues (n_E2)	Poisson	1.539 ; 2 ; 0.463	3.08 ± 0.45	3.6 ± 0.74	3.5 ± 0.54
Total duration of sap ingestion in the phloem tissues (s_E2) (min)	Gamma	9.152 ; 2 ; 0.010	220.04 ± 23.12 b	321.82 ± 18.45 a	239.12 ± 25.05 b
Number of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (n_sE2)	Poisson	2.337 ; 2 ; 0.311	1.88 ± 0.29	2.44 ± 0.39	2.33 ± 0.30
Total duration of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (s_sE2) (min)	Gamma	7.519 ; 2 ; 0.023	226.11 ± 22.26 b	317.19 ± 19.17 a	232.94 ± 25.53 ab
Time to first phloem phase (t>1E) (min)	Cox	2.442 ; 2 ; 0.295	153.56 ± 25.30	93.98 ± 19.81	125.36 ± 24.0
Time to first sap ingestion in the phloem tissues (t>1E2) (min)	Cox	2.883 ; 2 ; 0.237	166.82 ± 27.75	98.33 ± 19.55	132.86 ± 24.19

S3 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the P0-transgenic plants dataset.

EPG parameters	Model	Statistiques (Stat, Df, P-value)	Mock (n = 31)	TuYV (n = 29)	P0 (n = 30)
General probing behaviour (Pr)					
Number of probes (n_Pr)	Poisson	94.837 ; 2 ; < 0.001	28.07 ± 2.11	c 15.92 ± 1.84	a 23.96 ± 2.56 b
Number of brief probes (< 3 min) (n_bPr)	Poisson	36.507 ; 2 ; < 0.001	15.24 ± 1.20	b 9.92 ± 1.19	a 14.75 ± 1.74 b
Total duration of probes (s_Pr) (min)	Gamma	13.601 ; 2 ; 0.001	387.97 ± 7.64	b 425.20 ± 6.24	a 398.80 ± 7.30 b
Time to first probe (t>1Pr) (min)	Cox	6.872 ; 2 ; 0.032	7.29 ± 1.22	b 3.38 ± 0.71	a 6.18 ± 1.34 ab
Number of probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_Pr>1E)	Poisson	25.727 ; 2 ; < 0.001	12.22 ± 1.51	b 8.04 ± 0.96	a 11.43 ± 1.39 b
Number of brief probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_bPr>1E)	Poisson	10.225 ; 2 ; 0.006	7.78 ± 1.03	ab 6.42 ± 0.83	a 8.82 ± 1.20 b
Pathway phase (C)					
Number of pathway phase (n_C)	Poisson	92.064 ; 2 ; < 0.001	33.45 ± 2.13	c 20.35 ± 2.56	a 29.75 ± 3.22 b
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	Gamma	17.021 ; 2 ; < 0.001	198.42 ± 13.36	b 115.75 ± 13.30	a 153.03 ± 13.86 ab
Feeding behaviour (E: E1 = salivation ; E2 = ingestion)					
Number of salivation in the phloem tissues (n_E1)	Poisson	3.098 ; 2 ; 0.213	5.62 ± 0.81	5.08 ± 0.63	6.21 ± 0.94
Total duration of salivation in the phloem tissues (s_E1) (min)	Gamma	6.506 ; 2 ; 0.039	7.10 ± 1.39	a 3.99 ± 0.47	a 6.82 ± 1.25 a
Number of sap ingestion in the phloem tissues (n_E2)	Poisson	2.079 ; 2 ; 0.354	4.97 ± 0.76	4.81 ± 0.63	5.64 ± 0.83
Total duration of sap ingestion in the phloem tissues (s_E2) (min)	Gamma	18.434 ; 2 ; < 0.001	175.93 ± 18.18	b 297.59 ± 18.59	a 228.01 ± 19.31 ab
Number of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (n_sE2)	Poisson	0.264 ; 2 ; 0.876	3.03 ± 0.51	2.85 ± 0.33	2.82 ± 0.28
Total duration of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (s_sE2) (min)	Gamma	18.434 ; 2 ; < 0.001	174.02 ± 17.76	b 289.50 ± 19.38	a 216.13 ± 20.81 ab
Time to first phloem phase (t>1E) (min)	Cox	8.040 ; 2 ; 0.018	151.35 ± 25.55	b 80.56 ± 10.28	a 100.34 ± 12.79 ab
Time to first sap ingestion in the phloem tissues (t>1E2) (min)	Cox	10.493 ; 2 ; 0.005	161.34 ± 25.41	b 82.44 ± 10.39	a 108.34 ± 13.22 ab

S4 Table. List of 28 EPG parameters statistically processed for the CP-transgenic plants dataset.

EPG parameters	Model	Statistiques (Stat, Df, P-value)	Mock (n = 32)	TuYV (n = 29)	CP (n = 32)
General probing behaviour (Pr)					
Number of probes (n_Pr)	Poisson	84.156 ; 2 ; < 0.001	19.66 ± 1.87	a 12.10 ± 1.42	b 11.63 ± 1.49 b
Number of brief probes (< 3 min) (n_bPr)	Poisson	34.347 ; 2 < 0.001	9.67 ± 1.13	a 6.21 ± 0.80	b 6.09 ± 0.98 b
Total duration of probes (s_Pr) (min)	Gamma	11.523 ; 2 0.003	397.81 ± 10.23	a 428.54 ± 8.61	b 436.87 ± 6.54 b
Time to first probe (t>1Pr) (min)	Cox	0.307 ; 2 ; 0.858	6.15 ± 0.82	5.49 ± 1.07	5.51 ± 0.91
Number of probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_Pr>1E)	Poisson	49.428 ; 2 ; < 0.001	12.61 ± 1.51	a 7.72 ± 1.06	b 7.78 ± 0.91 b
Number of brief probes before the first sap ingestion in phloem tissues (n_bPr>1E)	Poisson	14.056 ; 2 ; < 0.001	6.65 ± 0.70	a 4.79 ± 0.69	b 4.63 ± 0.60 b
Pathway phase (C)					
Number of pathway phase (n_C)	Poisson	97.665 ; 2 ; < 0.001	21.88 ± 2.13	a 13.72 ± 1.67	b 12.53 ± 1.66 b
Total duration of pathway phase (s_C) (min)	Gamma	9.780 ; 2 ; 0.007	172.83 ± 16.56	a 107.76 ± 14.88	b 106.70 ± 15.64 b
Feeding behaviour (E: E1 = salivation ; E2 = ingestion)					
Number of salivation in the phloem tissues (n_E1)	Poisson	6.123 ; 2 ; 0.047	2.72 ± 0.41	a 2.45 ± 0.37	ab 1.81 ± 0.26 b
Total duration of salivation in the phloem tissues (s_E1) (min)	Gamma	3.030 ; 2 ; 0.220	7.20 ± 1.48	4.45 ± 0.92	3.99 ± 1.35
Number of sap ingestion in the phloem tissues (n_E2)	Poisson	1.705 ; 2 ; 0.426	2.13 ± 0.33	2.10 ± 0.32	1.72 ± 0.23
Total duration of sap ingestion in the phloem tissues (s_E2) (min)	Gamma	12.38 ; 2 ; 0.002	223.13 ± 25.42	a 324.66 ± 19.53	b 323.00 ± 22.18 b
Number of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (n_sE2)	Poisson	0.107 ; 2 ; 0.948	1.47 ± 0.20	1.48 ± 0.12	1.56 ± 0.20
Total duration of sustained sap ingestion in the phloem tissues (>10 min) (s_sE2) (min)	Gamma	12.322 ; 2 ; 0.002	220.01 ± 25.66	a 322.00 ± 20.18	b 321.99 ± 22.47 b
Time to first phloem phase (t>1E) (min)	Cox	12.217 ; 2 ; 0.002	178.36 ± 24.83	a 100.78 ± 14.14	b 99.92 ± 12.87 b
Time to first sap ingestion in the phloem tissues (t>1E2) (min)	Cox	12.983 ; 2 ; 0.002	226.70 ± 26.01	a 123.51 ± 19.70	b 105.18 ± 13.63 b

Chapitre 3 : Etude des effets post-
acquisitions du TuYV et du CaMV sur *Myzus*
persicae

Résumé du chapitre 3

CONTEXTE

Nous avons montré que les virus TuYV et CaMV modifiaient les interactions plante-puceron de manières propices à leurs acquisitions (chapitres 1 et 2). Cependant la transmission virale ne dépend pas seulement de cette étape. Les pucerons doivent ensuite quitter la plante infectée, et franchir la distance vers un nouvel hôte. Cette étape inclut un jeûne sur une période plus ou moins longue, la localisation d'un hôte susceptible et un comportement alimentaire adapté à l'inoculation des particules virales dans les tissus appropriés. Etant donné que des phénomènes adaptatifs ont émergé pour favoriser les premières étapes de la transmission, il est vraisemblable que ce soit également le cas pour les étapes consécutives.

HYPOTHESE(S) ET OBJECTIF(S)

Nous supposons que les modifications du vecteur, induites par l'infection virale, ne se limitent pas aux étapes précédentes et concomitantes du contact avec la plante infectée mais perdurent une fois que les pucerons ont quitté la plante sur laquelle ils ont acquis le virus (i.e., effets post-acquisitions). Les objectifs de cette étude sont de mettre en évidence des effets post-acquisitions sur le comportement et la physiologie des pucerons vecteurs. Les effets post-acquisitions pourraient, tout comme les modifications des vecteurs lors de leur séjour sur les plantes infectées, dépendre du mode de transmission (voir le Chapitre 1 pour le virus NCSP CaMV et le Chapitre 2 pour le virus CP TuYV). Ainsi, l'utilisation du CaMV et du TuYV dans ce chapitre permettra de comparer les effets post-acquisitions en mettant en perspective les adaptations liées à deux modes de transmission distincts.

METHODE

Toutes les expérimentations sur les pucerons ont été effectuées en utilisant des individus adultes ayant été en contact avec une Arabidopsis saine, infectées par le TuYV ou le CaMV durant trois jours. La dispersion de plante à plante a été étudiée en déposant des pucerons virulifères, ou non, sur des plantes saines afin de s'affranchir d'une réponse des pucerons au statut infecté des plantes. En complément, une arène constituée de cercles concentriques a été utilisée pour mesurer la motilité des pucerons hors des plantes. L'état physiologique des pucerons a été évalué en quantifiant les ressources énergétiques (i.e., lipides) dont ils disposent en quittant la plante infectée, en mesurant leur masse, et en estimant la survie sans alimentation (durée maximale dont disposent les pucerons pour trouver un nouvel hôte). Une étude métabolomique quantifiant notamment les acides aminés, les sucres, et des molécules de défenses, a été réalisée sur les plantes afin d'évaluer l'impact de l'infection sur la qualité nutritionnelle de ces dernières pour les pucerons.

RESULTATS

Après s'être alimenté pendant trois jours sur les plantes infectées, les pucerons virulifères, quel que soit le virus, ont une propension supérieure à la dispersion entre les plantes ; alors que seul le CaMV améliore leur motilité hors-plante. Les pucerons virulifères CaMV sont plus petits et survivent moins longtemps lorsqu'on les prive d'alimentation en comparaison des pucerons non-virulifères ou porteurs du TuYV. Les pucerons s'étant alimentés sur les plantes infectées par le CaMV accumulent également moins de ressources énergétiques sous forme de lipides. Ce stress physiologique est corrélé avec une forte perturbation métabolomique des plantes infectées par le

CaMV. Les traits d'histoire de vie des pucerons virulifères TuYV, ainsi que le métabolome des plantes infectées par le TuYV, sont en revanche très similaires aux conditions sans virus.

DISCUSSION

Nos résultats confirment l'existence d'effets post-acquisitions des deux types de virus (NCSP et CP) sur la motivation des pucerons virulifères à se disperser entre les plantes. La réduction des ressources énergétiques et la détérioration des traits d'histoire de vie des pucerons virulifères CaMV témoignent d'un état de stress physiologique marqué. La qualité nutritive médiocre des plantes infectées par le CaMV pour les pucerons les contraint probablement à rechercher activement un nouvel hôte. Les particules virales du CaMV étant retenues dans les stylets des pucerons durant une période restreinte (quelques heures), ces modifications comportementales du vecteur sont favorables à la transmission du CaMV alors que les effets physiologiques négatifs ne sont que peu impactant. Ce type d'effets négatifs sur le métabolome des plantes infectées ou sur la physiologie des pucerons virulifères, n'est pas retrouvé pour le TuYV qui est un virus persistant dans le puceron, et qui de fait, n'est pas soumis aux mêmes contraintes évolutives que le CaMV.

Les points marquants :

- ◆ Un contact limité de trois jours avec une plante infectée est suffisant pour reprogrammer la physiologie et le comportement du vecteur *Myzus persicae*.
- ◆ Les perturbations métabolomiques causées par l'infection du CaMV chez *Arabidopsis* influencent drastiquement et négativement les traits d'histoire de vie de *Myzus persicae* incitant une dispersion rapide et la recherche d'un nouvel hôte.
- ◆ Les pucerons virulifères TuYV ont une dispersion augmentée malgré l'absence de stress physiologique. Le mécanisme à l'origine de ce comportement reste à identifier mais pourrait être un effet direct du virus dans le puceron après son internalisation.
- ◆ Cette étude fournit des arguments convaincants selon lesquels des phénomènes évolutifs adaptatifs ont été sélectionnés pour améliorer la transmission après l'étape de l'acquisition virale.

Article 4: Post-acquisition effects on aphid vectors are related to the plant virus transmission mode and correlate with metabolic modifications of the host plant

Authors:

Maxime Verdier^a, Raymonde Baltenweck^a, Véronique Brault^a, Philippe Hugueney^a, Martin Drucker^{a*}, Quentin Chesnais^{a*}

^a SVQV UMR 1131 INRAE Centre Grand Est – Colmar, Université de Strasbourg, 68000 Colmar, France

* Corresponding authors: Quentin Chesnais, Martin Drucker

Email: quentin.chesnais@inrae.fr; martin.drucker@inrae.fr

Abstract

Epidemics of vector-borne human and plant diseases are frequently dependent on the behavior of their arthropod vectors. Many plant viruses have evolved to influence the behavior of their vectors - mainly piercing-sucking insects - to enhance their transmission. However, most of the research done to date has concentrated on virus-(pre-)acquisition vector behavior. In this study, we compared two viruses, TuYV and CaMV, with different transmission strategies, and showed that plant viruses can influence the physiology of their vectors to modify the behavior they exhibit after leaving the infected plant on which they acquired the virus, and thus increase the chances of virus inoculation in a new host. We show that both TuYV and CaMV increased the dispersal of viruliferous aphids, while CaMV alone improved aphid motility. CaMV-viruliferous aphids were smaller and survived less than non-viruliferous aphids without food sources. This physiological stress in aphids correlates with a strong disruption of the metabolomic profile of CaMV-infected plants. The poor quality of CaMV-infected plants as a host for aphids certainly drives them to actively forage for a new host, and thus promote CaMV virions inoculation, which are rapidly lost by the aphid. These negative effects on the metabolome of infected-plants are not observed for TuYV infection, which is persistent in the vector and not subject to the same evolutionary constraints. This study provides arguments that adaptative evolutionary phenomena have also emerged to improve viral transmission after the step of viral acquisition. Additional research is now required to establish whether the post-acquisition changes are specific to virus mode of transmission and to decipher to metabolic impact of vector physiology.

Introduction

Plant virus infection often modifies host physiology, resulting in phenotypic changes that can impact color, growth, primary and specialized metabolites, volatile organic compounds, and other traits (Culver & Padmanabhan, 2008). In the case of arthropod-transmitted plant viruses, these phenotypic changes can influence vector behavior and thus affect the virus transmission, with subsequent epidemiological, ecological, and agronomic implications (Mauck et al., 2012, 2016). The term "parasite manipulation" is used when the co-evolution between a host, a pathogen, and its vector leads to a modification of the host

phenotype and/or vector's behavior that is favorable to the dissemination of the pathogen in its environment (*i.e.*, infection of a new host) (Poulin, 2010). Although it may seem difficult to provide definite evidence for manipulation by a (plant) virus (Heil, 2016), it is still reasonable to assume that natural selection will rarely be indifferent to a pathological effect that significantly influences viral transmission (Mauck et al., 2010). The literature suggesting host and vector manipulation by vector-borne pathogens, including plant viruses, is rapidly growing (Eigenbrode et al., 2018; Mauck et al., 2018). Several modeling efforts show that manipulating a single vector behavioral trait, such as host preferences, drastically alters pathogen epidemiology (Gandon, 2018; Roosien et al., 2013; Sisterson, 2008). This can also have economic impacts when both yield losses and the cost of pesticide treatments are considered (Eigenbrode & Gomulkiewicz, 2022).

The potential evolutionary advantage produced by altered vector behavior depends in part on the virus transmission mechanism (Mauck et al., 2012). Plant viruses can be classified depending on the nature of the interaction with the vector and the retention time of virions in the vector (also called persistence). Non-circulative non-persistent viruses bind to cuticular surfaces of vector mouthparts only transiently (minutes to hours) and are acquired from and inoculated into most plant tissues. In contrast, most circulative-persistent viruses are phloem-limited and only acquired from this tissue. The circulative viruses traverse the intestine, cycle through the hemolymph and, finally, penetrate and are retained in the salivary glands of the vector for days or lifelong (Gray & Gildow, 2003; Hogenhout et al., 2008). General predictions suppose that these viruses would benefit from fast and prolonged access of vectors to the phloem, which would facilitate virus acquisition. Several studies have shown that potato leafroll virus (PLRV, family *Solemoviridae*), a phloem-limited and circulative virus, increases aphid settling on infected plants and improves aphid feeding and performance on these plants, compared to healthy potato plants (Eigenbrode et al., 2002; Patton et al., 2020; Rajabaskar et al., 2013). On the contrary, the non-circulative cucumber mosaic virus (CMV, family *Bromoviridae*) negatively impacts the performance and feeding of its vector, promoting rapid aphid dispersion after fast acquisition of the viral particles from the epidermal and mesophyll tissues (Mauck et al., 2010, 2014; Shi et al., 2021). These observations support the idea that the effects of plant viruses on host phenotypes and vector behavior may be adaptive. A special case are non-circulative semi-persistent viruses that are longer retained (some hours to days) in the vector mouthparts than non-persistent viruses, but considerably shorter than persistent circulative viruses. Most non-circulative semi-persistent viruses are phloem-limited, with the notable exception of cauliflower mosaic virus (CaMV, family *Caulimoviridae*) which can be efficiently acquired from most tissues including the phloem sieve tubes (Palacios et al., 2002). However, studies on plant-mediated manipulation of vector behavior focus disproportionately on circulative persistent and non-circulative non-persistent viruses, leaving the semi-persistent viruses largely unexplored (Mauck & Chesnais, 2020).

One crucial but overlooked consideration is that, to efficiently transmit, viruliferous vectors (*i.e.* virus-carrying insects) must travel for different lengths of time and over different distances (Blanc & Michalakis, 2016). During this crucial step for virus transmission (Shaw et al., 2017), many elements can influence the success of transmission, such as the weather, the presence of susceptible host-plants in the environment, the vector locomotor abilities, or just the vector survival (Crossley et al., 2022; Thresh, 1978). After leaving the initial infected plant, a vector harboring better dispersal abilities and/or a higher survival rate would undoubtedly increase the chances of viral transmission. Only a handful of empirical studies present

evidence that such transmission-conducive effects of viruses extend beyond the acquisition access period with a combination of pre- and post-acquisition effects. For example, conditional vector preferences based on plant volatiles (or palatability cues) have been observed, where viruliferous aphids preferred to orient (or settle) towards healthy plants, whereas non-viruliferous aphids preferred infected plants (Carmo-Sousa et al., 2016; Rajabaskar et al., 2014). Recently, we observed that viruliferous aphids exhibited an increased activity level in locomotor and dispersal assays (Chesnais et al., 2020). The underlying mechanisms of post-acquisition effects are mostly unknown (Mauck et al., 2019) but could be mediated by direct virus effects on the aphid (Ingwell et al., 2012), or indirect (plant-mediated) effects (Marmonier et al., 2022). These former studies have been conducted on circulative-persistent viruses, although the selection pressure is supposedly stronger for non-persistent viruses which are lost very quickly after acquisition by their vectors.

Since viruses interfere with the behavior of their vectors through adaptive evolutionary mechanisms, it is likely that these modifications not only affect virus acquisition but also the transmission step during which the viruliferous vector travels from an infected plant toward a healthy plant for inoculation (Carr et al., 2020). To investigate this hypothesis, we compared the post-acquisition behavior of two viruses whose biology is well described and which have opposite transmission modes – and hence, different evolutionary constraints. Turnip yellows virus (TuYV, family *Solemoviridae*) is a phloem-limited virus that is transmitted by aphids in a circulative and persistent manner. In contrast, cauliflower mosaic virus is transmitted in a non-circulative, semi-persistent manner. Aphids can acquire or inoculate CaMV virions within seconds during the first test punctures (Moreno et al., 2012; Palacios et al., 2002). The reversible and supposedly rather weak attachment of virus particles in the common channel of the aphid stylets allows virions to be retained only for a few hours after acquisition (Blanc et al., 2014; Uzest et al., 2007, 2010). The semi-persistent transmission of CaMV implies solid evolutionary constraints on aphid transmission (Ng & Zhou, 2015; Zhou et al., 2018). We predict that the post-acquisition effects of CaMV on its aphid vector will be more pronounced than that of TuYV which is retained in the aphid body for an extended time. We compared the aphid motility and dispersion behavior, together with fitness parameters of viruliferous and non-viruliferous aphids. These analyses were combined with metabolomic analyses of infected plants and viruliferous aphids. Overall our study confirmed that both viruses have post-acquisition effects on vector behavioral and physiological responses, and indicated that the magnitude of these effects could be related to the different evolutionary constraints imposed by the virus mode of transmission.

Results

Aphid locomotor activity and dispersion behavior

To estimate the ability of a viruliferous aphid to disperse to a new host, and thus, to potentially inoculate the virus, we first measured the locomotor activity of viruliferous or non-viruliferous aphids. Aphids were placed in the center of a target composed of several concentric circles and allowed to move freely for five minutes (Figure 1A) (see detailed protocol in (Chesnais et al., 2020)). Compared to the non-viruliferous and TuYV-viruliferous aphids, aphids from CaMV-infected plants reached a spatial area that is almost twice as far from the center of the target (“farthest area”) and crossed a significantly greater number of spatial zones (“crossed areas”) (GLMM, Df = 2, $\chi^2 = 19.885$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 31.55$, $p < 0.001$). It is worth noting that during the five minutes allotted to the aphids to move on the target, no aphid from a non-infected

or TuYV-infected plant crossed the tenth and outer most spatial zone, while 10 % of the aphids from CaMV-infected plants reached this zone and even left the target (Pearson’s Chi-squared test, Df = 2, $\chi^2 = 8.750$, $p = 0.013$).

After demonstrating the effect of the plant infection on the locomotor activity of the aphid vector, we evaluated whether the aphid status (viruliferous or not) altered the aphid retention and dispersion rates on and from healthy plants (Figure 1D). The retention of viruliferous aphids, regardless of the virus, was significantly lower for virus-carrying than for non-viruliferous aphids (GLMM, Df = 2, $\chi^2 = 15.434$, $p < 0.001$) (Figure 1E). Compared to non-viruliferous aphids, the dispersal of viruliferous aphids was significantly increased by a factor of three and five for TuYV-viruliferous and CaMV-viruliferous aphids, respectively (GLMM, Df = 2, $\chi^2 = 15.804$, $p < 0.001$) (Figure 1F).

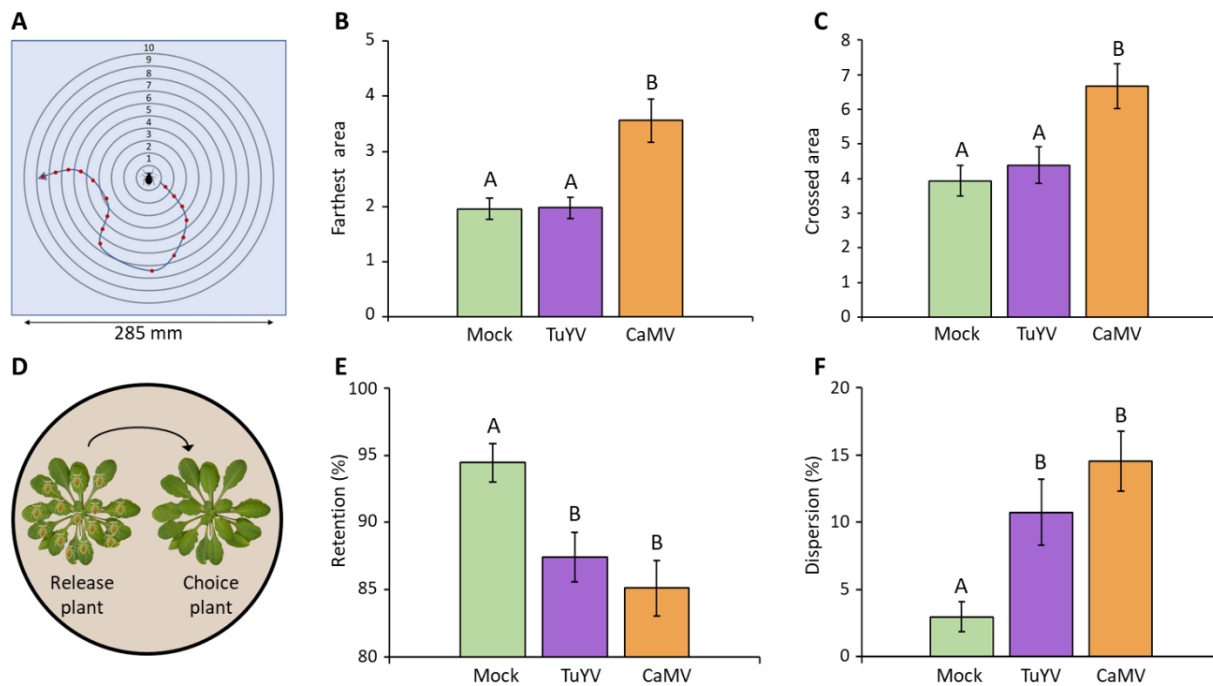


Figure 1. Post-acquisition effects of TuYV and CaMV on aphid locomotion and settling behavior. **(A)** Experimental design of the locomotor activity assay. Single aphids were placed on the target arena and their movements recorded for 5 min after 72 h infestation of non-infected plants (Mock) or infected plants [either turnip yellows virus (TuYV) or cauliflower mosaic virus (CaMV)] (N = 30). **(B)** The farthest spatial zone reached from the center of the target (Mean ± SEM). **(C)** The total number of spatial zones crossed (Mean ± SEM). **(D)** Experimental design of the settlement assay. Fifteen non-viruliferous, TuYV-viruliferous, or CaMV-viruliferous aphids were placed on leaves from a healthy “release” plant and allowed to disperse during 24 h to an adjacent healthy “choice” plant (N = 18). The two plants were contained in a 10 cm diameter pot. **(E)** Percentage of aphids recovered on the “release” plant (Mean ± SEM). **(F)** Percentage of aphids recovered on the adjacent “choice” plant (Mean ± SEM). Any aphid not found on “release” or “choice” plants at the end of the 24-hour experiment was considered as non-responding and excluded from the analysis. The percentage of non-responding aphids was 2.6 %, 1.85 %, and 0.39 % for non-viruliferous, TuYV- and CaMV-viruliferous aphids, respectively. Different letters indicate significant differences between aphid status with the GLMM followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey).

Aphid life history traits

While dispersing from an initial host plant to a new suitable one, aphids face a fasting period of variable duration. The physiological condition of the aphid at the moment of leaving the plant is expected to determine the probability of successfully reaching a new host. We evaluated the aphid physiological condition by using body mass as a proxy and by measuring aphid survival rate over time when dispersing from healthy or CaMV- and TuYV-infected host plants (Figure 2). The biomass of dried aphids from TuYV-infected and CaMV-infected plants was significantly lower than that of aphids from non-infected plants (GLMM, Df = 2, $\chi^2 = 10.499$, $p = 0.001$; $\chi^2 = 193.83$, $p < 0.001$, respectively) (Figure 2A). The weight reduction caused by CaMV was more important than that caused by TuYV (35.71% vs. 5.16%, respectively). Aphids reared 3 days on CaMV-infected plants survived significantly less time than aphids reared on non-infected plants (Cox model, Df = 1, $\chi^2 = 48.415$, $p < 0.001$), whereas aphids from TuYV-infected plants had the same survival rate than aphids from non-infected plants (Cox model, Df = 1, $\chi^2 = 1e-04$, $p = 0.994$) (Figure 2B). In addition, we observed a strong correlation between the survival time and the aphid biomass for aphids from CaMV-infected plants (Pearson's correlation, Df = 87, $t = 5.118$, $p < 0.001$; $r^2 = 0.48$) (Figure 2C) whereas no correlation was detected for aphids from TuYV-infected plants or non-infected plants (from both experiments) (Pearson's correlation, $p > 0.05$).

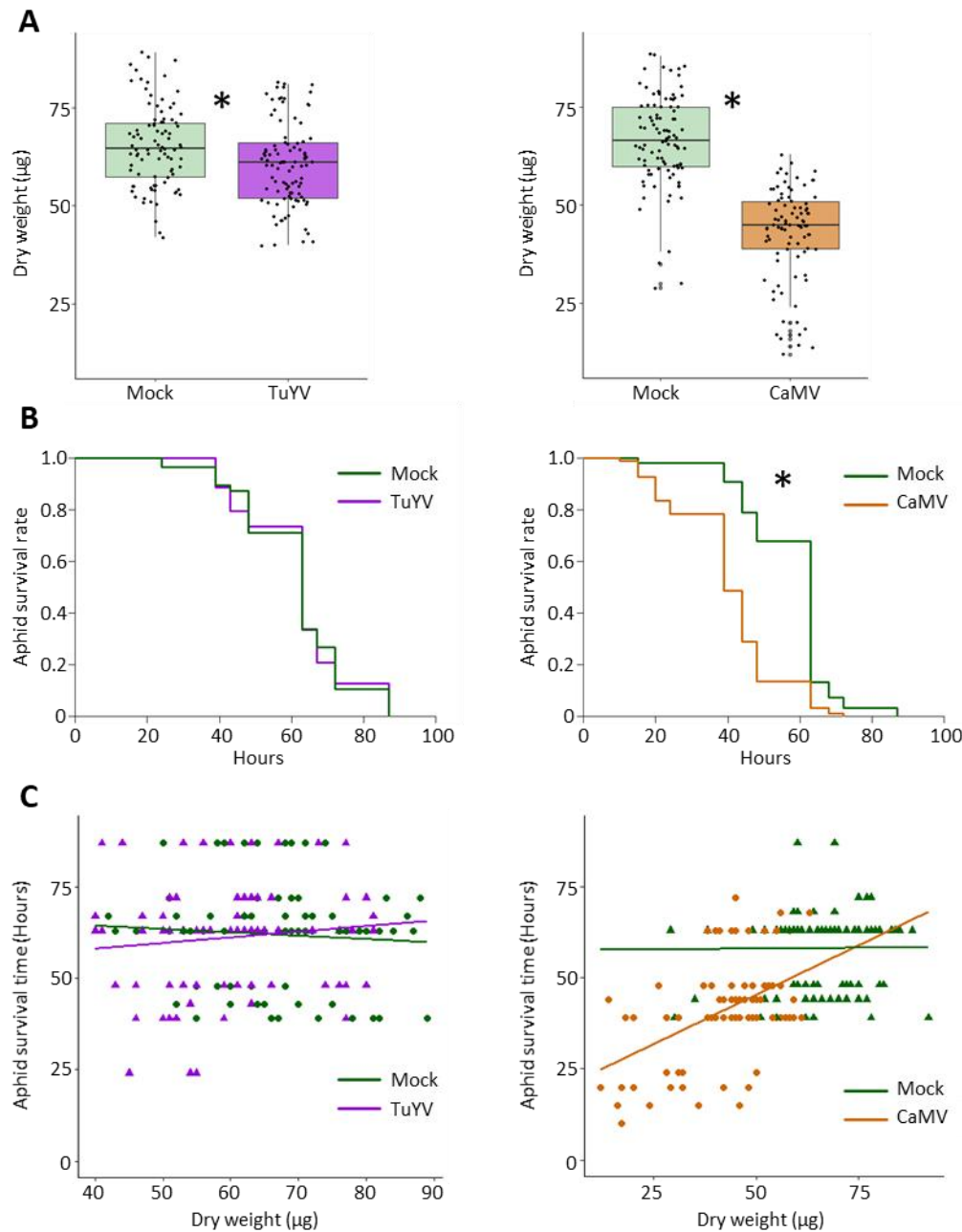


Figure 2. Dry body mass and survival of aphids after feeding for three days on non-infected, TuYV-infected, or CaMV-infected plants. **(A)** Biomass of single aphids from non-infected or infected plants (N = 100). **(B)** Aphid survival rate without access to food after three days infestation of non-infected or infected plants (either TuYV or CaMV) (N = 100). **(C)** Correlation between aphid biomass and aphid survival time (N = 100). Asterisks indicate significant differences between treatments (GLMM for aphid dry weight and Cox model for aphid survival, $p < 0.05$).

Since lipids are a major energy resource for insects that could account for their capacity to disperse and survive, we analyzed the lipid content of aphids from mock-inoculated, CaMV- or TuYV-infected plants (Figure 3). We observed that the lipid content of aphids from CaMV-infected plants was significantly reduced compared to control aphids (GLMM, Df = 2, $\chi^2 = 9.303$, $p = 0.001$). Aphids from TuYV-infected plants have an intermediate value.

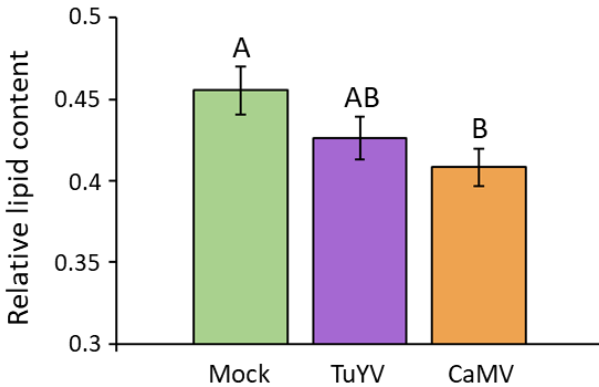


Figure 3. Lipid content of individual aphids from non-infected, TuYV-infected, or CaMV-infected plants (Mean ± SEM). Different letters indicate significant differences between treatments as tested by GLMM followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey).

Quantification of primary and secondary metabolites in the host plants

To understand how a short period of infestation (3 days) on infected-plants could strongly impact the dispersal behavior and physiology of aphid vectors, we performed a metabolomic analysis of healthy and infected plants. Principal Component Analysis (PCA) clearly differentiated the three conditions, non-infected plants, TuYV-infected and CaMV-infected plants indicating that both virus infections affect plant metabolite patterns (Figure 4A). Considering a p-value below 0.05 and a Log2 Fold Change higher than |1|, a total of 85 metabolites (71 up / 14 down) were found to differentiate TuYV-infected plant vs. control, while CaMV infection modified the accumulation of 398 metabolites (300 up / 98 down) compared to the control (Figure 4D, E). A targeted metabolomic analysis on components important in plant-aphid interactions (*i.e.*, amino acids, flavonoids, glucosinolates, hormones, and sugars) confirmed the stronger metabolites deregulations in CaMV infected plants compared to TuYV infection (Figure 4F). TuYV and CaMV infections increased the amount of all sugars detected (except raffinose which remained unchanged in CaMV infected plants compared to mock). This trend was further confirmed by enzymatic measurements showing significantly increased quantities of glucose and fructose in TuYV- and CaMV-infected plants compared to mock-inoculated plants (ANOVA, Df = 2, $\chi^2 = 4.630$, $p = 0.004$; $\chi^2 = 4.586$ $p = 0.006$) (Figure 4B, C). Concerning amino acids, only threonine differentially accumulated in mock-inoculated vs. TuYV-infected plants, whereas CaMV infection increased the accumulation of most amino acids (15 out of the 19 detected). Furthermore, CaMV reduced accumulation of the glucosinolates glucoraphanin and methoxyglucobrassicin, and increased the accumulation of hormones and derivatives as salicylate, salicylate glucose, dihydroberberine glucose, methyl jasmonate, pipercolic acid, and N-O-glucosyl-pipercolic acid (Figure 4F).

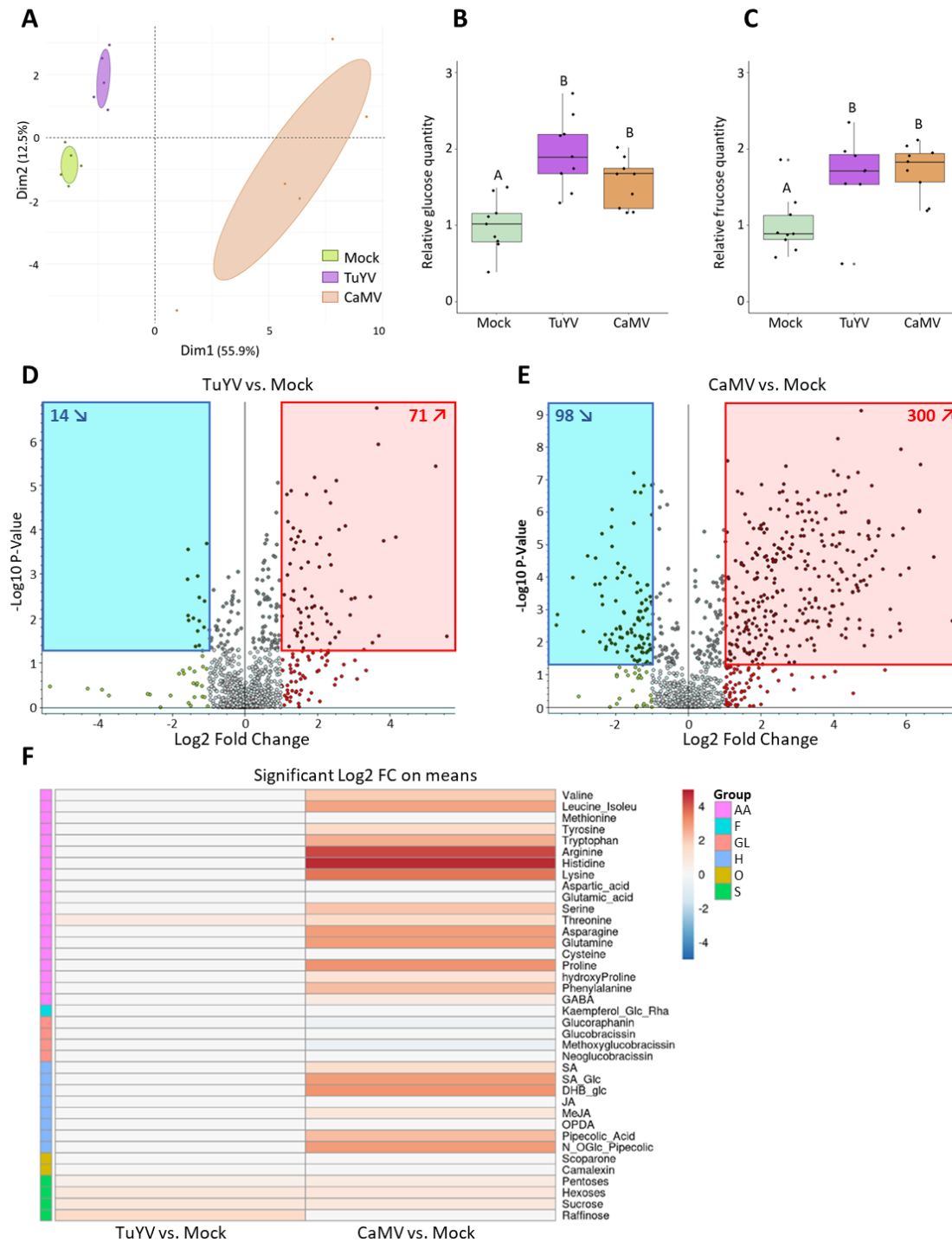


Figure 4. Impact of infection by TuYV or CaMV on the metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **(A)** Principal component analysis (PCA) of all metabolomic data sets from mock-inoculated, TuYV- and CaMV-infected leaves (N = 5). **(B, C)** Relative glucose and fructose quantity in the leaves of mock-inoculated, TuYV- or CaMV-infected plants assayed by enzymatic reaction (N = 10). The box plots show median (line), 25–75% percentiles (box), 10–90% percentiles (whisker), and outliers (dots). Different letters indicate significant differences between plant infection status as tested by one-way ANOVA followed by pairwise comparisons using “emmeans” ($p < 0.05$ method: Tukey). **(D, E)** Volcano plots depicting total metabolomic accumulation in the comparison **(D)** TuYV-infected vs. mock-inoculated

plants or **(E)** CaMV-infected vs. mock-inoculated plants. The following criteria were used: p-value < 0.05 and Log₂ Fold Change > |1|, metabolites significantly enriched in infected plants are contained in the red box while those enriched in healthy plants are contained in the blue one. **(F)** Heatmap showing a targeted metabolomic analysis of Arabidopsis infected by TuYV or CaMV. Significant Log₂ Fold Changes of metabolites are indicated by the blue to orange gradient according to the scale bar. Statistical analyses were performed by Tukey's honest significant difference method followed by false discovery rate (FDR) correction, with FDR < 0.05. For FDR ≥ 0.05, Log₂ fold changes were set to 0. AA: amino acids; F: flavonoids; GL: glucosinolates; H: hormones; O: others; S: Sugars.

Discussion

Numerous studies have shown that viruses and other parasites modify hosts and vectors to maximize their transmission (Gandon, 2018; Lefèvre et al., 2006; Mauck et al., 2018). However, the majority of these studies focus only on host-vector interactions enabling the first stage of transmission, *i.e.*, the acquisition of pathogens by the vector (Mauck et al., 2016). Adaptive phenomena may have emerged to facilitate the latter stage, the inoculation, by acting on the dispersal behavior or the physiology of the viruliferous vector (Michalakakis, 2016). Additionally, we can surmise that these potential post-acquisition effects would differ depending on the virus transmission mechanism and their evolutionary constraints, as has already been observed for pre-acquisition effects (Mauck et al., 2012, 2018). We describe here a set of viral post-acquisition effects on aphid vectors that are expected to promote the propagation of two viruses with different modes of transmission. Both circulative and non-circulative viruses, TuYV and CaMV, increased the rate of viruliferous aphid migration from plant to plant, which is conducive to their transmission. However, CaMV, for which the temporal constraints are the most stringent (short retention time by the aphid vector), also strongly altered the metabolomic profile of its host plant, negatively impacting the aphid performance and at the same time increasing motility, both encouraging rapid dispersion from the infected plants. These findings provide an ecological insight that plant virus “manipulations” extend beyond the pre-acquisition and the contact periods of the vector with the infected host, and also alter the emigration process of the viruliferous vector.

Although some studies have shown post-acquisition effects of circulative-persistent viruses on vector motility and dispersion behavior, to our knowledge, none considered non-circulative viruses. Notably, previous experiments have shown that *M. persicae* carrying TuYV, and alate of *Rhopalosiphum padi* carrying BYDV, exhibited altered locomotor activity and flight capacities, respectively (Chesnais et al., 2020; Levin & Irwin, 1995). In our experiment, we showed that, even in the absence of host plant, CaMV-viruliferous aphids displayed higher locomotion activities than non-viruliferous or TuYV-viruliferous aphids (Figure 1 B, C). This is the first time that post-acquisition effects of NC viruses on aphid motility are reported. In view of the weak and short interaction between the vector and this stylet-borne NC, it can be assumed that these effects are mainly plant-mediated, although direct effects cannot be ruled out as they have been recently observed on the same pathosystem (Verdier et al., 2023). Motility of TuYV-viruliferous aphids are not consistent with a previous experiment (Chesnais et al., 2020) that used a different plant species (TuYV-infected *Montia perfoliata*) for virus uptake. This observation supports the importance of host-plant species in these finely tuned tripartite interactions, and orients towards indirect and species-specific plant-mediated effects rather than direct effects on vector.

The increased motility observed for CaMV-viruliferous aphids may allow them to find a host plant more easily, and *in fine* promote overall virus transmission. This hypothesis is supported by the results of the

migration tests (Figure 1 E, F) which show a higher propensity to leave the initial host plant, and consequently a higher probability to colonize an adjacent “choice plant”, for both CaMV- and TuYV-viruliferous aphids compared to non-viruliferous ones. Our observations are consistent with previous experiments (performed with *M. persiciata*) showing that the TuYV carrying *M. persicae* dispersed more readily to the adjacent plant (Chesnais et al., 2020). Prior experiments with several Solemoviridae (BYDV, PLRV, CABYV) also documented changes in aphid vector dispersal preferences between infected and healthy plants after feeding on infected plants (Carmo-Sousa et al., 2016; Ingwell et al., 2012; Rajabaskar et al., 2014). This suggests that feeding on infected plants may change some aphid physiological aspects responsible for the capacity or motivation for foraging, with virus-specific effects and mechanisms that could be related to their mode of transmission. Motivation to walk or settle can be triggered by different abiotic (temperature, wind, rain...) and biotic (natural enemies, aphid population densities, host qualities...) factors (Claffin et al., 2017; Irwin et al., 2007). However, unlike the previously mentioned studies, our experiments were conducted with two healthy plants. In this condition, only the viruliferous status of the vector aphid is taken into account in the dispersion assays, and not the effect of virus infection on the host plant phenotype. Our results indicate that both TuYV- and CaMV- viruliferous apterous *M. persicae* may have an intrinsic lower motivational threshold for initiating and pursuing locomotor activities. Two hypotheses to explain the post-acquisition effects can be made on the underlying mechanisms: i) direct effects of the virus on the vector physiology, although and a recent study does not point in this direction (Marmonier et al., 2022); or ii) indirect effects, *i.e.*, components in the infected plants acquired by aphids. In both cases, the greater propensity of viruliferous aphids to move among adjacent plants is expected to promote virus transmission by modeling frameworks, regardless of the virus transmission mechanism (Roosien et al., 2013; Shaw et al., 2017). Our findings show evidence that both circulative persistent and non-circulative semi-persistent plant viruses can modify locomotor activity of aphid vectors in biologically meaningful ways.

A lower motivation threshold of viruliferous aphids to leave the plant might synergize with potential virus effects on aphid life history traits, such as survival, if these effects increase the odds of viruliferous aphids to find a suitable host plant (Blanc & Michalakis, 2016). On the contrary, our results show that the survival of aphids after leaving CaMV-infected plants was reduced by approximately one third, while aphids leaving TuYV-infected *Arabidopsis* survived about the same duration than control aphids. This drastic decline in the survival of *M. persicae* carrying CaMV is strongly correlated with their lower biomass observed after feeding three days on CaMV-infected *Arabidopsis*. To a lesser extent, the biomass of aphids on TuYV-infected plants is also reduced, as already observed in previous studies (Bogaert et al., 2020; Chesnais, Mauck, et al., 2019), but without affecting their survival after leaving the plant. The shorter survival of aphids on CaMV-infected plants could also be explained by the lower lipid reserves, which play a key role in survival duration of insects (Arrese & Soulages, 2010). This trend of reduced aphid biomass/size and lipid quantity has been previously shown for circulative viruses (Ghodoum Parizipour et al., 2021; Moiroux et al., 2018), but not yet described for non-circulative such as CaMV. Lipids are not correlated with fecundity in aphids (Gwynn et al., 2005), but could have other consequences on virus and vector dispersal since lipids are the main resource used for long-range flight in alate aphids (Liquido & Irwin, 1986; Yao & Katagiri, 2011). Our results on apterae vectors should first be confirmed on winged aphids before drawing any conclusions, as these are the most dispersing vector form. Overall, the CaMV

effects on aphids' life history traits could be seen as counter-adaptive, since it is difficult to reconcile a lower survival rate with a virus transmission facilitation. However this pattern resembles to the 'pull-push' strategy described for the CMV, another non-circulative virus (Carmo-Sousa et al., 2014). Indeed, both CMV and CaMV tend to promote vector settling and feeding behavior (Chesnais et al., 2021; Mauck et al., 2010), but quickly induce vector emigration which would promote their dispersal.

Post-acquisition effects observed on aphid physiology and behavior could be related to altered host plant quality. Viruses are known to affect plant nutritional quality, for example by altering ratios of carbohydrates to free amino acids in the phloem where aphids are feeding (Mauck et al., 2014). Our metabolic analysis has shown a substantially greater metabolic alteration induced by CaMV compared to TuYV infection, which is in accordance with the recent transcriptomic analysis performed on the same pathosystem (Chesnais et al., 2022). This result may be partially driven by the restriction of TuYV infection to phloem tissue in contrast to CaMV that infects all plant tissues, which is also closely related to virus mode of transmission. This close metabolomic similarity between a TuYV-infected plant and a healthy plant may explain the lack of (or reduced) effects of TuYV on the physiology of its aphid vector.

More in detail, our results showed that the sugars are significantly accumulated in the infected plants compared to healthy plants. Although we did not quantify levels of these metabolites in the phloem, they are likely also enhanced in this tissue (Nadwodnik & Lohaus, 2008; Shalitin & Wolf, 2000). Accumulation of sugars is expected to enhance palatability for aphids (Mittler et al. 1970; Chapman 2003), but, inversely, high sugar concentrations can increase osmotic stress and reduce aphid performance (Abisgold et al., 1994; Douglas et al., 2006). Since similar increase in sugar concentrations have been observed in both TuYV- and CaMV-infected plants, they cannot be responsible for the post-acquisition effects observed on aphid survival. Free amino acids were enhanced in CaMV-infected Arabidopsis but not in TuYV-infected plants, except threonine. Usually, a strong increase of amino acids could be beneficial to the aphids, as a low sugar to amino acids ratio is an important indicator of nutrition quality for phloem-feeding insects (Douglas, 2003). This is particularly true for glutamine and asparagine, which are the two amino acids preferentially taken up by aphids (Leroy et al., 2011). However, in our experiments, aphids' performances were reduced on CaMV-infected plants. Therefore, amino acids accumulations are unlikely to explain post-acquisition effects, at least not in their role as nutrients.

Amino acids, however, also play a role in plant immunity, either directly or as a precursor of defense pathways. The non-proteinogenic amino acids, γ -Aminobutyric acid (GABA) and pipercolic acid, which over-accumulated in CaMV-infected plants, are respectively involved in responses to biotic or abiotic stress (Bown & Shelp, 2016) and in the activation of systemic acquired resistance (SAR) in *A. thaliana* (Bernsdorff et al., 2016; Chen et al., 2018). In the same manner, tryptophan and phenylalanine also accumulated in CaMV-infected plants and are implicated in defense pathways allowing the production of salicylic acid (Lefevre et al., 2020), glucosinolates (Kim & Jander, 2007) and camalexin (Glawischnig et al., 2004), both former having repellent effects or even reducing *M. persicae* fecundity (Hopkins et al., 2009; Kettles et al., 2013). While the glucosinolates or phytoalexins did not vary in infected plants (except for glucoraphanin and methoxyglucobrassicin which slightly under-accumulated), SA and its derivatives were overrepresented for CaMV infected plants and might contribute to the reduced host quality and post-acquisition effects observed on aphid performances. Surprisingly, in other investigations, CaMV P6 protein

was found to be a repressor of SA that facilitates bacterial growth (Love et al., 2012; Zvereva et al., 2016). In all cases, it has been shown that virus infection frequently modifies the SA pathway, resulting in altered plant-insect interactions (Ding & Ding, 2020; Morkunas et al., 2011; Pan et al., 2021). Tomato infection by tomato spotted wilt virus (TSWV) is associated with upregulation of SA signaling (Tomitaka et al., 2015) which increases the attractiveness of its insect thrips vector. On the contrary, activation of SA pathway and signaling is required for a wide spectrum of defensive responses in *A. thaliana* against *Brevicoryne brassicae* (Kuśnierczyk et al., 2008), and is partially involved in the reduction of *Schizaphis graminum* aphid growth and reproduction on barley (Chaman et al., 2003). Because viral effects on hormones might fluctuate throughout infection, it would be interesting to evaluate SA accumulation, and its derivatives, at different time post-infection (Zhao et al., 2022), to confirm their role on the aphid physiology feeding on CaMV-infected plants.

To summarize, our results present strong evidence that both a circulative persistent and a non-circulative semi-persistent plant virus have post-acquisition effects on their vector behavior and physiology. These effects are virus-specific, and could be related to their mode of transmission. Both viruses seem to reduce the motivation threshold of viruliferous aphids to leave the plant, which is expected to increase virus transmission from plant to plant. For the circulative virus TuYV, which is retained in aphid for its whole life, has limited impact on its vector physiology, which is expected as reduced aphid survival or performance would be highly detrimental for this type of viruses (Sisterson & Stenger, 2016). On the contrary, CaMV has additional physiological effects on vector which could promote rapid aphid dispersal, and be part of a ‘pull-push’ strategy (Michele Carmo-Sousa et al., 2014). Our metabolite analysis of infected plants provides evidence that aphid performances are strongly affected by host plant quality, and SA pathway might be the main contributing factor. In line with analyses performed on plants, transcriptomic analyses have revealed contrasted patterns between TuYV and CaMV viruliferous *M. persicae* (Chesnais et al., 2022). A global metabolic analysis on viruliferous aphids could help deciphering the post-acquisition effects. While our work demonstrates the importance of considering post-acquisition effects, their importance in terms of viral transmission dynamics remains to be estimated. In addition, further experiments are needed to identify the underlying mechanisms and disentangle direct virus effects from plant-mediated effects on post-acquisition responses of aphids.

Materials and methods

Aphids

The *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: *Aphididae*) clone was originally isolated in the Netherlands. Aphids were reared on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *pekinensis* var. “Granaat”) in a growth chamber at 20 ± 1 °C and a 14/10 h light/dark photoperiod. Only wingless forms were used in the experiments. For synchronization, adults were placed on detached Chinese cabbage leaves that were laid on 1 % agarose in a Petri dish. The adults were removed 24 h later and the new-born larvae used in experiments 7 days later.

Plant growth, virus inoculation and aphid infestation

Seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 were germinated in TS 3 fine substrate (Klasmann-Deilmann, Geeste, Germany) in pots (70 mm x 70 mm x 65 mm) and cultivated at 8 h light / 16 h dark photoperiod at $20 \pm$

1°C. Two-week-old plants were inoculated with 3-5 wingless *Myzus persicae* aphids that had been allowed a 24 h acquisition access period on Arabidopsis infected with TuYV isolate FL1 (Veidt et al., 1988) or CaMV isolate Cabb B-JI (Delseny & Hull, 1983) or on healthy Arabidopsis. Plants were individually wrapped in clear plastic vented bread bags to prevent cross contamination. Aphids were manually removed with a brush after a 24 h inoculation period. Eighteen days post-inoculation (dpi) ten (or fifteen for migration essay) synchronized aphids were placed for infestation on the rosette of TuYV- or CaMV-infected or mock-inoculated plants. After 72 h infestation (= 21 dpi), aphids were gently removed with a brush and used for experimentations.

Aphid velocity

Dispersion behavior of viruliferous and non-viruliferous aphids were monitored on a target arena following the protocol described in Chesnais et al. (2020). One by one, an aphid, either viruliferous or not, was deposited in the center of a paper arena (285 mm diameter), which was divided into 10 concentric circles (“spatial zone”) spaced by 15 mm and covered with a transparent glass plate. After three measurements, the glass surface was cleaned with ethanol. To minimize external stimuli, the arena was enclosed with four white cardboard “walls” and a white LED was positioned above the arena for equal illumination. For each aphid, we determined the number of spatial zones crossed (parameter “Crossed area”) and the maximum zone reached (parameter “Farthest area”). The test was stopped if (i) the aphid crossed the 10th spatial zone and left the arena, or (ii) at the end of 300 s. Three blocks of ten aphids were used for each aphid status (TuYV- or CaMV-viruliferous and non-viruliferous) and the experiment was conducted twice.

Migration assay

Two Arabidopsis were sown in a circular pot (10 cm diameter). When the plants were 5-weeks-old (stage in which the plants are small and do not directly touch each other), fifteen aphids (TuYV- or CaMV-viruliferous or non-viruliferous) were released on one of the two plants. After 24 h, the number of aphids on each of the two plants was counted. Aphids found on the release plant were used to estimate the “retention”, while aphids found on the neighboring plant counted as “dispersion”. In total, eighteen replicates were performed for each condition (6 experiments * 3 repetitions per condition).

Survival and aphid biomass

Fifty viruliferous or non-viruliferous aphids, collected in batches of ten from five different plants, were individually placed in a glass hemolysis tube. No feeding was possible for these aphids. The mortality of the aphids was recorded 3 times a day, every day until all aphids were dead. Finally, the dry weight of the same aphids was measured with a microbalance Sartorius MSE3.6P-000DM, after incubation in an air oven at 32 °C for 48 hours in order to eliminate the water from the aphid bodies. This experiment was performed twice for the comparison CaMV-viruliferous vs. non-viruliferous and twice for the comparison TuYV-viruliferous vs. non-viruliferous aphids, respectively.

Aphid lipid quantification

The quantity of lipid in aphids was measured using a chloroform-methanol extraction method as described in Moiroux et al. (2018). Aphids were first dried in an air oven at 32 °C for 48 h and weighed with a microbalance. Aphids were then individually placed in a chloroform-Methanol solution (2:1, v:v) in glass

hemolysis tubes (500 μ l per tube) for 3 days. The extraction solution was removed and the aphids dried as indicated above and weighed a second time. Lipid content was calculated as the difference between dry mass before and after lipid extraction divided by the mass before extraction. For each modality, thirty aphids were weighed and the experiment was conducted twice (N = 60).

Enzymatic sugar measurement

D-fructose and D-glucose were extracted from 5 mg of lyophilized plant tissue. Plant powder was agitated 1 h in 1 ml of deionized water and centrifuged 5 minutes at 10,000 g. 50 μ l of carrez I solution (potassium hexacyanoferrate, 85 mM) and 50 μ l of carrez II solution (zinc sulfate, 250 mM) were successively added to 200 μ l of supernatant then mixed. 50 μ l of sodium hydroxide (100 mM) was added and the solution was mixed again. 200 μ l of deionized water was added and the solution was centrifuged at 10,000 g for 5 minutes. D-fructose and D-glucose content were then determined by enzymatic reaction at 340 nm using the K-SUFRG kit (Megazyme) according to the manufacturer's instructions except that all volumes have been divided by ten.

Metabolomic analysis

Lyophilized Arabidopsis leaf samples were ground using a bead mill (TissueLyser II, Qiagen, Hilden, Germany). Ten mg of leaf powder were extracted with 500 μ L of methanol supplemented with 5 μ g/mL of chloramphenicol as an internal standard. The homogenate was sonicated in an ultrasonic bath (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) for 10 min, then centrifuged at 12 000 rpm for 10 min. 200 μ L of the supernatants were recovered for LCMS analyses. Analyses were performed using a Vanquish Flex binary UHPLC system (Thermo Scientific, Waltham, MA). Chromatographic separations were performed on a Nucleodur C18 HTec column (150 \times 2 mm, 1.8 μ m particle size; Macherey-Nagel, Duren, Germany) maintained at 30 °C. The mobile phase consisted of acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v) (eluant A), and water/formic acid (0.1%, v/v) (eluant B), at a flow rate of 0.25 mL/min. The gradient elution program was as follows: 0 to 4 min, 80% to 70% B; 4 to 5 min, 70% to 50% B; 5 to 6.5 min, 50% B isocratic; 6.5 to 8.5 min, 0% B; and 8.5 to 10 min, 0% B isocratic. The injected volume of samples was 1 μ L. The liquid chromatography system was coupled to an Exploris 120 Q-Orbitrap MS system (Thermo Scientific, Waltham, MA). The mass spectrometer was operated with a heated electrospray ionization source in positive and negative ion modes. The key parameters were as follows: spray voltage, + 3.5 and -3.5 kV; nitrogen sheath gas flow rate, 40 arbitrary units (arb. unit); auxiliary-gas flow rate, 10 arb. unit; sweep-gas flow rate, 1 arb. unit; capillary temperature, 360°C and auxiliary-gas-heater temperature, 300 °C. The scan modes were full MS with a resolution of 60 000 FWHM (at m/z 200) and the scan range was m/z 85–1200. Internal mass calibration was operated using EASY-IC internal calibration source allowing single mass calibration for full mass range. Data acquisition and processing were carried out with Xcalibur 4.5 and Free Style 1.7 (Thermo Scientific, Waltham, MA), respectively.

Glucosinolates were identified based on published work (Glauser et al., 2012) and on expertized analysis of the corresponding mass spectra. For amino acids, flavonoid, hormones, scoparone and camalexine, identity was confirmed with the corresponding standard provided by Sigma-Aldrich (France). Further information was retrieved from the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.ad.jp/kegg/>) and PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) databases.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software version 4.0.5 (www.r-project.org/). The function `cor.test()` was used to calculate the significance of the correlation between the aphid biomass and their ability to survive without alimentation ($p < 0.05$). The Pearson method was used because the distribution of the data followed a normal distribution.

The function `chisq.test` was used to compare proportion of aphid leaving the target area ($p < 0.05$).

Differences in the amount of sugar obtained with enzymatic assay were determined with a one-way ANOVA using the function `aov()`.

Data representing the survival of aphids were modelled using the Cox proportional hazards (CPH) model. The assumption of the validity of proportional hazards was checked using the functions “`coxph`” and “`cox.zph`”, respectively (R packages: “`survival`” and “`RVAideMemoire`”).

We used Generalized Linear Mixed Model (GLMM) to determine a statistically significant difference between modalities for all other experiments. We included the factor “`session`” as a random variable (corresponding to the different repetitions), all other factors being considered as fixed effects. For all GLMM, we used the “`glmer`” function with a “Gaussian” distribution if the normality of the data was preserved (R package: “`lme4`”). For aphid velocity and migration assays, the data derived from a count and therefore were not normally distributed. Accordingly, we carried out a GLMM using Poisson distribution, a quasi-likelihood function was used to correct for overdispersion. For lipid quantity data, we used a gamma (link = “`inverse`”) distribution to correct for the non-normal distribution.

When a significant effect was detected, a pairwise comparison using estimated marginal means (R package “`emmeans`”; p-value adjustment with Tukey method) at the 0.05 significance level was used to test for differences between treatments.

The application conditions of all GLMM were verified by inspecting residuals and QQ plots. The normal distribution of data for other statistical tests was tested using the Shapiro-Wilk test at the 0.05 significance level.

Differential metabolomic analyses among the different conditions were performed using Tukey’s honest significant difference method followed by false discovery rate (FDR) correction using the Benjamini-Hochberg procedure (Benjamini & Hochberg, 1995). Metabolites of interest were considered differentially accumulated when the false discovery rate was below 5 % (FDR < 0.05).

Acknowledgments

We thank Claire Villeroy for aphid rearing and the experimental unit of INRAE Grand Est-Colmar (UEAV) for help with plant production. We are also grateful to Yann Leva for providing free access to a spectrophotometer for enzyme activity measures (Université de Haute Alsace, Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement - EA3991). This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) (reference ROME ANR-18-CE20-0017-01) (to MD). MV was supported by a Ph.D. fellowship from Université de Strasbourg. QC was supported by Région Grand Est

(Soutien aux jeunes chercheurs, reference 18_GE5_013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Abisgold, J. D., Simpson, S. J., & Douglas, A. E. (1994). Nutrient Regulation in the Pea Aphid *Acyrtosiphon-Pisum* - Application of a Novel Geometric Framework to Sugar and Amino-Acid Consumption. *Physiological Entomology*, *19*(2), 95–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1994.tb01081.x>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, *55*(1), 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, *57*(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bernsdorff, F., Döring, A. C., Gruner, K., Schuck, S., Bräutigam, A., & Zeier, J. (2016). Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and -independent pathways. *Plant Cell*, *28*(1), 102–129. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00496>
- Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, *52*(1), 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>
- Blanc, S., & Michalakakis, Y. (2016). Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 16, Issue Figure 2, pp. 36–43). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.007>
- Bogaert, F., Marmonier, A., Pichon, E., Boissinot, S., Ziegler-Graff, V., Chesnais, Q., Villeroy, C., Drucker, M., & Brault, V. (2020). Impact of mutations in arabidopsis thaliana metabolic pathways on polerovirus accumulation, aphid performance, and feeding behavior. *Viruses*, *12*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/v12020146>
- Bown, A. W., & Shelp, B. J. (2016). Plant GABA: Not Just a Metabolite. *Trends in Plant Science*, *21*(10), 811–813. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.001>
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Plaza, M., Garzo, E., & Fereres, A. (2016). Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Annals of Applied Biology*, *169*(2), 284–297. <https://doi.org/10.1111/aab.12300>
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E., & Fereres, A. (2014). A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, *186*, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.012>
- Carr, J. P., Tungadi, T., Donnelly, R., Bravo-Cazar, A., Rhee, S. J., Watt, L. G., Mutuku, J. M., Wamonje, F. O., Murphy, A. M., Arinaitwe, W., Pate, A. E., Cunniffe, N. J., & Gilligan, C. A. (2020). Modelling and manipulation of aphid-mediated spread of non-persistently transmitted viruses. *Virus Research*, *277*(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197845>
- Chaman, M. E., Copaja, S. V., & Argandoña, V. H. (2003). Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. *Journal*

of Agricultural and Food Chemistry, 51(8), 2227–2231. <https://doi.org/10.1021/jf020953b>

- Chen, Y. C., Holmes, E. C., Rajniak, J., Kim, J. G., Tang, S., Fischer, C. R., Mudgett, M. B., & Sattely, E. S. (2018). N-hydroxy-pipecolic acid is a mobile metabolite that induces systemic disease resistance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(21), E4920–E4929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1805291115>
- Chesnais, Q., Caballero, G., Roxane, V., Michel, C., Kerry, Y., Brault, V., & Ameline, A. (2020). Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>
- Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Comparative Plant Transcriptome Profiling of *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *Camelina sativa* var. Celine Infested with *Myzus persicae* Aphids Acquiring Circulative and Noncirculative Viruses Reveals Virus- and Plant-Specific Alterations Relevant to Aphid Fe. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00136-22>
- Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Verdier, M., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Transcriptome responses of the aphid vector *Myzus persicae* are shaped by identities of the host plant and the virus. *Peer Community Journal*, 2, e82. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.208>
- Chesnais, Q., Mauck, K. E., Bogaert, F., Bamière, A., Catterou, M., Spicher, F., Brault, V., Tepfer, M., & Ameline, A. (2019). Virus effects on plant quality and vector behavior are species specific and do not depend on host physiological phenotype. *Journal of Pest Science*, 92(2), 791–804. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01082-z>
- Chesnais, Q., Verdier, M., Burckbuchler, M., Brault, V., Pooggin, M., & Drucker, M. (2021). Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, March, 1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>
- Claflin, S. B., Power, A. G., & Thaler, J. S. (2017). Aphid density and community composition differentially affect apterous aphid movement and plant virus transmission. *Ecological Entomology*, 42(3), 245–254. <https://doi.org/10.1111/een.12381>
- Crossley, M. S., Lagos-Kutz, D., Davis, T. S., Eigenbrode, S. D., Hartman, G. L., Voegtlin, D. J., & Snyder, W. E. (2022). Precipitation change accentuates or reverses temperature effects on aphid dispersal. *Ecological Applications*, December 2021, 1–12. <https://doi.org/10.1002/eap.2593>
- Culver, J. N., & Padmanabhan, M. S. (2008). Virus-induced disease: Altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 221–243. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094422>
- Delseny, M., & Hull, R. (1983). Isolation and characterization of faithful and altered clones of the genomes of cauliflower mosaic virus isolates Cabb B-JI, CM4-184, and Bari I. *Plasmid*, 9(1), 31–41. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(83\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0147-619X(83)90029-X)
- Ding, P., & Ding, Y. (2020). Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science*, 25(6), 549–565. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.01.004>
- Douglas, A. E., Price, D. R. G., Minto, L. B., Jones, E., Pescod, K. V., François, C. L. M. J., Pritchard, J., & Boonham, N. (2006). Sweet problems: Insect traits defining the limits to dietary sugar utilisation by

- the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. *Journal of Experimental Biology*, 209(8), 1395–1403.
<https://doi.org/10.1242/jeb.02148>
- Douglas, Angela E. (2003). The Nutritional Physiology of Aphids. In *Advances in insect physiology* (Vol. 31, Issue 03, pp. 73–140). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(03\)31002-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(03)31002-1)
- Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A., & Davis, T. S. (2018). Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, 63, 169–191.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043119>
- Eigenbrode, S. D., Ding, H., Shiel, P., & Berger, P. H. (2002). Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 269(1490), 455–460.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1909>
- Eigenbrode, S. D., & Gomulkiewicz, R. (2022). Manipulation of Vector Host Preference by Pathogens: Implications for Virus Spread and Disease Management. *Journal of Economic Entomology*, Xx, 1–14.
<https://doi.org/10.1093/jee/toab261>
- Gandon, S. (2018). Evolution and Manipulation of Vector Host Choice. *The American Naturalist*, 192(1), 23–34. <https://doi.org/10.1086/697575>
- Ghodoum Parizipour, M. H., Tahmasebi, A., Shahriari, A. G., Khashman, M., & Hemmati, F. (2021). Luteoviruses affected energy reserves and fatty acid composition of their aphid vectors. *Journal of Phytopathology*, 169(6), 376–386. <https://doi.org/10.1111/jph.12993>
- Glauser, G., Schweizer, F., Turlings, T. C. J., & Reymond, P. (2012). Rapid Profiling of Intact Glucosinolates in Arabidopsis Leaves by UHPLC-QTOFMS Using a Charged Surface Hybrid Column. *Phytochemical Analysis*, 23(5), 520–528. <https://doi.org/10.1002/pca.2350>
- Glawischnig, E., Hansen, B. G., Olsen, C. E., & Halkier, B. A. (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8245–8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305876101>
- Gray, S., & Gildow, F. E. (2003). Luteovirus-Aphid Interactions*. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 539–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815>
- Gwynn, D. ., Callaghan, A., Gorham, J., Walters, K. F. ., & Fellowes, M. D. . (2005). Resistance is costly: trade-offs between immunity, fecundity and survival in the pea aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1574), 1803–1808. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3089>
- Heil, M. (2016). Host manipulation by parasites: Cases, patterns, and remaining doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4(JUN). <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00080>
- Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 327–359.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Hopkins, R. J., van Dam, N. M., & van Loon, J. J. A. (2009). Role of Glucosinolates in Insect-Plant Relationships and Multitrophic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 57–83.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090623>

- Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D., & Bosque-Pérez, N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00578>
- Irwin, M. E., Kampmeier, G. E., & Weisser, W. W. (2007). Aphid movement: process and consequences. In *Aphids as crop pests* (Issue February 2017, pp. 153–186). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851998190.0153>
- Kettles, G. J., Drurey, C., Schoonbeek, H. J., Maule, A. J., & Hogenhout, S. A. (2013). Resistance of *Arabidopsis thaliana* to the green peach aphid, *Myzus persicae*, involves camalexin and is regulated by microRNAs. *New Phytologist*, 198(4), 1178–1190. <https://doi.org/10.1111/nph.12218>
- Kim, J. H., & Jander, G. (2007). *Myzus persicae* (green peach aphid) feeding on *Arabidopsis* induces the formation of a deterrent indole glucosinolate. *Plant Journal*, 49(6), 1008–1019. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03019.x>
- Kuśnierczyk, A., Winge, P., Jørstad, T. S., Troczyńska, J., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2008). Towards global understanding of plant defence against aphids - Timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) attack. *Plant, Cell and Environment*, 31(8), 1097–1115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01823.x>
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11(April), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Lefèvre, T., Koella, J. C., Renaud, F., Hurd, H., Biron, D. G., & Thomas, F. (2006). New Prospects for Research on Manipulation of Insect Vectors by Pathogens. *PLoS Pathogens*, 2(7), e72. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020072>
- Leroy, P. D., Wathelet, B., Sabri, A., Francis, F., Verheggen, F. J., Capella, Q., Thonart, P., & Haubruge, E. (2011). Aphid-host plant interactions: Does aphid honeydew exactly reflect the host plant amino acid composition? *Arthropod-Plant Interactions*, 5(3), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s11829-011-9128-5>
- Levin, D. M., & Irwin, M. E. (1995). Barley yellow dwarf luteovirus effects on tethered flight duration, wingbeat frequency, and age of maiden flight in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera, Aphididae). *Environmental Entomology*, 24(2), 306–312.
- Liquido, N. J., & Irwin, M. E. (1986). Longevity, fecundity, change in degree of gravidity and lipid content with adult age, and lipid utilisation during tethered flight of alates of the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Annals of Applied Biology*, 108(3), 449–459. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb01984.x>
- Love, A. J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B. W., Loake, G. J., Tada, Y., Sadanandom, A., & Milner, J. J. (2012). Cauliflower mosaic virus Protein P6 Inhibits Signaling Responses to Salicylic Acid and Regulates Innate Immunity. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047535>
- Marmonier, A., Velt, A., Villeroy, C., Rustenholz, C., Chesnais, Q., & Brault, V. (2022). Differential gene expression in aphids following virus acquisition from plants or from an artificial medium. *BMC Genomics*, 23(1), 333. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08545-1>
- Mauck, K. E., Bosque-Pérez, N. A., Eigenbrode, S. D., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2012). Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: Evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, 26(5), 1162–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>

- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. (2014). Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell and Environment*, 37(6), 1427–1439. <https://doi.org/10.1111/pce.12249>
- Mauck, K. E., De Moraes, C., & Mescher, M. (2016). Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.012>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2014). Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions. *Integrative and Comparative Biology*, 54(2), 193–209. <https://doi.org/10.1093/icb/icu012>
- Mauck, K. E., & Chesnais, Q. (2020). A synthesis of virus-vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Research*, 197957. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197957>
- Mauck, K. E., Chesnais, Q., & Shapiro, L. R. (2018). Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2010). Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107>
- Mauck, K. E., Kenney, J., & Chesnais, Q. (2019). Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 33(Figure 1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.001>
- Moiroux, J., Chesnais, Q., Spicher, F., Verrier, E., Ameline, A., & Couty, A. (2018). Plant virus infection influences bottom-up regulation of a plant-aphid-parasitoid system. *Journal of Pest Science*, 91(1), 361–372. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0911-7>
- Moreno, A., Tjallingii, W. F., Fernandez-Mata, G., & Fereres, A. (2012). Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *Journal of General Virology*, 93(3), 662–667. <https://doi.org/10.1099/vir.0.037887-0>
- Morkunas, I., Mai, V. C., & Gabryś, B. (2011). Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2057–2073. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0751-7>
- Nadwodnik, J., & Lohaus, G. (2008). Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta*, 227(5), 1079–1089. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0682-0>
- Ng, J. C. K., & Zhou, J. S. (2015). Insect vector-plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: Current perspectives and future challenges. *Current Opinion in Virology*, 15, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.006>
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., & Fereres, A. (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83(12), 3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163>
- Pan, L., Miao, H., Wang, Q., Walling, L. L., & Liu, S. (2021). Virus-induced phytohormone dynamics and

- their effects on plant–insect interactions. *New Phytologist*, 230(4), 1305–1320.
<https://doi.org/10.1111/nph.17261>
- Patton, M. F., Bak, A., Sayre, J. M., Heck, M. L., & Casteel, C. L. (2020). A polerovirus, Potato leafroll virus, alters plant–vector interactions using three viral proteins. *Plant, Cell & Environment*, 43(2), 387–399. <https://doi.org/10.1111/pce.13684>
- Poulin, R. (2010). Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. In *Advances in the Study of Behavior* (1st ed., Vol. 41, Issue C). Elsevier Inc.
[https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
- Rajabaskar, D., Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2014). Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Research*, 186, 32–37.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.005>
- Rajabaskar, D., Wu, Y., Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2013). Dynamics of Myzus persicae arrestment by volatiles from Potato leafroll virus-infected potato plants during disease progression. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148(2), 172–181.
<https://doi.org/10.1111/eea.12087>
- Roosien, B. K., Gomulkiewicz, R., Ingwell, L. L., Bosque-Pérez, N. A., Rajabaskar, D., & Eigenbrode, S. D. (2013). Conditional Vector Preference Aids the Spread of Plant Pathogens: Results From a Model. *Environmental Entomology*, 42(6), 1299–1308. <https://doi.org/10.1603/en13062>
- Shalitin, D., & Wolf, S. (2000). Cucumber mosaic virus infection affects sugar transport in melon plants. *Plant Physiology*, 123(2), 597–604. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.597>
- Shaw, A. K., Peace, A., Power, A. G., & Bosque-Pérez, N. A. (2017). Vector population growth and condition-dependent movement drive the spread of plant pathogens. *Ecology*, 98(8), 2145–2157.
<https://doi.org/10.1002/ecy.1907>
- Shi, X. bin, Deng, J., Zhang, Z., Yan, S., Zheng, L. min, Sun, S. e., Gao, Y., Zhou, X. guo, Zhang, D. yong, & Liu, Y. (2021). Initial ingestion of CMV-infected plants reduces subsequent aphid performance. *Arthropod-Plant Interactions*, 15(2), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s11829-021-09804-w>
- Sisterson, M. S. (2008). Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: Insights from a model. *Journal of Economic Entomology*, 101(1), 1–8.
[https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[1:EOIPFH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[1:EOIPFH]2.0.CO;2)
- Sisterson, M. S., & Stenger, D. C. (2016). Disentangling effects of vector birth rate, mortality rate, and abundance on spread of plant pathogens. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 487–501.
<https://doi.org/10.1093/jee/tov329>
- Thresh, J. M. (1978). The epidemiology of plant virus diseases. *Plant Disease Epidemiology*, 79–91.
- Tomitaka, Y., Abe, H., Sakurai, T., & Tsuda, S. (2015). Preference of the vector thrips *Frankliniella occidentalis* for plants infected with thrips-non-transmissible Tomato spotted wilt virus. *Journal of Applied Entomology*, 139(4), 250–259. <https://doi.org/10.1111/jen.12165>
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazevieille, C., Cot, D., & Blanc, S. (2010). The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure and Development*, 39(4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.02.005>

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(46), 17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104>
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., & Jonard, G. (1988). Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Research*, *16*(21), 9917–9932. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9917>
- Verdier, M., Chesnais, Q., Piroilles, E., Blanc, S., & Drucker, M. (2023). The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission. *PLOS Pathogens*, *19*(2), e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>
- Yao, I., & Katagiri, C. (2011). Comparing wing loading, flight muscle and lipid content in ant-attended and non-attended *Tuberculatus* aphid species. *Physiological Entomology*, *36*(4), 327–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2011.00801.x>
- Zhao, Y., Cao, X., Zhong, W., Zhou, S., Li, Z., An, H., Liu, X., Wu, R., Bohora, S., Wu, Y., Liang, Z., Chen, J., Yang, X., Zhou, G., & Zhang, T. (2022). A viral protein orchestrates rice ethylene signaling to coordinate viral infection and insect vector-mediated transmission. *Molecular Plant*, *15*(4), 689–705. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.01.006>
- Zhou, J. S., Drucker, M., & Ng, J. C. (2018). Direct and indirect influences of virus–insect vector–plant interactions on non-circulative, semi-persistent virus transmission. *Current Opinion in Virology*, *33*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.004>
- Zvereva, A. S., Golyaev, V., Turco, S., Gubaeva, E. G., Rajeswaran, R., Schepetilnikov, M. V., Srour, O., Ryabova, L. A., Boller, T., & Pooggin, M. M. (2016). Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytologist*, *211*(3), 1020–1034. <https://doi.org/10.1111/nph.13967>

Chapitre 4 : Etude des effets du TuYV et du
CaMV sur le transcriptome de *Myzus*
persicae

Résumé du chapitre 4

CONTEXTE

Nous avons montré dans les chapitres précédents que le TuYV et le CaMV possédaient tous deux des génomes codants pour des protéines qui influencent le comportement de leur vecteur *Myzus persicae*. Les virus de plantes peuvent influencer le comportement de leur vecteur par des effets indirects médiés par une altération de la physiologie de la plante hôte. Alors que les altérations de l'hôte sont bien décrites, surtout au niveau transcriptomique, que ce soit pour le TuYV et le CaMV, les dérégulations du transcriptome chez le vecteur sont cependant inconnues pour ces deux virus. Leurs identifications pourraient permettre de caractériser les réponses comportementales ou physiologiques observées chez les pucerons se nourrissant sur des plantes infectées, mais également les répercussions post-acquisitions.

HYPOTHESE(S) ET OBJECTIF(S)

Dans ce chapitre de thèse, nous faisons l'hypothèse que le TuYV et le CaMV modifient le comportement du puceron vecteur dans un sens favorisant la transmission et qu'au moins une partie de ces changements est due aux changements du transcriptome de leur puceron vecteur. Tout d'abord, des travaux de transcriptomiques sur les pucerons vecteurs ont été menés, et une liste de l'ensemble des gènes dérégulés (differentially expressed genes, DEGs) a été obtenue. Dans un second temps, nous avons sélectionné les gènes candidats les plus prometteurs et testé leur implication dans les modifications du comportement de *Myzus persicae* favorisant potentiellement la transmission. Pour cela, nous avons évalué l'efficacité de transmission, ou bien des traits comportementaux et physiologiques pouvant influencer la dynamique de transmission (comportement alimentaire, performance, masse).

METHODE

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur le puceron *Myzus persicae* après trois jours d'alimentation sur des Arabidopsis et des Camelines infectées par le TuYV, le CaMV ou saines. Les résultats ont été analysés i) selon les dérégulations provoquées chez *M. persicae* par le même virus sur deux hôtes différents, ii) selon les dérégulations chez *M. persicae* étant spécifiques à la plante hôte, peu importe le virus, puis ii) en faisant un focus plus particulier sur les gènes potentiellement impliqués dans les réponses comportementales/physiologiques de pucerons. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous avons initié des travaux de validation fonctionnelle. Les travaux de validation de gènes candidats des pucerons sont chronophages. La transgénèse pour produire des pucerons knock-down ou surexpresser n'étant maîtrisée que par quelques groupes de recherche, la validation des gènes de pucerons ce fait généralement par silencing (réduction de l'expression d'un gène), une technique pour laquelle existe plusieurs approches expérimentales qui impliquent toutes de nombreuses étapes et dont la réussite n'est pas garantie. Il est donc nécessaire de se limiter à un faible nombre de gènes candidats. Nous nous sommes essentiellement concentrés sur des gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans le comportement alimentaire étant donné que ce comportement impacte fortement la vection. Afin de réduire l'expression des gènes candidats chez les pucerons, nous avons utilisé la technique de virus-induced gene silencing (VIGS) avec un tobacco rattle virus (TRV) recombinant codant pour des ARN doubles brins (ARNdb) dirigés

contre un gène cible, dans notre cas un gène du puceron. Durant le développement de l'infection du TRV dans *Arabidopsis*, des ARNdb contenant la séquence du candidat vont être produits puis vont induire le mécanisme de RNA silencing chez les pucerons s'alimentant sur la plante infectée.

L'analyse du transcriptome des pucerons a révélé une importante proportion de gènes communément dérégulés par les deux virus et/ou par les deux hôtes. Nous avons également identifié des gènes spécifiquement dérégulés par l'infection par le CaMV ou le TuYV, qui pourraient être liés au mode de transmission viral. Le TuYV a tendance à affecter les gènes du développement, tandis que le CaMV a un fort impact sur les gènes liés à l'alimentation et en particulier codant pour des protéines salivaires. Nous avons aussi généré une liste de gènes candidats potentiellement responsables des effets observés sur le comportement des pucerons. La technique de VIGS a permis d'induire une réduction significative d'expression des différents gènes candidats d'environ 35 % chez les pucerons. La réduction de l'expression du gène codant pour une Mucine [mucin-2-like protein (g27683)] a diminué le taux de transmission du TuYV. Les pucerons dont la Mucine est silencée, éprouvent également des difficultés à s'alimenter (réduction d'ingestion de sève et augmentation du déraillement des stylets) et ont une masse réduite. L'étude de l'expression de ce gène par RT-qPCR a montré que la Mucine était préférentiellement transcrite dans la tête des pucerons en comparaison du reste du corps. Les pucerons silencés pour le gène ACE1 [angiotensin-converting enzyme-like protein (g22588)] ingèrent environ deux fois plus de sève que les pucerons contrôles, cependant aucun effet n'a été relevé sur la transmission. La réduction d'expression du gène de l'Astacine [metalloprotease protein (g7709)] n'a produit aucun effet sur les paramètres testés. Enfin, la réduction d'expression des différents autres candidats n'a eu aucun effet sur les performances de *Myzus persicae*.

Les dérégulations des gènes du développement du puceron induits par le TuYV pourraient favoriser une augmentation de la proportion d'individus ailés dans la population de vecteurs virulifères, et accroître la dispersion de virus CP. Concernant le CaMV, les effets observés sur les gènes liés à l'alimentation des pucerons, particulièrement ceux liés à des protéines salivaires, pourraient éclairer les altérations de « probing » et de l'alimentation, toutes deux favorables à l'acquisition de ce virus. Globalement, les dérégulations transcriptomiques semblent adaptées aux modes de transmission des deux virus, et pourraient participer à des effets de type « manipulation ».

La réduction de l'expression de la Mucine impacte négativement à la fois la transmission du TuYV et le comportement des pucerons, environ 20% du temps passé dans la plante correspond à des déraillements des stylets et donc à une absence d'alimentation. Le TuYV étant limité aux tissus du phloème, cette perturbation du comportement alimentaire pourrait expliquer la réduction de transmission, mais également la masse plus faible des pucerons. Les Mucines, déjà caractérisées chez d'autres hémiptères comme le fulgore *Nilaparvata lugens* (Famille : *Delphacidae* ; Genre *Nilaparvata*), sont des composants majeurs de la salive aqueuse et gélifiante, nécessaires à une bonne alimentation. Leurs homologues chez les pucerons pourraient avoir des fonctions similaires dans la lubrification et la protection de la surface des stylets. L'expression préférentielle de la Mucine dans la tête plutôt que dans les corps des pucerons conforte cette

hypothèse. La caractérisation approfondie du rôle de cette protéine chez *Myzus persicae* est nécessaire. Dans l'analyse transcriptomique, le gène de la Mucine était sur-exprimé uniquement en présence du CaMV et non du TuYV. Cependant, la réduction de son expression n'affecte pas la transmission du CaMV, le caractère adaptatif de cette dérégulation lors de l'infection est donc peu probable. Toutefois, ce gène semble important pour l'alimentation des pucerons. Un autre effet observé dans cette étude est l'augmentation conséquente de la durée d'ingestion de sève lors de la réduction d'expression du gène ACE1. Cet effet provoqué par le silencing d'ACE1 a déjà été montré chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*. Cependant dans notre étude, cette modification du comportement alimentaire est sans conséquence sur la transmission du TuYV ou celle du CaMV.

Les points marquants :

- ◆ L'analyse transcriptomique des pucerons s'alimentant sur des plantes infectées par le TuYV et le CaMV a permis d'identifier des effets virus-spécifiques qui pourraient être liés avec les altérations comportementales et physiologiques révélées dans les chapitres précédents.
- ◆ La technique de VIGS a permis de réduire efficacement l'expression des gènes candidats.
- ◆ La réduction de l'expression de la Mucine affecte négativement la transmission du TuYV et altère fortement le comportement alimentaire de *Myzus persicae*, sous-entendant un rôle important de la protéine dans les interactions plante-insecte-virus, mais pas directement pour la transmission.
- ◆ Etant préférentiellement exprimée dans la tête, la Mucine pourrait être sécrétée dans la salive par le puceron et impliquée dans la formation de la gaine salivaire. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ce rôle.
- ◆ Les effets comportementaux ou physiologiques observés lors du silencing des candidats sélectionnés ne valident pas ces candidats comme étant impliqués dans la manipulation de *Myzus persicae* par le TuYV ou le CaMV pour favoriser leurs transmissions.

RESEARCH ARTICLE

Published
AAAA-MM-DD

Cite as

Quentin Chesnais, Victor Golyaev, Amandine Velt, Camille Rustenholz, Maxime Verdier, Véronique Brault, Mikhail M Pooggin and Martin Drucker (2022) *Transcriptome responses of the aphid vector Myzus persicae are shaped by identities of the host plant and the virus*, Peer Community Journal, 2: XX.

Correspondence

mikhail.pooggin@inrae.fr
martin.drucker@inrae.fr

Peer-review

Peer reviewed and
recommended by

PCI Infections,

<https://doi.org/10.24072/pci.infections.100006>



This article is licensed
under the Creative Commons
Attribution 4.0 License.

Transcriptome responses of the aphid vector *Myzus persicae* are shaped by identities of the host plant and the virus

Quentin Chesnais¹, Victor Golyaev², Amandine Velt¹, Camille Rustenholz¹, Maxime Verdier¹, Véronique Brault¹, Mikhail M Pooggin², and Martin Drucker¹

Volume 2 (2022), article XX

<https://doi.org/10.24072/pcjournal.208>

Abstract

Background: Numerous studies have documented modifications in vector orientation behavior, settling and feeding behavior, and/or fecundity and survival due to virus infection in host plants. These alterations are often expected to enhance virus transmission, which has led to the hypothesis that such effects are vector manipulations by the virus. However, until now, the gene expression changes correlating with these effects and indicative of modified vector pathways and mechanisms are mostly unknown.

Results: Transcriptome profiling of *Myzus persicae* aphids feeding on turnip yellows virus (TuYV) and cauliflower mosaic virus (CaMV) infected *Arabidopsis thaliana* and *Camelina sativa* revealed a substantial proportion of commonly deregulated genes, amongst them many with general functions in plant-virus-aphid interactions. We identified also aphid genes specifically deregulated by CaMV or TuYV infection, which might be related to the viral transmission mode. Furthermore, we observed strong host-specific differences in the gene expression patterns with plant virus infection causing more deregulations of aphid genes on *A. thaliana* than on *C. sativa*, likely related to the differences in susceptibility of the plant hosts to these viruses. Finally, stress-related aphid genes were downregulated in *M. persicae* on both infected plants, regardless of the virus.

Conclusions: TuYV, relying on the circulative persistent mode of transmission, tended to affect developmental genes. This could increase the proportion of alate aphids, but also affect their locomotion, neuronal activity, and lifespan. CaMV, using the non-circulative non-persistent mode of transmission, had a strong impact on feeding-related genes and in particular those related to salivary proteins. In general, these transcriptome alterations targeted pathways that seem to be particularly adapted to the transmission mode of the corresponding virus and could be evidence of vector manipulation by the virus.

¹SVQV, UMR1131, INRAE Centre Grand Est – Colmar, Université Strasbourg, France, ²PHIM, Plant Health Institute, University of Montpellier, INRAE, CIRAD, IRD, Institute Agro, Montpellier, France, #Equal contribution

Introduction

Aphids are major pests not only because they deprive plants of nutrient resources when feeding on phloem sap but also because they transmit many plant-pathogenic viruses. Indeed, most plant viruses rely on vectors for transmission to a new susceptible host (Dietzgen et al., 2016). As phloem-feeders, aphids play a preponderant role in plant virus transmission, because their particular feeding behavior allows direct delivery of virus particles into the cytoplasm of cells in the epidermis, mesophyll, vascular tissue and/or the phloem sap of a new host. Their hypodermic needle-like mouthparts, the stylets, can penetrate cuticle and cell walls and enter into plant cells and sieve tubes without inflicting any major damage. More precisely, aphids alighting on a new plant will initiate probing phases (i.e. test the potential host for suitability) consisting of extracellular pathways and exploratory intracellular punctures into the epidermis and underlying tissues and, if accepted, plunge then their stylets into the sieve cells whose sap constitutes their principal food source (Tjallingii & Hogen Esch, 1993). During the probing and feeding phases, aphids secrete different saliva types that contain amongst other compounds effector molecules modulating interactions with the plant immune system and susceptibility (Rodriguez & Bos, 2013).

Viral infection often modifies plant phenotypical traits such as leaf color, morphology, surface properties, composition and quantity of volatile organic compounds (VOCs) and metabolites (Matthews, 2014). This may impact vector behavior and performance, i.e. attract/deter vectors, modify their feeding behavior and incite/discourage colonization (reviewed by Fereres & Moreno, 2009). There is evidence that such virus-mediated modifications can facilitate virus transmission, a concept known as ‘pathogen manipulation’. The modifications depend on the viruses’ modes of transmission (Mauck et al., 2012, 2018). So-called non-persistent/non-circulative viruses have fast transmission kinetics and are acquired and inoculated, but also lost from the vectors, within seconds to minutes (Day & Irzykiewicz, 1954). The non-circulative viruses rely on other parameters for optimal transmission than so-called persistent/circulative viruses that have slow transmission kinetics (hours to days) as the virus is injected as a saliva component into a new host, following the passage of viral particles from the intestine to the salivary glands through the hemolymph. Consequently, vectors retain and transmit the circulative viruses for weeks or lifelong (reviewed by Gray & Banerjee, 1999).

How virus-mediated plant modifications translate into changes in vector behavior and performance, is largely unknown (reviewed by Fereres & Moreno, 2009; Dáder et al., 2017; Mauck et al., 2019). It is assumed that most of the modifications are indirect, i.e. aphids and other vectors react to virus-induced changes in the plant. For example, yellowing symptoms induced by virus infection may attract and encourage the settling of insect vectors (for example, Johnston & Martini, 2020; Chesnais et al., 2022). A well-characterized example of such plant modifications by non-persistent, non-circulative viruses is the cucumber mosaic virus (CMV, genus *Cucumovirus*, family *Bromoviridae*). VOCs emitted by CMV-infected squash attract the green peach aphid (*Myzus persicae*, hereafter Myzus), but once landed on the infected squash, the poor palatability of the plant incites the aphids to leave fast (Mauck et al., 2010, 2014). This aphid behavior is perfectly adapted to an efficient acquisition and transmission of CMV which relies on a short acquisition time and a rapid dispersal for propagation (Bhargava, 1951). Therefore, this example might be considered as ‘host manipulation’. Although there are more examples in the literature (reviewed by Fereres & Moreno, 2009; Dáder et al., 2017), host-induced vector manipulation by non-persistent/non-circulative viruses is rather under-explored. The non-circulative virus studied here – cauliflower mosaic virus (CaMV, genus *Caulimovirus*, family *Caulimoviridae*) – follows the same transmission kinetics as CMV except that it is retained longer (hours range) in its aphid vectors (Markham et al., 1987) and therefore its transmission mode has been classified also as ‘semi-persistent’, a term coined by Sylvester (1956). Previous work (Chesnais et al., 2019) showed that Myzus vectors did not show any preference for *Camelina sativa* (hereafter Camelina) plants infected with the severe CaMV isolate B-JI, but the number of intracellular probing punctures was increased and phloem ingestion and fecundity reduced on infected plants. Using CaMV-infected *Arabidopsis thaliana* (hereafter Arabidopsis) as virus host, Myzus spent less time in the pathway phase and more time feeding on phloem and aphid fecundity was lowered, compared to healthy control plants (Chesnais et al., 2021). A similar feeding behavior was observed for Myzus feeding on Arabidopsis infected with the milder CaMV isolate Cm1841r but in contrast to plants infected with the B-JI

isolate, fecundity was not affected (Chesnais et al., 2021). Thus, there are contrasting results on possible manipulation of host plants by CaMV that might depend on the virus isolate and host plant species.

Quite a body of evidence for ‘manipulation’ by persistent/circulative viruses has been collected for poleroviruses (genus *Polerovirus*, family *Solemoviridae*). Most studies on poleroviruses have shown that virus-infected plants are more attractive to aphids than healthy plants and that aphid feeding is improved and fecundity higher on infected plants (reviewed by Bosque-Pérez & Eigenbrode, 2011; Dáder et al., 2017; Mauck et al., 2018). Curiously, aphid preference changed after polerovirus acquisition, and aphids carrying poleroviruses preferred healthy plants over virus-infected plants (Alvarez et al., 2007; Carmo-Sousa et al., 2016). There is evidence that purified virus particles can bring along this preference change (Ingwell et al., 2012), indicating that for persistent/circulative viruses, not only host plant-mediated changes but also direct virus-mediated changes in aphids are to be considered. The circulative virus studied here, turnip yellows virus (TuYV, genus *Polerovirus*, family *Solemoviridae*), increases emission of VOCs in two host plants, *Arabidopsis* and *Camelina*, but only TuYV-infected *Camelina*, and not TuYV-infected *Arabidopsis*, attracted *Myzus* more than did healthy control plants (Claudel et al., 2018). Aphids feed longer from the phloem of TuYV-infected *Camelina* than from that of healthy *Camelina*, which might favor the acquisition of phloem-limited TuYV (Chesnais et al., 2019). Recently, a post-acquisition effect of TuYV was observed: virus-carrying *Myzus* aphids showed increased vector locomotory and fecundity as well as prolonged phloem feeding behavior. However, in this study, the authors did not distinguish between direct effects of the virus on the vector and indirect effects mediated by the infected host plant (Chesnais et al., 2020).

While virus-mediated effects on aphids and other hemipteran vectors are well documented, knowledge on the molecular mechanisms and the involved aphid genes is scarce. Published examples indicate that deregulation of aphid genes related to stress, cuticle, development and nucleic factors is a common feature of aphids feeding on plants infected with poleroviruses or luteoviruses (Brault et al., 2010; Li et al., 2020; Patton et al., 2021). For non-circulative viruses, the effect of viral infection of plants on aphids seems more variable. CMV acquisition by *Myzus* from infected tobacco changed the expression of vector genes related to metabolism, stress, and cuticle (Liang et al., 2021), whereas a study on the soybean aphid *Aphis glycines* fed on soybean plants infected with soybean mosaic virus (SMV, genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) has revealed only minor changes in aphid gene expression (Cassone et al., 2014).

In this paper, we explored how infection of plants with circulative versus non-circulative virus affects the transcriptome of viruliferous aphids. We specifically addressed whether the transmission mode influenced the aphid transcriptome profiles and whether alterations in the aphid transcriptome correlated with distinct behaviors of viruliferous aphids. We identified common and virus-specific deregulated genes as well as plant host-specific effects on aphids. The aphid *M. persicae* was selected for this study because it is an excellent vector for both the circulative, persistent TuYV and the non-circulative, semi-persistent CaMV. On the plant side, we selected two species of the same family *Brassicaceae*, *A. thaliana* and *C. sativa* that are suitable hosts for both viruses.

Material and methods

Aphids

The green peach aphid (*Myzus persicae* Sulzer, 1776) clone WMp2, originally isolated in the Netherlands (Reinink et al., 1989) and maintained in Colmar since 1992, was used for the experiments. It was reared on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *pekinensis* var. Granaat) in a growth chamber at 20±1 °C and a 16 h photoperiod. Plants were grown in TS 3 fine substrate (Klasmann-Deilmann) in round 13 cm diameter pots and watered with fertilizer 209 (Fertil SAS) dissolved in tap water. Only wingless morphs were used in assays. For synchronization, adults were placed on detached Chinese cabbage leaves that were laid on 1 % agarose (Euromedex) in a Petri dish. The adults were removed 24 h later and the newborn larvae used in transcriptomic experiments 5 days later.

Viruses

CaMV isolate Cm1841r (Chesnais et al., 2021), which is an aphid-transmissible derivative of isolate Cm1841 (Tsuge et al., 1994), and TuYV isolate TuYV-FL1 (Veidt et al., 1988) were maintained in *Arabidopsis* Col-0 and propagated by aphid inoculation of 2-week-old plants. Plant growth conditions were as described below.

Virus infection and aphid infestation

Seeds of *Arabidopsis thaliana* Col-0 or *Camelina sativa* var. Celine were germinated in TS 3 fine substrate (Klasmann-Deilmann) in 7*7 cm pots and watered with tap water. Growth conditions were 14 h day 10 h night with LED illumination and a constant temperature of 21±1 °C. Two-week-old plants were inoculated with 3-5 wingless Myzus aphids that had been allowed a 24 h acquisition access period on *Arabidopsis* infected with TuYV or CaMV or on healthy *Arabidopsis*. Plants were individually wrapped in clear plastic vented bread bags to prevent cross contamination. Aphids were manually removed after a 48 h inoculation period. Eighteen days post-inoculation (dpi), 25 to 30 synchronized 5-day-old non-viruliferous aphids were placed for infestation on the rosette (*Arabidopsis*) or the apical leaves (*Camelina*) of CaMV- or TuYV-infected or mock-inoculated plants. After 72 h infestation (= 21 dpi), aphids were collected with a brush. Three biological replicates were used for analysis. For *Arabidopsis*, one biological replicate consisted of 4 plants, from which 25-30 aphids were collected (total of 100-120 aphids). For *Camelina*, one replicate was 3 plants from which 30 aphids were collected (total of 90-100 aphids). Aphid samples were deep-frozen by placing them in a -80 °C freezer and conserved at this temperature until processing.

RNA purification and Illumina sequencing

Total RNA was extracted from aphids with TRI Reagent (Molecular Research Center) and chloroform followed by isopropanol (Merck) precipitation. Briefly, 10-50 mg of frozen aphids were placed in a mortar cooled with liquid N₂, homogenized in 1 ml TRI Reagent and incubated for 2 hours at room temperature. Subsequent phase separation by addition of 200 µl cold chloroform (Merck) and centrifugation for 15 min at 12,000 g was followed by RNA precipitation with 500 µl cold isopropanol. After 10 min centrifugation at 12,000 g, the RNA pellet was washed twice with 1 ml of 75 % ethanol (Merck), air-dried and resuspended in 30 µl RNase-free water (Merck). RNA quantity and purity were measured using NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrity was verified by capillary electrophoresis on LabChip GX (Perkin Elmer).

Illumina sequencing of 18 aphid total RNA samples was performed at Fasteris (www.fasteris.com) using a standard protocol with the TruSeq Stranded mRNA Library Prep kit (Illumina). All the libraries (3 biological replicates per each of the six conditions [i.e., aphids on mock-inoculated, TuYV- and CaMV- infected *Arabidopsis* and aphids on mock-inoculated, TuYV- and CaMV- infected *Camelina*]) were multiplexed in one NovaSeq flowcell SP-200 with 2x75 nt paired-end customized run mode. The resulting 75 nt reads from each library were used for Myzus transcriptome profiling.

RT-qPCR

For RT-qPCR analysis of Myzus gene expression, 10 µg total RNA was converted into cDNA using AMV Reverse Transcriptase (Promega) and oligo-dT primer. Real-time qPCR reactions (10 µl) including 3 µl of cDNA, 0.5 µl of each 10 µM primer, 5 µl of SybrGreen master mix (Roche) and 1 µl of water were processed in a LightCycler® 480 instrument (Roche) using the SybrGreen master mix (Roche) following the recommended protocol. The thermocycler conditions were as follows: pre-incubation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s. The gene expression was normalized to the Myzus persicae internal reference gene EF1alpha (Naessens et al., 2015; Webster et al., 2018) (for primer sequences of targeted genes and of the internal reference gene see Table S2).

Raw data processing and quality control for transcriptome profiling

Processing was carried out on the Galaxy France platform (<https://usegalaxy.fr/>) (Afgan et al., 2016). Raw reads quality was checked with FastQC (v0.11.8) and the results were then aggregated with MultiQC (v1.9). Reads were aligned on the *Myzus persicae* O reference genome ('Myzus_persicae_O_v2.0.scaffolds.fa' (annotations: 'Myzus_persicae_O_v2.0.scaffolds.braker2.gff3') downloaded from BIPAA portal (https://bipaa.genouest.org/sp/myzus_persicae/) (Mathers et al., 2021) with STAR (v2.7.6a) and quality was again checked with MultiQC. Gene counts were obtained with featureCounts (v2.0.1). Differential gene expression was then analyzed with SARTools (v1.7.3) and the DESeq2 method (i.e. aphids on TuYV-infected plants vs. mock-inoculated plants, aphids on CaMV-infected plants vs. mock-inoculated plants, and aphids on TuYV-infected plants vs. CaMV-infected plants). GO enrichment analysis of the DEGs was performed with Goseq (v1.36.0) (Young et al., 2010). We used default parameters for all steps except for featureCounts where the following deviating parameters were used:

only the primary alignment was taken into account (not multi-mapped reads), exclude chimeric fragments = Yes (-C option, signifying that the fragments that have their two ends aligned to different chromosomes were NOT included for summarization), minimum base overlap = 1.

Results and discussion

Quality control and validation of RNA-seq data

For aphids on Arabidopsis, between 64.6 and 88.8 million 75 nt paired-end reads were obtained with a mean phred score >30 for all bases. For aphids on Camelina, between 61.8 and 82.4 million 75 nt paired-end reads were obtained with a mean phred score >30 for all bases. In all samples, there were no overrepresented sequences and only a few adapter-containing reads (0.20 % reads with adapter sequence at the last bases). Between 85.6 % and 88.7 % of reads were uniquely mapped to the aphid genome for Arabidopsis (Supplementary Table S1a) and between 81.8 % and 87.6 % of reads were uniquely mapped to the aphid genome for Camelina (Supplementary Table S1b). Of these, between 87.4 % and 88.3 % of uniquely aligned reads were assigned to an aphid gene on Arabidopsis and 83.4 % to 86.8 % aligned reads were assigned to an aphid gene on Camelina. We did not look for the nature of the unaligned reads; they might derive from endosymbionts, contaminating biologic material from plants, fungi, bacteria and the like.

Exemplarily, a similar trend of gene deregulation was confirmed by RT-qPCR for four *Myzus* genes with different levels of deregulation and expression, but the same trend in both infection conditions. We screened only four genes as in a previous work on aphid transcriptomics (Liu et al., 2012). Three genes showed the same trend of downregulation in RNA-seq and RT-qPCR experiments, while the fourth (g15329) was found to be upregulated in all RNA-seq and RT-qPCR experiments, except for RT-qPCR on TuYV-infected plants (Supplementary Figure S1). The discrepancy in the results for g15329 expression was likely due its weak expression changes that in general are difficult to detect by RT-qPCR because of the exponential amplification kinetics of this technique. We observed the same phenomenon in a previous validation experiment (Chesnais, Golyaev, et al., 2022).

Principal component analysis of RNA-seq datasets (Figure 1a) indicated good clustering of the three biological replicates of aphids fed on mock-inoculated or virus-infected Arabidopsis. One of the three biological replicates of aphids fed on CaMV-infected Arabidopsis grouped less well with the other two but was still within an acceptable range. In the case of Camelina, the three replicates for each virus (TuYV and CaMV) clustered well together, indicating homogeneity of the replicates (Figure 1b). The *Myzus* data for Camelina infected with TuYV and CaMV were more similar to each other than those for Arabidopsis, indicating that the transcriptome changes in aphids fed on Camelina were less dependent on the virus species than those on Arabidopsis. In the case of mock-inoculated Camelina, two of the three replicates clustered together and were well separated from the data for virus-infected Camelina, while the third replicate clustered with the aphid data from infected plants and was therefore excluded from further analysis (Figure 1b). The transcriptomes of the plants used here for aphid infestation were analyzed in another study (Chesnais, Golyaev, et al., 2022). There the three replicates from mock-infected Camelina clustered closely together in principal component analysis. This indicates that the outlier behavior observed here was not caused by the plant itself but by another cause, which remains elusive. Taken together, all samples except one mock replicate of Camelina were suitable for transcriptome analysis.

Global analysis of differentially expressed aphid genes

Analysis of RNA-seq data revealed twice as many differentially expressed genes (DEGs) (false discovery rate <0.05) in aphids feeding on virus-infected Arabidopsis (4,060 for TuYV and 3,998 for CaMV) as in aphids feeding on virus-infected Camelina (1,771 for TuYV and 1,890 for CaMV), compared to aphids from mock-inoculated controls (Figure 1c, 1d and 1e). Remarkably, each virus modified the expression of about the same number of genes in aphids fed on the same host. Moreover, for each plant species, about 2/3 of aphid DEGs were common for the two viruses, indicating a profound common response of aphids to feeding on infected plants, independent of the virus species and of the transmission mode (Figure 1c and 1d). Like the number of aphid DEGs, also the proportion of up- and downregulated aphid genes was virus-independent, with ca. 45 % of the aphid DEGs being upregulated after feeding on TuYV- or CaMV-infected Arabidopsis, and ca. 75 % and ca. 81 % being upregulated after feeding on TuYV- and CaMV-infected

Camelina, respectively (Figure 1e). The differences in the number and proportion of up- and downregulated aphid DEGs between Arabidopsis and Camelina indicated an important plant species effect on the aphid transcriptome, which was independent of the virus. On the other hand, for each plant species, ca. 1/3 of the aphid DEGs was specific for each virus, indicating that the virus species (and, possibly, the transmission mode) had a substantial and characteristic impact on the aphid transcriptome.

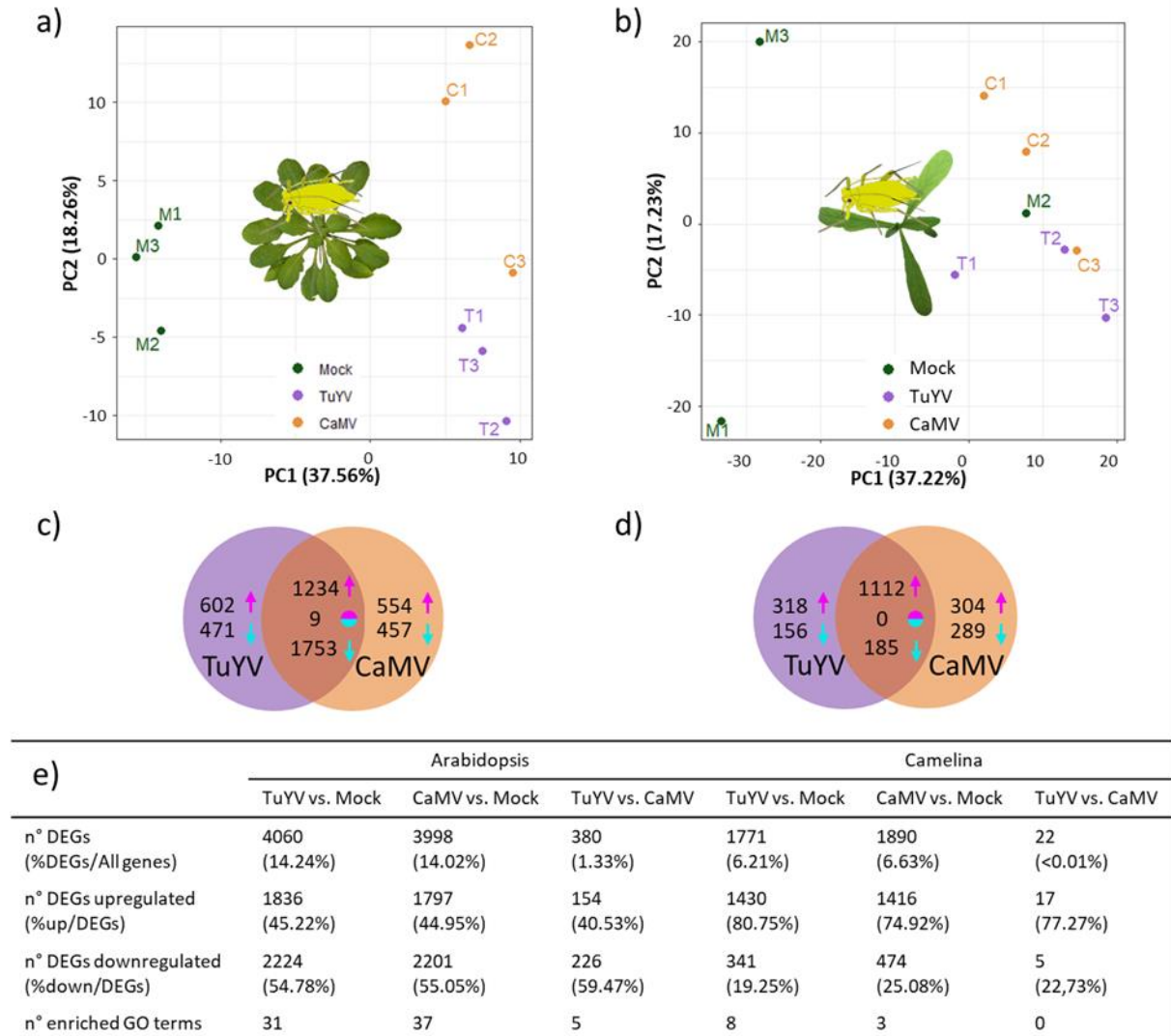


Figure 1. Analysis of the transcriptome profiles of aphids fed on mock-inoculated vs TuYV- and CaMV-infected plants. (a-b) Principal component analysis of three biological replicates for each condition of *Myzus persicae* feeding on (a) *Arabidopsis thaliana* and (b) *Camelina sativa*. The dots of the same color correspond to the biological replicates for each condition. The mock 2 (M2) Camelina sample was excluded from the analysis because it did not cluster with the other two replicates. (c-d) Venn diagrams presenting the number of differentially expressed genes (DEGs) in aphids fed on TuYV- and CaMV-infected Arabidopsis (c) and Camelina (d), compared to respective mock-inoculated controls. Magenta arrows: number of up-regulated genes, cyan arrows: number of down-regulated genes and two-color circles: inversely regulated genes (up-regulated genes in one virus-infected modality and down-regulated in the other virus-infected modality). e) The number of DEGs and enriched GO categories in aphids fed on TuYV and CaMV-infected plants vs mock controls as well as on TuYV- vs CaMV-infected plants.

Impact of CaMV and TuYV infection on aphid metabolic pathways

Gene ontology analysis of Myzus infesting CaMV- or TuYV-infected plants

Using gene ontology (GO) analysis, we first looked at the effects of virus-infected Arabidopsis on the aphid transcriptome (Figure 2). In aphids fed on TuYV-infected Arabidopsis, 11 of the Top 25 enriched GO categories of DEGs classified as Biological Processes (BP) (Figure 2a). The most affected processes were 'oxidation-reduction' (BP), 'integral component of membrane' (belonging to the category Cellular Component [CC]), and the rather general process 'ATP-binding' (belonging to the category Molecular Function [MF]). Other prominent processes were related to protein synthesis and metabolism (translation initiation, protein synthesis, endopeptidase activity, protein folding, proteasome-mediated protein degradation and unfolded protein binding). Similarly, the most deregulated processes of aphids feeding on CaMV-infected Arabidopsis were 'oxidation-reduction (BP)', 'integral component of membrane (CC)' and 'ATP binding (MF)', followed by protein synthesis and metabolism-related processes (Figure 2b).

A different picture was found for *Myzus* on virus-infected *Camelina* (Figure 2c). In the case of TuYV infection, only 8 categories [2 in biological processes (BP), 3 in cellular components (CC) and 3 in molecular functions (MF)] were identified by GO Top 25 analysis as being significantly enriched. Three of them (Figure 2d) were also identified in aphids from CaMV-infected *Camelina*, but none of them in aphids from infected Arabidopsis. The enriched processes included chitin-related processes (chitin binding, MF; chitin metabolic processes, BP; structural constituent of cuticle, MF), transcription (transcription factor complex, CC), oxidation reduction (oxidoreductase activity, MF) and plasma membrane-related processes (homophilic cell adhesion via plasma membrane, BP; plasma membrane, CC; extracellular region, CC). Although none of these GOs figured among the Arabidopsis Top 25 GO, there were three GO categories (related to oxidation/reduction and plasma membrane processes) that were similar to GOs identified in aphids fed on Arabidopsis.

Taken together, GO analysis revealed distinct, plant host-specific impacts on the aphid gene expression, which were rather independent of the virus species. Feeding on virus-infected Arabidopsis had a much more profound impact on aphids than feeding on virus-infected *Camelina* (Figure 2a,b vs 2c,d).

Since the current annotation of the *Myzus* genome was not as advanced as for other model organisms such as *Drosophila melanogaster*, we complemented our above-described GO analysis by analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa, 1996). This analysis showed that similar percentages of genes involved in 'genetic information processing', 'metabolism' and 'signaling and cellular processes' were modified in aphids feeding on both plant hosts (Figure S3).

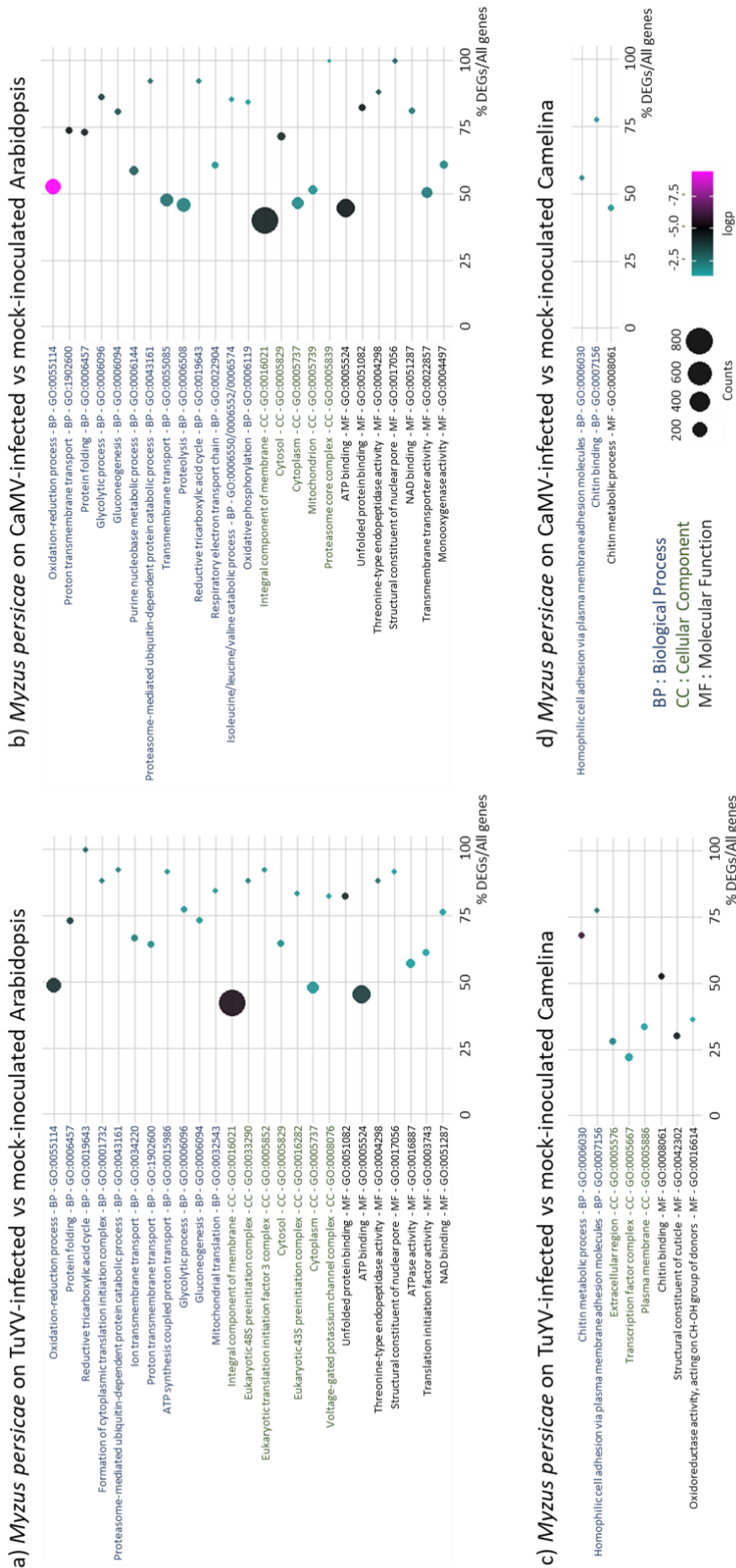


Figure 2. Gene ontology (GO) analysis of differentially expressed genes in *Myzus persicae* feeding on TuVY- and CaMV-infected Arabidopsis and Camelina. a) *Myzus persicae* on TuVY-infected vs mock-inoculated Arabidopsis, b) *Myzus persicae* on CaMV-infected vs mock-inoculated Arabidopsis, c) *Myzus persicae* on TuVY-infected vs mock-inoculated Camelina, and d) *Myzus persicae* on CaMV-infected vs mock-inoculated Camelina. The deregulated processes and the corresponding GO categories and IDs are specified in the vertical axis. For each GO category (BP: Biological Process, CC: Cellular Component, and MF: Molecular Function), the GO terms/processes are sorted according to decreasing $\log_2(1/p\text{-value})$, also indicated by the color of each spot, to place the most significantly enriched GOs on top of the graph. The absolute number of DEGs that matched the GO term is indicated by the size of each spot, whereas the horizontal axis shows the percentage of DEGs belonging to the GO term.

General heatmap analysis of DEGs

To better visualize the aphid transcriptome changes, heatmaps presenting all DEGs in aphids infesting *Arabidopsis* or *Camelina* were generated (Figure 3a and 3b). The profiles of all aphid replicates fed on mock-inoculated *Arabidopsis* or *Camelina* clustered well together, while the profiles from aphids feeding on virus-infected plants (CaMV and TuYV) did not. This again indicated that, in our experiment, effects of infection on aphid genes were largely independent of the virus species. Like the global analysis (Figure 1e), the heat maps showed also that *Myzus* on virus (TuYV or CaMV)-infected *Camelina* displayed proportionally more up- than downregulated genes, compared to *Myzus* on mock-inoculated *Camelina*, whereas proportions of up- and downregulated DEGs in aphids feeding on virus-infected vs mock-inoculated *Arabidopsis* were similar. The significance of these plant host-specific effects remains to be investigated. We speculate that *Myzus* might have more difficulties in establishing infestation on *Arabidopsis* than on *Camelina*, visible by the higher number of DEGs that is indicative of extensive transcriptome reprogramming to adapt to the new plant host.

In summary, both GO and a general heatmap analyses indicated an important effect of plant infection on the aphid transcriptome, which was strongly shaped by the host plant identity (2/3 of the DEGs) and less so by the virus species (1/3 of the DEGs) and therefore the virus transmission mode.

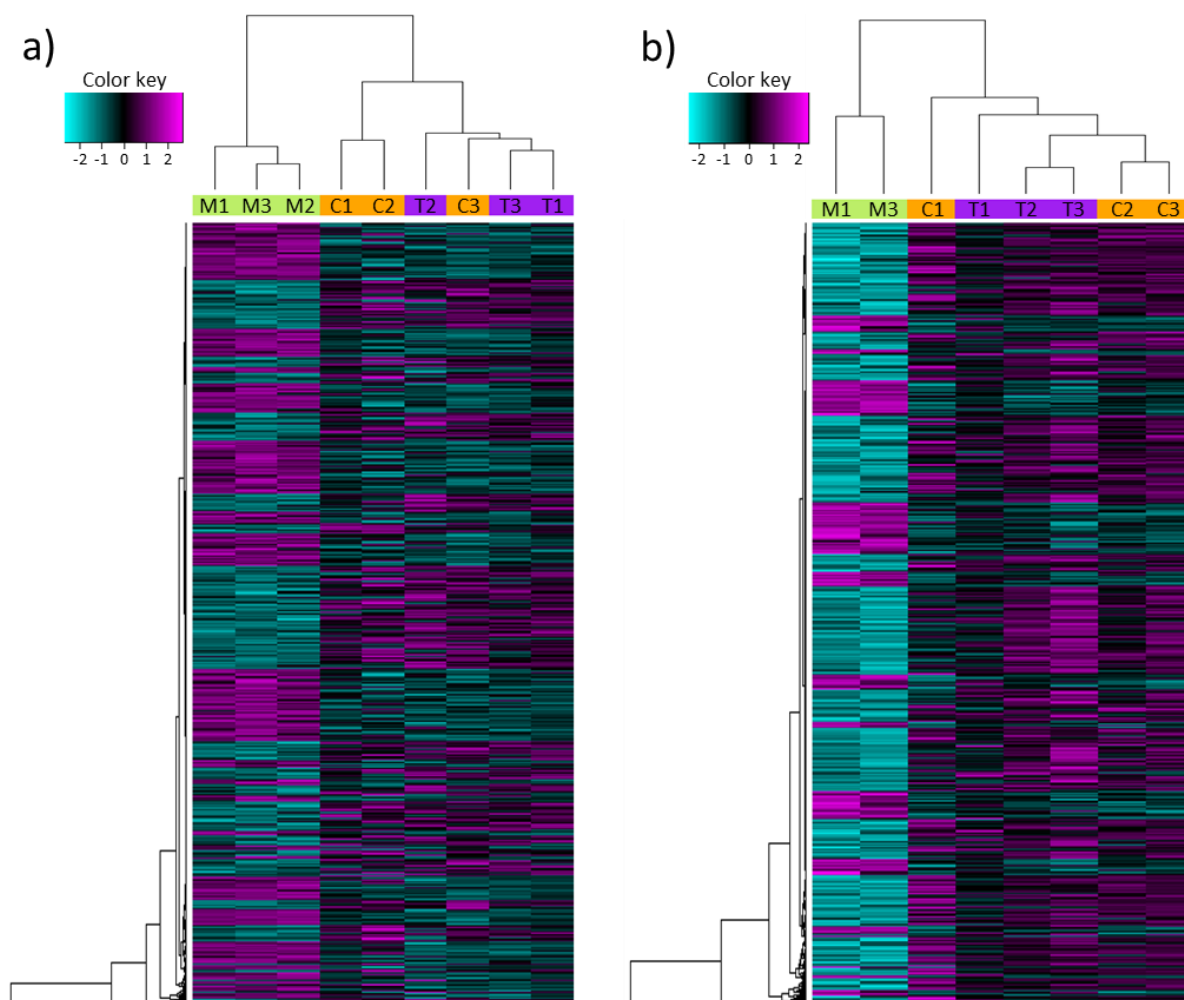


Figure 3. Hierarchical clustering of all differentially expressed genes (DEGs) in *Myzus persicae* feeding on CaMV- and TuYV-infected *Arabidopsis thaliana* (a) and *Camelina sativa* (b), compared to mock-inoculated control plants (Mock-inoculated [M], TuYV-infected [T] and CaMV-infected [C]) (Supplementary Dataset S1). The color key scale displays the row Z-score (normalized counts) from -2 to +2 as a gradient from cyan to magenta.

Discussion of DEGs by classes

In the following section, aphid DEGs were classified in several categories using as criteria whether or not the genes were differentially expressed in specific conditions (plant host species and virus identity) (Figure 4). The rationale was to identify genes that were general players in plant-virus-aphid interactions (i.e. deregulated by both viruses and on both host plants; Figure 4a) and genes that were specifically deregulated either by one virus species or by one host species. Then, we extracted aphid DEGs related to one virus and conserved regardless of the host plant to highlight virus species/transmission mode-specific genes that were not sensitive to the host plant identity (Figure 4b). Finally, we compared TuYV vs CaMV effects on each host plant to reveal additional, host plant-specific, ‘manipulation strategies’ linked to the virus transmission mode (Figure 4c).

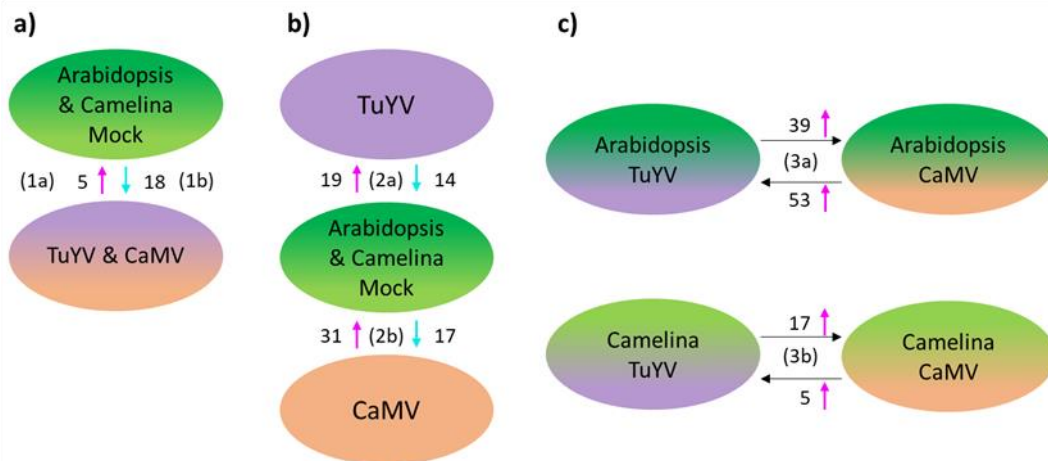


Figure 4. Summarizing figure presenting the number of differentially expressed aphid genes ($\log_2FC > 0.5$ or <0.5) discussed in each subsection of the discussion (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b). a) differentially expressed aphid genes in common for all conditions, b) virus-specific aphid DEGs common on both host-plants, and c) host plant-specific aphid DEGs for TuYV vs CaMV. Magenta arrows indicate the number of upregulated genes and the cyan arrows the number of downregulated genes.

1 Common deregulated genes in aphids feeding on CaMV- and TuYV-infected Arabidopsis and Camelina

This analysis was carried out on genes differentially up- or downregulated under all conditions. No homolog was identified for up-regulated genes. In the case of downregulated genes, we found some genes homologs where one homolog was downregulated for one virus and another one for the other virus (Table 1). For example, we identified two potentially secreted homologous cathepsin B-like proteases (g8486 for aphids infesting TuYV-infected plants and g24532 for aphids infesting CaMV-infected plants). These homologs were included in the analysis. The rationale was that one specific host or infection condition might deregulate a specific gene but that the overall effect on plant aphid interactions might be the same or very similar for both genes (in this case the two cathepsin Bs might have a similar role as saliva effectors).

1a Aphid genes UPREGULATED by both VIRUSES on both PLANTS

Only five genes were upregulated in Myzus feeding on both CaMV- and TuYV-infected vs mock-inoculated plants. Two of them (g22946 and g22969) code for titins, which are structural muscle proteins (Lemke & Schnorrer, 2017) (Table 1). Their upregulation could potentially affect locomotion behavior and facilitate intra or inter-plants vector movement, as was recently observed for TuYV-viruliferous aphids (Chesnais et al., 2020). The third commonly upregulated gene (g6068) codes for a vasodilator-stimulated phosphoprotein-like (VASP) protein, which is associated with actin filaments and focal adhesions (Ahern-Djamali et al., 1998). It can participate in neural development and function, as suggested for its *Drosophila* homolog Ena (Ahern-Djamali et al., 1998). Transferred to the present work, VASP might be induced by viruses to modulate aphid development and behavior, a feature that has been reported several times in the recent literature (Mauck et al., 2018). The fourth gene upregulated in all modalities encodes an angiotensin-converting enzyme-like protein (g22588), the orthologue of *Acyrtosiphon pisum* ACE1.

g22588 contains a signal peptide and could therefore be a saliva protein. *Acyrtosiphon pisum* ACE1 is expressed in salivary glands and modulates aphid-plant interactions by affecting the feeding behavior and survival of aphids on host plants (Wang, Luo, et al., 2015). More precisely, silencing of ACE1 and ACE2 shortened the lifespan of *A. pisum* on plants but not in membrane feeding assays. Thus, the ACE1 g22588 possibly counteracts plant defenses and its overexpression could help Myzus to better cope with plant defenses and to increase its lifespan. ACE and other metalloproteases have also been found in the saliva of other phytophagous and blood-feeding arthropods (Decrem et al., 2008; Stafford-Banks et al., 2014) and are believed to be part of their arsenal counteracting defense responses of their hosts (reviewed by Hopp & Sinnis, 2015; Wang et al., 2017; Chen & Mao, 2020; Pham et al., 2021). Thus, the increased expression of ACE, as observed here in the interaction of Myzus with two viruses and on two host plants, could be a common 'manipulation strategy' shared among plant viruses to facilitate aphid feeding on virus-infected host plants and accelerate virus acquisition. The fifth commonly upregulated gene is the uncharacterized Myzus gene g27731 encoding a protein with MATH and LRR domains. Since the LRR domain is evolutionary conserved in many proteins associated with innate immunity pathways (Ng & Xavier, 2011), this protein might be a good candidate for further studies on virus-mediated manipulation of insect vectors.

1b Aphid genes DOWNREGULATED by both VIRUSES on both PLANTS

We found 18 common downregulated genes (including some homologs) in aphids fed on virus-infected plants, 13 of which are implicated in aphids' physiological responses to plant defenses, i.e. stress-related genes (Table 1). Previously, we have demonstrated that plant infection with CaMV and TuYV alters primary and secondary metabolism in Arabidopsis and Camelina strongly (Chesnais, Golyaev, et al., 2022). Consequently, aphids could also be stressed on the infected plants because of these important alterations of the plants. However, we found that stress-related aphid genes were downregulated in Myzus feeding on virus-infected plants. This suggests that plant infection with TuYV or CaMV could facilitate aphid infestation. The downregulated stress genes included those encoding the metabolic enzymes cytochrome P450s, glutathione-S-transferase and UDP-glucuronosyl transferases which can play a key role in detoxifying plant secondary metabolites (Brierley & Burchell, 1993; Li et al., 2007). We also noticed downregulation of genes encoding FE4-like esterases that belong to another class of enzymes involved in detoxification and that can confer insecticide resistance in Myzus (Field & Devonshire, 1998). Likewise, Myzus genes coding for CHK domain-containing proteins were downregulated (Table 1). CHKs (checkpoint kinases) are major mediators of cell cycle checkpoints in response to genotoxic and other stresses (de Vries et al., 2005).

Another aphid gene downregulated under all conditions encodes for a facilitated transmembrane trehalose transporter, Tret1. Trehalose (α -D-glucopyranosyl-(1,1)- α -D-glucopyranoside) is the main hemolymph sugar, and Tret1 is necessary for the transport of trehalose produced in the fat body and its uptake into other tissues that require a carbon source (Kanamori et al., 2010). Deregulation of this gene following virus acquisition has already been reported in other insect vectors and is not linked to the virus species or the transmission mode (e.g. Widana Gamage et al., 2018; Ding et al., 2019).

As mentioned above, we observed downregulation of distinct Cathepsin B3 (CathB)-encoding genes in aphids feeding on TuYV- or CaMV-infected vs mock-inoculated plants. CathBs are detoxifying proteases found in saliva and intestine and are subject to gene amplification, which is thought to be an adaptation of saliva and intestine of aphids feeding on phloem sap from different plant species (Rispe et al., 2007; Mathers et al., 2017). The CathB identified in Myzus feeding on TuYV-infected plants (g24532) is the same as the one described by Guo et al. (2020), and the one found in Myzus infesting CaMV-infected plants (g8486) is closely related to it (87 % identity on the amino acid level). The latter paralog (CathB3) is a saliva protease and an effector that induces plant defenses. Therefore, its downregulation can be proviral by facilitating plant infestation. Up- or downregulation of CathB-encoding genes during host-virus interactions has been observed in many arthropod vectors (aphids, whitefly, thrips, leafhoppers, mites and mosquitos), suggesting importance of the cathepsin Bs in virus-host-vector interactions and, possibly, transmission (Pinheiro et al., 2017; Hasegawa et al., 2018; Widana Gamage et al., 2018; Gupta et al., 2019; Caicedo et al., 2019; Li et al., 2019, 2020; Xu et al., 2021). Another feeding-related downregulated gene in aphids infesting virus-infected Arabidopsis and Camelina encodes a sialin (g26345). A mammalian ortholog of the sialin gene encodes a membrane protein of salivary gland cells controlling osmolarity and composition of saliva (Li et al., 2018). Finally, among commonly downregulated Myzus genes we identified a gene encoding

Table 1. Selected differentially expressed aphid genes in common for aphids feeding on both CaMV and TuYV-infected Arabidopsis and Camelina. Single lines separate genes by functional categories. The double line separates up-regulated from down-regulated genes.

Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon	CaMV								
						TuYV			Arabidopsis thaliana			Camelina sativa		
						log2FC	padj	padj	log2FC	padj	padj	log2FC	padj	padj
Structural muscle proteins	Locomotion behavior	(Lemke and Schnorrer, 2017)	g22946	Titin isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0,83	4,18E-24	0,79	1,44E-06	1,07	2,56E-05	2,86	1,98E-44	
			g22969	Titin-like, partial	<i>Myzus persicae</i>	0,68	1,02E-02	2,49	3,39E-33	1,00	7,99E-35	0,80	8,59E-07	
Cell function - Development (neurons)	Aphid development and behavior	(Ahern-Djamali et al., 1998)	g6068	Vasodilator-stimulated phosphoprotein-like	<i>Siphia flava</i>	0,58	1,94E-03	1,18	4,38E-04	0,75	3,85E-05	0,83	2,47E-02	
			g27731	MATH and LRR domain-containing protein PFE0570w-like	<i>Siphia flava</i>	1,16	2,83E-05	1,11	1,44E-04	1,24	7,66E-06	1,05	3,71E-04	
Innate immunity	Unknown	(Ng & Xavier, 2011)	g22588	Angiotensin-converting enzyme-like	<i>Myzus persicae</i>	0,66	2,78E-11	0,72	1,82E-02	0,71	2,81E-13	0,97	4,57E-04	
			g24472	Farnesol dehydrogenase-like	<i>Myzus persicae</i>	-0,83	2,02E-05	-0,79	4,61E-05	-1,36	2,58E-13	-0,86	6,90E-06	
Development (Hormones)	Aphid wing development	(Mayoral et al, 2009)	g24532	Cathepsin B-like cysteine proteinase 3	<i>Myzus persicae</i>	-0,71	5,45E-06	-0,51	2,19E-04	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				
			g8486	Cathepsin B-like	<i>Myzus persicae</i>	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				-0,52	1,23E-11	-0,50	2,22E-02	
Potential saliva effector	Hydrolysis of toxic proteins	(Guo et al., 2020)	g22540	Esterase FE4-like	<i>Myzus persicae</i>	-0,93	6,09E-28	-0,50	9,43E-03	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				
			g19915	Esterase FE4-like	<i>Myzus persicae</i>	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				-0,74	2,66E-07	-1,03	1,25E-06	
Immune response and Detoxification (plant defense)	Aphid physiological response to plant defense	(Field and Devonshire, 1998) (Brierley and Burchell, 1993)	g26167	UDP-glucuronosyl transferase 344L3	<i>Myzus persicae</i>	-0,99	2,04E-04	-0,87	7,63E-05	-1,26	1,62E-06	-0,78	4,11E-04	
			g18945	UDP-glucuronosyl transferase 344E7	<i>Myzus persicae</i>	-1,27	8,21E-03	-0,86	6,63E-03	-1,23	1,16E-02	-1,23	1,59E-05	
Immune response and Detoxification (plant defense)	Aphid physiological response to plant defense	(Field and Devonshire, 1998) (Brierley and Burchell, 1993)	g26165	UDP-glucuronosyl transferase 344L3	<i>Myzus persicae</i>	-1,20	1,34E-05	-0,63	8,28E-03	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				
			g26170	UDP-glucuronosyltransferase 2B2-like	<i>Myzus persicae</i>	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				-1,21	8,40E-11	-0,61	1,68E-02	
Immune response and Detoxification (plant defense)	Aphid physiological response to plant defense	(Brierley and Burchell, 1993)	g12372	Glutathione S-transferase-like	<i>Myzus persicae</i>	-0,53	1,33E-08	-0,57	1,50E-02	-0,78	4,04E-18	-0,67	2,67E-03	
			g24191	Glutathione S-transferase-like	<i>Myzus persicae</i>	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				-0,81	2,48E-05	-0,84	6,97E-04	
Immune response and Detoxification (plant defense)	Aphid physiological response to plant defense	(Brierley and Burchell, 1993)	g19821	Probable cytochrome P450 6a13 isoform X1	<i>Myzus persicae</i>	-2,56	2,55E-03	-1,34	1,15E-08	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				
			g18042	Probable cytochrome P450 6a13	<i>Myzus persicae</i>	<i>padj</i> > 0.05 or <i>log2FC</i> < 0.5				-0,60	1,37E-02	-0,82	1,20E-03	

Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description	Top hit Taxon	TuYV				CaMV			
						Arabidopsis thaliana		Camelina sativa		Arabidopsis thaliana		Camelina sativa	
						log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj	log2FC	padj
Protein of salivary gland cells	Aphid feeding behavior	(Li et al., 2018)	g26345	Sialin-like	<i>Aphis craccivora</i>	-0,85	3,11E-04	-0,51	4,71E-02	-0,53	3,35E-02	-0,57	2,05E-02
Stress Response (DNA damages and genotoxic stresses)	Aphid physiological response to plant defense	(de Vries et al., 2005)	g21951	CHK domain-containing protein	<i>Aphis craccivora</i>	-0,60	2,14E-16	-0,50	6,28E-04				
			g21958	CHK domain-containing protein	<i>Aphis craccivora</i>	-0,69	4,55E-12	-0,55	4,96E-03	-0,92	3,54E-21	-0,59	1,72E-03
			g21950	CHK domain-containing protein	<i>Aphis craccivora</i>	-1,46	1,83E-08	-0,57	2,70E-04	-1,60	6,26E-10	-0,71	1,80E-06
Transport of trehalose	Unknown - Aphid physiology	(Kanamori et al., 2010)	g14418	Facilitated trehalose transporter Tret1-like	<i>Myzus persicae</i>	-0,93	1,54E-04	-0,74	3,50E-04	-1,40	5,46E-09	-1,13	4,81E-09

Table 1. (continued)

a farnesol dehydrogenase-like protein (g24472), implicated in hormone metabolism. This gene could be responsible for the oxidation of farnesol to farnesal, a precursor of the juvenile hormone as shown for mosquitoes (Mayoral et al., 2009). Downregulation of juvenile hormone can favor wing development (Zhang et al., 2019), which might facilitate viral spread.

Taken together, we observed that among the ‘common’ genes those involved in locomotion, neural development and lifespan were rather upregulated in aphids feeding on virus-infected plants. This might favor aphid mobility and survival and in turn virus dispersion. Genes involved in stress responses and saliva functions were mostly downregulated (except the saliva protein ACE1 contributing to lifespan), indicating that viral infection facilitates aphid infestation of the host plants, for example by dampening anti-herbivore plant defenses as observed in our previous study (Chesnais, Golyaev, et al., 2022).

2 Virus-specific aphid DEGs on both host-plants

2a TuYV-specific DEGs in *Myzus* feeding on *Arabidopsis* and *Camelina*

To know whether plant viruses can impact aphid genes independently of the plant host, we first screened for aphid DEGs in common for aphids feeding on TuYV-infected *Camelina* and *Arabidopsis*. We found 19 upregulated genes (see a complete list in Table S3). Two of them might influence aphid feeding behavior (Table 2a). One (g26473) codes for a putative stylet sheath protein. Stylet sheaths are formed by gelling saliva that is secreted during stylet penetration in plant tissue. The sheaths insulate the stylets and potentially protect them from plant defenses and seal cell and phloem puncture sites (Will et al., 2012). Silencing of an *A. pisum* sheath protein gene disrupted sheath formation and disturbed phloem-feeding (Will & Vilcinskas, 2015), suggesting that upregulation, as observed here, might conversely facilitate and accelerate aphid feeding behavior on TuYV-infected plants (as observed by Chesnais et al., 2020), and hence TuYV acquisition. The second TuYV-specific feeding-related aphid gene (g15241) codes for a receptor for the insect neuropeptide SIFamide that might control feeding indirectly by modulating behavior, as shown for SIFamide in the Chagas disease vector, the kissing bug *Rhodnius prolixus* (Ayub et al., 2020). The other upregulated genes are mostly related to development. Interestingly, two of them, forkhead box protein O (Foxo) and ATP-binding cassette sub-family G member 4-like (ABCG4) could be involved in aphid wing formation (Shang et al., 2020; Grantham et al., 2020). Induction of wings could considerably increase virus propagation by aphids, especially over long distances, as recently shown for CMV transmission (Jayasinghe et al., 2021). In this specific case, the wing formation was attributed to a virus satellite co-infecting the plant. The few downregulated genes (n = 14, see a complete list in Table S3) specific for aphids on TuYV-infected plants are involved in detoxification and are closely related to the detoxification genes downregulated by both viruses in all conditions (see the previous section).

2b CaMV-specific DEGs in *Myzus* feeding on *Arabidopsis* and *Camelina*

We also analyzed the common and specific DEGs only found in aphids fed on CaMV-infected *Arabidopsis* and *Camelina*. We identified a total of 48 DEGs (31 upregulated and 17 downregulated genes, see the complete list in Table S4). One of the upregulated genes codes for a glucose dehydrogenase (Table 2b). Since glucose dehydrogenases are involved in multiple pathways, it is difficult to attribute a precise role for these enzymes in CaMV-aphid interactions. Several other upregulated genes might modulate aphid development and feeding behavior. For example, the gene g21498 codes for a structural RR-2 cuticle protein 3. Other RR-1 and RR-2 cuticle proteins are involved in virus–vector interactions (Deshoux et al., 2018), and it would be interesting to investigate a possible role of the RR-2 cuticle protein 3 in CaMV transmission. Another upregulated gene codes for an astacin (g7709), which belongs to a group of metalloproteases with various functions (Sterchi et al., 2008). Since the astacin identified here contains a signal peptide for secretion, it is tempting to speculate that it could be released during salivation or digestion and that upregulation might improve feeding.

As mentioned in the above section, both TuYV and CaMV infections deregulated some aphid genes linked to salivary proteins (for example ACE1 and CathB). CaMV acquisition, but not TuYV acquisition, upregulated in *Myzus* another potential saliva gene coding for a mucin-2-like protein (g27683). In animals, saliva mucins protect by lubrication soft and hard tissues in the mouth (Turner, 2016). Their aphid homologs could have similar functions in protecting the stylet surface. Insect mucins have been studied thoroughly in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. One of them, NIMul, is a major component of watery and gelling saliva, required for proper feeding (Huang et al., 2017). Another one, NIMLP, is also

Table 2. Selected genes commonly deregulated in aphids feeding on a) TuYV-infected and b) CaMV-infected host plants (Arabidopsis and Camelina). Single lines separate genes by functional categories.

		<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Camelina sativa</i>	
Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon
a) TuYV	Saliva protein	(Will et al., 2012)	g26473	Putative sheath protein, partial	<i>Sitobion avenae</i>
	Insect neuropeptide	(Ayub et al., 2020)	g15241	Neuropeptide SIFamide receptor-like	<i>Myzus persicae</i>
	Membrane-associated transporter	(Shang et al., 2020; Jayasinghe et al., 2021)	g16568	ATP-binding cassette sub-family G member 4-like	<i>Myzus persicae</i>
Transcription factor	Aphid development (wing)	(Grantham et al., 2020)	g24925	Forkhead box protein O	<i>Myzus persicae</i>
		<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Camelina sativa</i>	
Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon
Development (multiple pathways)	Aphid behavior and development		g19210	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like isoform X1	<i>Myzus persicae</i>
			g19209	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	<i>Myzus persicae</i>
Structural protein	Aphid development - Virus interaction	(Deshoux et al., 2018)	g21498	RR-2 cuticle protein 3, partial	<i>Myzus persicae</i>
Saliva protein	Aphid feeding behavior	(Huang et al., 2017; Shangguan et al., 2018)	g27683	Mucin-2-like	<i>Myzus persicae</i>
Metalloproteases - Secreted protein	Aphid feeding behavior - Digestion	(Sterchi et al., 2008)	g7709	Astacin-like	<i>Myzus persicae</i>
Saliva protein - Lipase activity	Aphid feeding behavior	(Chaudhary et al., 2015)	g16515	Pancreatic lipase-related protein 2-like	<i>Myzus persicae</i>
Saliva protein	Aphid feeding behavior	(Enders et al., 2015; Champagne et al., 1995)	g22531	Protein 5NUC isoform X1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
Carbohydrate metabolism	Aphid metabolism	(Qin et al., 2018)	g20667	Sugar transporter SWEET1-like	<i>Myzus persicae</i>

involved in sheath formation, but in addition this mucin elicits plant defense responses (Shangguan et al., 2018). Transferred to aphids, genes encoding mucins could be involved in the significant phagostimulation observed in aphids on CaMV-infected plants compared to healthy plants (Chesnais et al., 2021).

Among genes downregulated by CaMV (but not by TuYV) in *Myzus* when feeding on both hosts were other genes coding for potential saliva proteins. One of them (g22531) codes for a 5'-nucleotidase with some similarities to a 5'-nucleotidase downregulated by various stresses in *A. glycines* (Enders et al., 2015) and to a saliva-contained 5'-nucleotidase of the mosquito *Aedes aegypti* (Champagne et al., 1995). A second gene codes for a pancreatic lipase-related 2-like protein (g16515). Similar enzymes have been identified in the salivary proteome of the potato aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Chaudhary et al., 2015). Other pancreatic lipases are involved in vector interactions with circulative viruses. A pancreatic lipase from *Rhopalosiphum padi* binds to the CP and RT of barley yellow dwarf virus (family *Luteoviridae*) in yeast two-hybrid assay (Wang, Wu, et al., 2015) and the gene expression of another pancreatic lipase is downregulated in *Bemisia tabaci* fed on TYLCV-infected tomato (Hasegawa et al., 2018). Thus, an impact of downregulation of this gene on non-circulative CaMV transmission could be indirect. Among other downregulated genes was the sugar transporter SWEET1-like gene (g20667), which codes for the midgut receptor of at least three planthopper-transmitted circulative, propagative viruses (Qin et al., 2018). A role, if any, for this gene in non-circulative transmission of CaMV by aphids could also be indirect, possibly by increasing feeding activity and concomitant virus acquisition, due to reduced sugar uptake.

3 Host plant-specific aphid DEGs for TuYV vs CaMV

To reveal an additional, host plant-specific, contribution to viral manipulation strategies linked to circulative vs non-circulative transmission modes, we analyzed DEGs in aphids feeding on TuYV- vs CaMV-infected *Arabidopsis* and in aphids feeding on TuYV- vs CaMV-infected *Camelina* (Figure 1e, TuYV vs CaMV). Since for *Arabidopsis* the total number of such aphid DEGs was 380, we applied a cut-off of log₂FC (fold changes) > 0.5 for upregulated genes and < -0.5 for downregulated genes to limit the number to 90 genes. This step was not necessary in the case of *Camelina*, where in total only 22 aphid DEGs were observed (see the complete lists in Tables S3, S4 and S5).

3a TuYV vs CaMV in *Arabidopsis*

A higher proportion of genes was upregulated in aphids feeding on TuYV-infected *Arabidopsis*, compared to aphids infesting CaMV-infected *Arabidopsis* (see Table 3a and Supplementary Table S5-6). Two of them (g5369 and g10419) encode chitinases that are essential for insect survival, molting and development (Arakane & Muthukrishnan, 2010). Four other genes encode the development-related proteins octopamine receptor Oamb (g15146), homeotic protein distal-less-like protein (g5303), zinc finger protein Elbow (g24564) and bombyxin C-2 like protein (g7214) (Campbell & Tomlinson, 1998; Weihe et al., 2004; Wang et al., 2016; Ding et al., 2017). Thus, compared to CaMV, TuYV infection of *Arabidopsis* specifically induces higher expression of aphid genes potentially involved in wing formation/development. This could promote, as discussed above, the formation of alate individuals with consequences on TuYV dispersal to new plants.

Interestingly, *Myzus* feeding on CaMV-infected *Arabidopsis* showed a different subset of developmental genes expressed at higher levels than *Myzus* feeding on TuYV-infected *Arabidopsis*. Four of these genes encode cuticle proteins (Table 3b and Supplementary Table S6). The fatty acyl-CoA reductase wat-like isoform X1 gene (g11235) that was also expressed at a higher level in the presence of CaMV, compared to TuYV, belongs to a gene family mediating the synthesis of insect cuticular hydrocarbons that are involved in the waterproofing of insect cuticles but also functions in signaling (Blomquist & Ginzl, 2021).

In addition to developmental genes, nine *Myzus* genes related to defense and detoxification responses were differentially expressed in *Myzus* after acquisition of TuYV on *Arabidopsis*, compared to acquisition of CaMV on *Arabidopsis* (Table 3a,b and Supplementary Table S5). For example, variable deregulations in the different conditions were observed for four genes of the UDP-glucuronosyl transferase gene family encoding detoxification enzymes (Brierley & Burchell, 1993). However, other genes that could be related to defense and/or detoxification were expressed at higher levels in CaMV-exposed aphids compared to aphids fed on TuYV-infected plants, such as the gene encoding the Havan serine protease (g21180), which

Table 3. Selected genes differentially expressed in aphids feeding on TuYV-infected vs CaMV-infected Arabidopsis. a) up-regulated on TuYV-infected Arabidopsis and b) up-regulated on CaMV-infected Arabidopsis. Single lines separate genes by functional categories.

Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon	Counts		
						Mock	TuYV	CaMV
Chitin degradation/reconstruction	Aphid survival, molting or development	(Arakane and Muthukrishnan, 2010)	g5369	Chitinase-like protein 4	<i>Myzus persicae</i>	56	77	37
			g10419	Chitinase-like protein PB1E7.04c	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	270	354	220
Insulin-like insect hormone	Developmental protein (embryo, tracheal)	(Ding et al., 2017)	g7214	Bombyxin C-2-like	<i>Myzus persicae</i>	274	274	174
			g24564	Zinc finger protein Elbow-like	<i>Myzus persicae</i>	954	1305	880
Hormone / Neurotransmitter	Development (wing)	(Wang et al. 2016)	g15146	Octopamine receptor Oamb	<i>Myzus persicae</i>	64	117	50
			g5303	Homeotic protein distal-less-like	<i>Myzus persicae</i>	279	416	267
Transcription factor	Aphid physiological response to plant defense	(Tomlinson, 1998)	g21619	UDP-glucuronosyl transferase 344D9	<i>Myzus persicae</i>	119	150	48
			g26170	UDP-glucuronosyltransferase 2B2-like	<i>Myzus persicae</i>	6090	4348	2641
Immune response and Detoxification (plant defense)	Aphid physiological response to plant defense	(Field and Devonshire, 1998) (Brierley and Burchell, 1993)	g23179	UDP-glucuronosyltransferase 2C1-like isoform X1	<i>Myzus persicae</i>	610	374	228
			g21618	UDP-glucuronosyltransferase 2B9-like isoform X9	<i>Myzus persicae</i>	1109	495	335

Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon	Counts		
						Mock	TuYV	CaMV
Structural protein	Aphid development - Virus interaction	(Deshoux et al., 2018)	g21495	Cuticle protein 7-like	<i>Myzus persicae</i>	125	152	60
			g27579	Cuticular protein-like precursor	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	2106	4663	2153
Cuticle synthesis	Aphid development - Virus interaction	(Blomquist and Ginzel, 2021)	g21493	Cuticle protein-like	<i>Myzus persicae</i>	2075	2794	1558
			g21498	RR2 cuticle protein 3, partial	<i>Myzus persicae</i>	4063	8289	5229
Membrane	Melanization immune response	(Patton et al., 2021a)	g11235	Fatty acyl-CoA reductase wat-like isoform X1	<i>Myzus persicae</i>	89	240	130
			g10551	Histidine-rich glycoprotein-like	<i>Myzus persicae</i>	2176	3132	2060
Antimicrobial peptide	Immune system	(Li et al., 2012)	g21180	Serine protease Hayan	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	3376	6374	4356
			g27576	Repetitive proline-rich cell wall protein 2-like	<i>Myzus persicae</i>	3286	4109	1615
Transcription factor	Aphid feeding behavior	(DeBlasio et al., 2021)	g27577	Repetitive proline-rich cell wall protein 2-like	<i>Myzus persicae</i>	7450	10736	6467
			g25790	Nuclear transcription factor Y subunit beta-like	<i>Myzus persicae</i>	10302	14330	9022
Saliva protein	Aphid feeding behavior	(Will et al., 2009) (Roux and Steinebrunner, 2007)	g15329	Regucalcin-like isoform X1	<i>Myzus persicae</i>	3804	10859	5495
			g12364	Soluble calcium-activated nucleotidase 1-like isoform X2	<i>Myzus persicae</i>	9335	5354	2971

activates the melanization immune response to physical or septic wounding (Nam et al., 2012) and a gene encoding a histidine-rich glycoprotein (g10551). A gene coding for an anti-microbial peptide, repetitive proline-rich cell wall protein 2-like (g27577) (Li et al., 2012), was also expressed at higher levels in aphids fed on CaMV-infected plants than in aphids fed on TuYV-infected plants. A similar trend was found for the nuclear transcription factor Y subunit beta-like (g25790), which might interact with PLRV virions (DeBlasio et al., 2021) and a homolog of which belongs to the upregulated genes associated with the KEGG category “viral infectious disease” in whiteflies feeding on tomato infected with semi-persistent cucurbit yellow stunting disorder virus (genus *Crinivirus*, family *Closteroviridae*) (Kaur et al., 2019). Overall, we observed that different immune defense and detoxification pathways are affected in *Myzus* feeding on CaMV-infected *Arabidopsis*, compared to *Myzus* feeding on TuYV-infected *Arabidopsis*. This might be related to the different transmission modes of the two viruses. TuYV being circulative is expected to interact intimately with the vector and maybe even evade immune responses. On the other hand, CaMV interaction with the vector is confined to the stylet tip. Therefore, CaMV might rather modulate feeding responses. This might be illustrated by the strong activation of saliva genes (see below) following CaMV acquisition, whereas the impact of CaMV on developmental genes was comparably low. However, one needs to keep in mind that we discuss here only a subset of 90 most strongly deregulated genes in CaMV-exposed aphids compared to TuYV-exposed aphids.

Interestingly, in aphids feeding on CaMV-infected *Arabidopsis*, considerably more genes related to salivary proteins were expressed at higher levels, compared to those feeding on TuYV-infected *Arabidopsis*. Salivary proteins, liberated in the apoplast and plant cells or in the phloem during aphid probing and feeding activity, respectively, are excellent candidates to target defense pathways directly in the plant. Among them was the gene encoding a regucalcin (g15329) that has been identified earlier in the saliva of other aphid species (van Bel & Will, 2016). Regucalcin and other calcium-binding proteins could reduce calcium availability in the phloem, and subsequently inhibit aphid-induced calcium-mediated sieve tube occlusion in the plant, which is observed in incompatible aphid-plant interactions (Will et al., 2009). Another gene encodes the soluble calcium-activated nucleotidase 1-like isoform X2 (g12364), which has previously been annotated in whitefly salivary glands (Su et al., 2012) and is predicted to be a secretory ATP-hydrolyzing protein that could be involved in reducing the concentration of extracellular ATP and suppressing plant defenses during whitefly feeding (Roux & Steinebrunner, 2007). Altogether, these aphid DEGs and the genes discussed above (see section 2b) indicate that CaMV acquisition affects aphid saliva secretion on infected *Arabidopsis*. To explain this finding, we propose two non-exclusive hypotheses. In the first one, the more severe phenotype of CaMV-infected *Arabidopsis*, compared to TuYV-infected *Arabidopsis*, could induce adaptive changes of the aphid secretome to allow successful settlement on the plants. In the second hypothesis, CaMV could directly alter the saliva transcriptome. Whatever the mechanisms, these deregulations could be responsible for the changes in the feeding behavior of aphids on CaMV-infected *Arabidopsis* plants (Chesnais et al., 2021).

3b TuYV vs CaMV in *Camelina*

Only 22 DEGs were found for aphids on TuYV- vs CaMV-infected *Camelina*, 17 expressed at higher levels in TuYV-exposed aphids and 5 expressed at higher levels in CaMV-exposed aphids (Fig. 1e). This small number of expression changes, in comparison to aphids fed on *Arabidopsis*, indicates strong host plant effects. They might be caused by differential host plant susceptibility to the viruses or different host-vector associations/suitability.

Among the genes expressed at higher levels in aphids on TuYV-infected vs aphids on CaMV-infected *Camelina*, we identified aphid genes related to development, such as the gene encoding a glycine-rich cell wall structural protein-like (g7216) implicated in chitin-based cuticle development (Table 4, see the complete list in Table S7). This again suggests that TuYV may target aphid performance by inducing morphological changes, for example, the formation of wings that could enhance transmission.

Two immune-responsive aphid DEGs on *Camelina* were different from those observed in aphids feeding on *Arabidopsis*, again denoting some host specificity. One gene (g9870), expressed at higher levels in TuYV-exposed aphids than in CaMV-exposed aphids, encodes dual oxidase maturation factor 1 that is required for activation of dual oxidases and is involved in the control of reactive oxygen species (ROS) generation and signaling (De Deken et al., 2014). Its fruit fly ortholog is involved in antimicrobial defense mechanisms in the *Drosophila* intestine (Kim & Lee, 2014). Another gene (g18794), expressed at higher levels in TuYV-

Table 4. Selected genes upregulated in aphids feeding on TuVW-infected vs CaMV-infected Camelina. Single lines separate genes by functional categories.

Functional category	Potential effects on aphids	Reference(s)	Name	Gene description annotation	Top hit Taxon	Counts		log ₂ FC	padj	
						Mock	TuVW			
Chitin-based cuticle development	Aphid development		g7216	Glycine-rich cell wall structural protein-like	Myzus	3672	4861	3099	0,65	1,74E-02
					<i>persicae</i>					
Control of ROS and signaling	Immune system / Defense	(De Deken et al., 2014)	g9870	Dual oxidase maturation factor 1	Myzus	1699	2215	1448	0,61	2,88E-03
					<i>persicae</i>					
Regulates calcium entry	Aphid metabolism	(Hou et al., 2020)	g18794	Calcium release-activated calcium channel protein 1-like isoform X1	Myzus	1714	2254	1695	0,41	3,13E-02
					<i>persicae</i>					
Hydrolase / Amino acid metabolism	Aphid metabolism		g24259	Protein THEM6-like (Thioesterase-like superfamily)	Myzus	1060	1205	779	0,63	1,30E-02
					<i>persicae</i>					

exposed compared to CaMV-exposed aphids, encodes a calcium release-activated calcium channel protein 1-like isoform X1 protein that regulates calcium entry into non-excitabile cells and is required for proper immune function in *Drosophila* (Hou et al., 2020).

Finally, we observed that the gene coding for the protein THEM6-like (g24259) was expressed in TuYV-exposed aphids at a higher level than in CaMV-exposed aphids.

The five genes expressed at higher levels in aphids infesting CaMV-infected *Camelina* as compared to those infesting TuYV-infected *Camelina* were already discussed in previous sections of this manuscript.

Taken together, our results show that DEGs of aphids infesting TuYV-infected vs CaMV-infected *Arabidopsis* are quite different from those of aphids infesting another plant infected with these viruses, *Camelina*, even if these two plants have strong phylogenetical proximity. This reinforces the idea that responses of insect vectors had a strong host-virus specificity in our experimental system.

Concluding remarks

We here compared the transcriptome profiles in *Myzus* aphids infesting two host-plant species from the family *Brassicaceae* (*Arabidopsis* and *Camelina*) infected with two viruses from different families with different transmission modes (circulative persistent TuYV and non-circulative semi-persistent CaMV). We found a strong plant species-dependent response of the aphid transcriptome to infection with either of the two viruses. This is evidenced by the higher number of aphid DEGs and stronger expression changes on virus-infected *Arabidopsis* compared to *Camelina*, regardless of the virus. Because the aphids were raised on Chinese cabbage before being transferred onto test plants for the experiments, a host switch effect might contribute to the observed transcriptome changes (Pinheiro et al., 2017; Mathers et al., 2017). However, we believe they are mostly neutralized by the experimental set-up, because the condition ‘aphid on mock-inoculated plant’ (*Arabidopsis* or *Camelina*) and not ‘aphid on Chinese cabbage’ was used as the reference for extracting mock vs virus transcriptome changes. Thus, we should have observed mostly (but probably not exclusively) changes due to viruses’ effects on aphids. It is worth noting that a plant transcriptome analysis has revealed a different picture (Chesnais, Golyaev, et al., 2022). There, TuYV altered a smaller number of plant DEGs in *Arabidopsis* and *Camelina* than did CaMV, suggesting a strong virus-specific effect on the two plant hosts. Thus, the global aphid transcriptome response to plant infection by the two viruses described here does not correlate with the global plant transcriptome response to the virus infection.

The amplitude of most expression changes was rather low ($\log_2FC < |2|$). The most obvious reason for this is technical, i.e. the use of whole aphids for RNA extraction diluted organ-specific expression changes. So, in reality, the number of DEGs and their degree of change might be higher than reported here. Only future experiments using dissected organs or micro-dissected samples will solve this issue. Nonetheless, we extracted significant information from the data. We found that stress-related aphid genes were downregulated in *Myzus* on both infected plants (regardless of the virus). This suggests that both CaMV and TuYV infections facilitate the establishment of *Myzus* on the plants, likely by downregulating expression of plant genes implicated in anti-herbivore secondary metabolism such as the jasmonic acid pathway as shown in by us in the same experimental setup (Chesnais, Golyaev, et al., 2022). Apart from common transcriptomic changes induced by both viruses, our results indicate that there are also virus-specific gene expression changes, which might be related to the transmission mode. Overall, the circulative non-propagative TuYV tended to affect developmental genes, which could increase the proportion of alate (winged) aphids in TuYV viruliferous aphids, but also contribute to their locomotion, neuronal activity and lifespan, whereas the non-circulative semi-persistent (stylet-borne) CaMV had a stronger impact on feeding-related genes and in particular those related to salivary proteins. Overall, these transcriptome alterations target pathways that seem to be particularly adapted to the transmission mode of the corresponding virus. Long-term interactions of TuYV and its aphid vectors are expected and alterations of developmental genes, potentially promoting aphid dispersion at the population level (alate morphs with higher mobility and longer lifespan), could be a suitable strategy. In support of this, we have shown increased locomotory properties of wingless TuYV-carrying aphids (Chesnais et al., 2020), but whether *Myzus* aphids on TuYV-infected plants also form more alate morphs remains to be shown. On the other hand, the short-term association of CaMV with the tip of the aphid stylets, together with a relatively brief

retention time, should favor manipulation of rather fast processes, such as initial probing and phloem feeding, encouraging fast aphid dispersion.

Next research steps should include functional validation of the candidate genes identified in our study for their role in viral manipulation, such as aphid behavior and performance, and consequently on viral transmission. Another future research direction would be to investigate post-transcriptional changes such as post-translational protein modifications, changes in localization, metabolite composition and quantity and the like, that could likewise impact vectors but cannot be traced by transcriptomic analyses.

Acknowledgements

We thank Claire Villeroy for aphid rearing and the experimental unit of INRAE Grand Est – Colmar (UEAV) for help with plant production and Nathalie Laboureau for technical assistance in total RNA extraction and analysis.

Preprint version 6 of this article has been peer-reviewed and recommended by Peer Community In Infections (<https://doi.org/10.24072/pci.infections.100006>).

Funding

This work was supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) (reference: ROME ANR-18-CE20-0017-01). Dr. Quentin Chesnais was supported by Région Grand Est (Soutien aux jeunes chercheurs, reference: 18_GE5_013). The funding sources had no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

Conflict of interest disclosure

The authors declare that they comply with the PCI rule of having no financial conflicts of interest in relation to the content of the article.

Data and supplementary information availability

Data are available online: <https://doi.org/10.1101/2022.07.18.500449>.

The raw RNA-seq data are available under project number PRJEB54781 at the European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB54781>).

Supplementary information is available online: <https://doi.org/10.1101/2022.07.18.500449>.

Table S1. Aligned reads for transcriptome profiling.

Table S2. Oligonucleotides used for RT-qPCR.

Table S3. Complete list of deregulated aphid genes in common for aphids feeding on both CaMV and TuYV-infected Arabidopsis and Camelina.

Table S4. Complete list of genes commonly deregulated in aphids feeding on CaMV-infected host plants (Arabidopsis and Camelina) ($\text{padj} < 0.05$ and $\log_2\text{FC} > |0.5|$).

Table S5. Complete list of genes upregulated in aphids feeding on TuYV-infected vs. CaMV-infected Arabidopsis ($\text{padj} < 0.05$ and $\log_2\text{FC} > |0.5|$).

Table S6. Complete list of genes upregulated in aphids feeding on CaMV-infected vs. TuYV-infected Arabidopsis ($\text{padj} < 0.05$ and $\log_2\text{FC} > |0.5|$).

Table S7. Complete lists of genes upregulated in aphids feeding on CaMV-infected vs. TuYV-infected Camelina and of genes upregulated in aphids feeding on TuYV-infected vs. CaMV-infected Camelina ($\text{padj} < 0.05$ and $\log_2\text{FC} > |0.5|$).

Figure S1. Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) validation of differentially expressed genes (DEGs) determined by Illumina RNA-seq profiling of the aphid transcriptome.

Figure S2. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways enrichment analysis of DEGs ($\log_2\text{FC} > 1$) in *Myzus persicae* in response to TuYV or CaMV infection in Arabidopsis or Camelina plants.

Dataset S1. RNA-seq data used to establish the heatmap.

References

- Afgan E, Baker D, van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C, Grüning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Von Kuster G, Rasche E, Soranzo N, Turaga N, Taylor J, Nekrutenko A, Goecks J (2016) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, **44**, W3–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Ahern-Djamali SM, Comer AR, Bachmann C, Kastenmeier AS, Reddy SK, Beckerle MC, Walter U, Hoffmann FM (1998) Mutations in Drosophila Enabled and Rescue by Human Vasodilator-stimulated Phosphoprotein (VASP) Indicate Important Functional Roles for Ena/VASP Homology Domain 1 (EVH1) and EVH2 Domains (JA Spudich, Ed.). *Molecular Biology of the Cell*, **9**, 2157–2171. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.8.2157>
- Alvarez AE, Garzo E, Verbeek M, Vosman B, Dicke M, Tjallingii WF (2007) Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of Myzus persicae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **125**, 135–144. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00607.x>
- Arakane Y, Muthukrishnan S (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **67**, 201–216. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0161-9>
- Ayub M, Hermiz M, Lange AB, Orchard I (2020) SiFamide Influences Feeding in the Chagas Disease Vector, Rhodnius prolixus. *Frontiers in Neuroscience*, **14**. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00134>
- van Bel AJE, Will T (2016) Functional Evaluation of Proteins in Watery and Gel Saliva of Aphids. *Frontiers in Plant Science*, **07**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01840>
- Bhargava KS (1951) Some Properties of Four Strains of Cucumber Mosaic Virus. *Annals of Applied Biology*, **38**, 377–388. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1951.tb07812.x>
- Blomquist GJ, Ginzl MD (2021) Chemical Ecology, Biochemistry, and Molecular Biology of Insect Hydrocarbons. *Annual Review of Entomology*, **66**, 45–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031620-071754>
- Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD (2011) The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Research*, **159**, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.020>
- Brault V, Tanguy S, Reinbold C, Le Trionnaire G, Arneodo J, Jaubert-Possamai S, Guernec G, Tagu D (2010) Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid Acyrthosiphon pisum. *Journal of General Virology*, **91**, 802–808. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012856-0>
- Brierley CH, Burchell B (1993) Human UDP-glucuronosyl transferases: Chemical defence, jaundice and gene therapy. *BioEssays*, **15**, 749–754. <https://doi.org/10.1002/bies.950151108>
- Caicedo PA, Serrato IM, Sim S, Dimopoulos G, Coatsworth H, Lowenberger C, Ocampo CB (2019) Immune response-related genes associated to blocking midgut dengue virus infection in Aedes aegypti strains that differ in susceptibility. *Insect Science*, **26**, 635–648. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12573>
- Campbell G, Tomlinson A (1998) The roles of the homeobox genes aristaless and Distal-less in patterning the legs and wings of Drosophila. *Development*, **125**, 4483–4493. <https://doi.org/10.1242/dev.125.22.4483>
- Carmo-Sousa M, Moreno A, Plaza M, Garzo E, Fereres A (2016) Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector Aphis gossypii favouring its own spread. *Annals of Applied Biology*, **169**, 284–297. <https://doi.org/10.1111/aab.12300>
- Cassone BJ, Michel AP, Stewart LR, Bansal R, Mian MAR, Redinbaugh MG (2014) Reduction in Fecundity and Shifts in Cellular Processes by a Native Virus on an Invasive Insect. *Genome Biology and Evolution*, **6**, 873–885. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu057>
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA (1995) The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 694–698. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.694>
- Chaudhary R, Atamian HS, Shen Z, Briggs SP, Kaloshian I (2015) Potato Aphid Salivary Proteome: Enhanced Salivation Using Resorcinol and Identification of Aphid Phosphoproteins. *Journal of Proteome Research*, **14**, 1762–1778. <https://doi.org/10.1021/pr501128k>

- Chen C-Y, Mao Y-B (2020) Research advances in plant–insect molecular interaction. *F1000Research*, **9**, 198. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21502.1>
- Chesnais Q, Caballero Vidal G, Coquelle R, Yvon M, Mauck K, Brault V, Ameline A (2020) Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia*, **194**, 429–440. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>
- Chesnais Q, Couty A, Uzest M, Brault V, Ameline A (2019) Plant infection by two different viruses induce contrasting changes of vectors fitness and behavior. *Insect Science*, **26**, 86–96. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12508>
- Chesnais Q, Golyaev V, Velt A, Rustenholz C, Brault V, Pooggin MM, Drucker M (2022) Comparative Plant Transcriptome Profiling of Arabidopsis thaliana Col-0 and Camelina sativa var. Celine Infested with Myzus persicae Aphids Acquiring Circulative and Noncirculative Viruses Reveals Virus- and Plant-Specific Alterations Relevant to Aphid Fe (LP Burbank, Ed.). *Microbiology Spectrum*, **10**. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00136-22>
- Chesnais Q, Sun P, Mauck KE (2022) Advanced infections by cucurbit yellow stunting disorder virus encourage whitefly vector colonization while discouraging non-vector aphid competitors. *Journal of Pest Science*, **95**, 231–247. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01394-z>
- Chesnais Q, Verdier M, Burckbuchler M, Brault V, Pooggin M, Drucker M (2021) Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, **22**, 911–920. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>
- Claudel P, Chesnais Q, Fouché Q, Krieger C, Halter D, Bogaert F, Meyer S, Boissinot S, Huguene P, Ziegler-Graff V, Ameline A, Brault V (2018) The Aphid-Transmitted Turnip yellows virus Differentially Affects Volatiles Emission and Subsequent Vector Behavior in Two Brassicaceae Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 2316. <https://doi.org/10.3390/ijms19082316>
- Dáder B, Then C, Berthelot E, Ducouso M, Ng JCK, Drucker M (2017) Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Science*, **24**, 929–946. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12470>
- Day M, Irzykiewicz H (1954) On the Mechanism of Transmission of Non-Persistent Phytopathogenic Viruses by Aphids. *Australian Journal of Biological Sciences*, **7**, 251. <https://doi.org/10.1071/BI9540251>
- De Deken X, Corvilain B, Dumont JE, Miot F (2014) Roles of DUOX-Mediated Hydrogen Peroxide in Metabolism, Host Defense, and Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, **20**, 2776–2793. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5602>
- DeBlasio SL, Wilson JR, Tamborindeguy C, Johnson RS, Pinheiro PV, MacCoss MJ, Gray SM, Heck M (2021) Affinity Purification–Mass Spectrometry Identifies a Novel Interaction between a Polerovirus and a Conserved Innate Immunity Aphid Protein that Regulates Transmission Efficiency. *Journal of Proteome Research*, **20**, 3365–3387. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00313>
- Decrem Y, Beaufays J, Blasioli V, Lahaye K, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008) A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick Ixodes ricinus. *The FEBS Journal*, **275**, 1485–1499. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06308.x>
- Deshoux M, Monsion B, Uzest M (2018) Insect cuticular proteins and their role in transmission of phytoviruses. *Current Opinion in Virology*, **33**, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.015>
- Dietzgen R, Mann K, Johnson K (2016) Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses*, **8**, 303. <https://doi.org/10.3390/v8110303>
- Ding T-B, Li J, Chen E-H, Niu J-Z, Chu D (2019) Transcriptome Profiling of the Whitefly Bemisia tabaci MED in Response to Single Infection of Tomato yellow leaf curl virus, Tomato chlorosis virus, and Their Co-infection. *Frontiers in Physiology*, **10**. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00302>
- Ding B-Y, Shang F, Zhang Q, Xiong Y, Yang Q, Niu J-Z, Smaghe G, Wang J-J (2017) Silencing of Two Insulin Receptor Genes Disrupts Nymph-Adult Transition of Alate Brown Citrus Aphid. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, 357. <https://doi.org/10.3390/ijms18020357>
- Enders LS, Bickel RD, Brisson JA, Heng-Moss TM, Siegfried BD, Zera AJ, Miller NJ (2015) Abiotic and Biotic Stressors Causing Equivalent Mortality Induce Highly Variable Transcriptional Responses in the Soybean Aphid. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, **5**, 261–270. <https://doi.org/10.1534/g3.114.015149>
- Fereres A, Moreno A (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, **141**, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>

- Field ML, Devonshire LA (1998) Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. *Biochemical Journal*, **330**, 169–173. <https://doi.org/10.1042/bj3300169>
- Grantham ME, Shingleton AW, Dudley E, Brisson JA (2020) Expression profiling of winged- and wingless-destined pea aphid embryos implicates insulin/insulin growth factor signaling in morph differences. *Evolution & Development*, **22**, 257–268. <https://doi.org/10.1111/ede.12326>
- Gray SM, Banerjee N (1999) Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**, 128–148. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.128-148.1999>
- Guo H, Zhang Y, Tong J, Ge P, Wang Q, Zhao Z, Zhu-Salzman K, Hogenhout SA, Ge F, Sun Y (2020) An Aphid-Secreted Salivary Protease Activates Plant Defense in Phloem. *Current Biology*, **30**, 4826–4836.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.020>
- Gupta AK, Scully ED, Palmer NA, Geib SM, Sarath G, Hein GL, Tatineni S (2019) Wheat streak mosaic virus alters the transcriptome of its vector, wheat curl mite (*Aceria tosichella* Keifer), to enhance mite development and population expansion. *Journal of General Virology*, **100**, 889–910. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001256>
- Hasegawa DK, Chen W, Zheng Y, Kaur N, Wintermantel WM, Simmons AM, Fei Z, Ling K-S (2018) Comparative transcriptome analysis reveals networks of genes activated in the whitefly, *Bemisia tabaci* when fed on tomato plants infected with Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, **513**, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.10.008>
- Hopp CS, Sinnis P (2015) The innate and adaptive response to mosquito saliva and *Plasmodium* sporozoites in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1342**, 37–43. <https://doi.org/10.1111/nyas.12661>
- Hou X, Outhwaite IR, Pedi L, Long SB (2020) Cryo-EM structure of the calcium release-activated calcium channel Orai in an open conformation. *eLife*, **9**. <https://doi.org/10.7554/eLife.62772>
- Huang H-J, Liu C-W, Xu H-J, Bao Y-Y, Zhang C-X (2017) Mucin-like protein, a saliva component involved in brown planthopper virulence and host adaptation. *Journal of Insect Physiology*, **98**, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.012>
- Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA (2012) Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, **2**, 578. <https://doi.org/10.1038/srep00578>
- Jayasinghe WH, Kim H, Nakada Y, Masuta C (2021) A plant virus satellite RNA directly accelerates wing formation in its insect vector for spread. *Nature Communications*, **12**, 7087. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27330-4>
- Johnston N, Martini X (2020) The Influence of Visual and Olfactory Cues in Host Selection for *Bemisia tabaci* Biotype B in the Presence or Absence of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Insects*, **11**, 115. <https://doi.org/10.3390/insects11020115>
- Kanamori Y, Saito A, Hagiwara-Komoda Y, Tanaka D, Mitsumasu K, Kikuta S, Watanabe M, Cornette R, Kikawada T, Okuda T (2010) The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **40**, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.006>
- Kanehisa M (1996) Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways. *Science & Technology Japan*, **59**, 34–38.
- Kaur N, Chen W, Fei Z, Wintermantel WM (2019) Differences in gene expression in whitefly associated with CYSDV-infected and virus-free melon, and comparison with expression in whiteflies fed on ToCV- and TYLCV-infected tomato. *BMC Genomics*, **20**, 654. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5999-0>
- Kim S-H, Lee W-J (2014) Role of DUOX in gut inflammation: lessons from *Drosophila* model of gut-microbiota interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **3**. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00116>
- Lemke SB, Schnorrer F (2017) Mechanical forces during muscle development. *Mechanisms of Development*, **144**, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.11.003>
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, **52**, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>

- Li D, Su D, Tong Z, Zhang C, Zhang G, Zhao H, Hu Z (2019) Virus-Dependent and -Independent Responses of *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) Feeding on Wheat Infected by Transmitted and Nontransmitted Viruses at Transcriptomic Level (J Chiu, Ed.). *Journal of Economic Entomology*, **112**, 2067–2076. <https://doi.org/10.1093/jee/toz162>
- Li L, Wang H, Hu L, Wu X, Zhao B, Fan Z, Zhang C, Wang J, Wang S (2018) Age associated decrease of sialin in salivary glands. *Biotechnic & Histochemistry*, **93**, 505–511. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1463453>
- Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, **37**, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Li D, Zhang C, Tong Z, Su D, Zhang G, Zhang S, Zhao H, Hu Z (2020) Transcriptome response comparison between vector and non-vector aphids after feeding on virus-infected wheat plants. *BMC Genomics*, **21**, 638. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07057-0>
- Liang Y, Ma K-S, Liang P-Z, Yang L-W, Zhang L, Gao X-W (2021) Combined Transcriptomic and Proteomic Analysis of *Myzus persicae*, the Green Peach Aphid, Infected with Cucumber Mosaic Virus. *Insects*, **12**, 372. <https://doi.org/10.3390/insects12050372>
- Liu S, Chougule NP, Vijayendran D, Bonning BC (2012) Deep Sequencing of the Transcriptomes of Soybean Aphid and Associated Endosymbionts (D Doucet, Ed.). *PLoS ONE*, **7**, e45161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045161>
- Markham PG, Pinner MS, Raccach B, Hull R (1987) The acquisition of a caulimovirus by different aphid species: comparison with a potyvirus. *Annals of Applied Biology*, **111**, 571–587. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1987.tb02015.x>
- Mathers TC, Chen Y, Kaithakottil G, Legeai F, Mugford ST, Baa-Puyoulet P, Bretaudeau A, Clavijo B, Colella S, Collin O, Dalmay T, Derrien T, Feng H, Gabaldón T, Jordan A, Julca I, Kettles GJ, Kowitzanich K, Lavenier D, Lenzi P, Lopez-Gomollon S, Loska D, Mapleson D, Maumus F, Moxon S, Price DRG, Sugio A, van Munster M, Uzeit M, Waite D, Jander G, Tagu D, Wilson ACC, van Oosterhout C, Swarbreck D, Hogenhout SA (2017) Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biology*, **18**, 27. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1145-3>
- Mathers TC, Wouters RHM, Mugford ST, Swarbreck D, van Oosterhout C, Hogenhout SA (2021) Chromosome-Scale Genome Assemblies of Aphids Reveal Extensively Rearranged Autosomes and Long-Term Conservation of the X Chromosome (A Ouangraoua, Ed.). *Molecular Biology and Evolution*, **38**, 856–875. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa246>
- Matthews RC (2014) *Fundamentals of Plant Virology*. Elsevier, Saint Louis. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64974-1>
- Mauck K, Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses (C Fox, Ed.). *Functional Ecology*, **26**, 1162–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>
- Mauck KE, Chesnais Q, Shapiro LR (2018) Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. *Advances in Virus Research*, **101**, 189–250. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107>
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2014) Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell & Environment*, **37**, 1427–1439. <https://doi.org/10.1111/pce.12249>
- Mauck KE, Kenney J, Chesnais Q (2019) Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, **33**, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.001>
- Mayoral JG, Nouzova M, Navare A, Noriega FG (2009) NADP + -dependent farnesol dehydrogenase, a corpora allata enzyme involved in juvenile hormone synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 21091–21096. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909938106>

- Naessens E, Dubreuil G, Giordanengo P, Baron OL, Minet-Kebdani N, Keller H, Coustau C (2015) A Secreted MIF Cytokine Enables Aphid Feeding and Represses Plant Immune Responses. *Current Biology*, **25**, 1898–1903. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.047>
- Nam H-J, Jang I-H, You H, Lee K-A, Lee W-J (2012) Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Hyan Protease-Phenoloxidase system in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, **31**, 1253–1265. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.476>
- Ng A, Xavier RJ (2011) Leucine-rich repeat (LRR) proteins: Integrators of pattern recognition and signaling in immunity. *Autophagy*, **7**, 1082–1084. <https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16464>
- Patton MF, Hansen AK, Casteel CL (2021) Potato leafroll virus reduces *Buchnera aphidicola* titer and alters vector transcriptome responses. *Scientific Reports*, **11**, 23931. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02673-6>
- Pham M, Underwood J, Oliva Chávez AS (2021) Changing the Recipe: Pathogen Directed Changes in Tick Saliva Components. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **18**, 1806. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041806>
- Pinheiro PV, Ghanim M, Alexander M, Rebelo AR, Santos RS, Orsburn BC, Gray S, Cilia M (2017) Host Plants Indirectly Influence Plant Virus Transmission by Altering Gut Cysteine Protease Activity of Aphid Vectors. *Molecular & Cellular Proteomics*, **16**, S230–S243. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.063495>
- Qin F, Liu W, Wu N, Zhang L, Zhang Z, Zhou X, Wang X (2018) Invasion of midgut epithelial cells by a persistently transmitted virus is mediated by sugar transporter 6 in its insect vector (J Carr, Ed.). *PLoS Pathogens*, **14**, e1007201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007201>
- Reinink K, Dieleman FL, Jansen J, Montenerie AM (1989) Interactions between plant and aphid genotypes in resistance of lettuce to *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae*. *Euphytica*, **43**, 215–222. <https://doi.org/10.1007/BF00023056>
- Rispe C, Kutsukake M, Doublet V, Hudaverdian S, Legeai F, Simon J-C, Tagu D, Fukatsu T (2007) Large Gene Family Expansion and Variable Selective Pressures for Cathepsin B in Aphids. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 5–17. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm222>
- Rodriguez PA, Bos JIB (2013) Toward Understanding the Role of Aphid Effectors in Plant Infestation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, **26**, 25–30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0119-FI>
- Roux SJ, Steinebrunner I (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends in Plant Science*, **12**, 522–527. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.09.003>
- Shang F, Niu J, Ding B-Y, Zhang W, Wei D-D, Wei D, Jiang H-B, Wang J-J (2020) The miR-9b microRNA mediates dimorphism and development of wing in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**, 8404–8409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919204117>
- Shangguan X, Zhang J, Liu B, Zhao Y, Wang H, Wang Z, Guo J, Rao W, Jing S, Guan W, Ma Y, Wu Y, Hu L, Chen R, Du B, Zhu L, Yu D, He G (2018) A Mucin-Like Protein of Planthopper Is Required for Feeding and Induces Immunity Response in Plants. *Plant Physiology*, **176**, 552–565. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00755>
- Stafford-Banks CA, Rotenberg D, Johnson BR, Whitfield AE, Ullman DE (2014) Analysis of the Salivary Gland Transcriptome of *Frankliniella occidentalis* (X-W Wang, Ed.). *PLoS ONE*, **9**, e94447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094447>
- Sterchi E, Stöcker W, Bond J (2008) Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, **29**, 309–328. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.002>
- Su Y-L, Li J-M, Li M, Luan J-B, Ye X-D, Wang X-W, Liu S-S (2012) Transcriptomic Analysis of the Salivary Glands of an Invasive Whitefly (J Vontas, Ed.). *PLoS ONE*, **7**, e39303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039303>
- Sylvester ES (1956) Beet Yellow Virus Transmission by the Green Peach Aphid. *Journal of Economic Entomology*, **49**, 789–800. <https://doi.org/10.1093/jee/49.6.789>
- Tjallingii WF, Hogen Esch T (1993) Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, **18**, 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Tsuge S, Kobayashi K, Nakayashiki H, Okuno T, Furusawa I (1994) Replication of cauliflower mosaic virus ORF I mutants in turnip protoplasts. *Annals of the Phytopathological Society Japan*, **60**, 27–35. <https://doi.org/10.3186/jiphytopath.60.27>

- Turner MD (2016) Hyposalivation and Xerostomia. *Dental Clinics of North America*, **60**, 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.11.003>
- Veidt I, Lot H, Leiser M, Scheidecker D, Guilley H, Richards K, Jonard G (1988) Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9917–9932. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9917>
- de Vries HI, Uyetake L, Lemstra W, Brunsting JF, Su TT, Kampinga HH, Sibon OCM (2005) Grp/DChk1 is required for G2-M checkpoint activation in *Drosophila* S2 cells, whereas Dmnc/DChk2 is dispensable. *Journal of Cell Science*, **118**, 1833–1842. <https://doi.org/10.1242/jcs.02309>
- Wang X-W, Li P, Liu S-S (2017) Whitefly interactions with plants. *Current Opinion in Insect Science*, **19**, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.02.001>
- Wang W, Luo L, Lu H, Chen S, Kang L, Cui F (2015) Angiotensin-converting enzymes modulate aphid–plant interactions. *Scientific Reports*, **5**, 8885. <https://doi.org/10.1038/srep08885>
- Wang H, Wu K, Liu Y, Wu Y, Wang X (2015) Integrative proteomics to understand the transmission mechanism of Barley yellow dwarf virus-GPV by its insect vector *Rhopalosiphum padi*. *Scientific Reports*, **5**, 10971. <https://doi.org/10.1038/srep10971>
- Wang X-X, Zhang Y, Zhang Z-F, Tian H-G, Liu T-X (2016) Deciphering the Function of Octopaminergic Signaling on Wing Polyphenism of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Frontiers in Physiology*, **7**. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00603>
- Webster CG, Pichon E, van Munster M, Monsion B, Deshoux M, Gargani D, Calevro F, Jimenez J, Moreno A, Krenz B, Thompson JR, Perry KL, Fereres A, Blanc S, Uzzet M (2018) Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors (AE Simon, Ed.). *Journal of Virology*, **92**. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18>
- Weihe U, Dorfman R, Wernet MF, Cohen SM, Milán M (2004) Proximodistal subdivision of *Drosophila* legs and wings: the elbow - no ocelli gene complex. *Development*, **131**, 767–774. <https://doi.org/10.1242/dev.00979>
- Widana Gamage SMK, Rotenberg D, Schneweis DJ, Tsai C-W, Dietzgen RG (2018) Transcriptome-wide responses of adult melon thrips (*Thrips palmi*) associated with capsicum chlorosis virus infection (Y Gao, Ed.). *PLoS ONE*, **13**, e0208538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208538>
- Will T, Kornemann SR, Furch ACU, Tjallingii WF, van Bel AJE (2009) Aphid watery saliva counteracts sieve-tube occlusion: a universal phenomenon? *Journal of Experimental Biology*, **212**, 3305–3312. <https://doi.org/10.1242/jeb.028514>
- Will T, Steckbauer K, Hardt M, van Bel AJE (2012) Aphid Gel Saliva: Sheath Structure, Protein Composition and Secretory Dependence on Stylet-Tip Milieu (W Hong, Ed.). *PLoS ONE*, **7**, e46903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046903>
- Will T, Vilcinskis A (2015) The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **57**, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.12.005>
- Xu J, Willman M, Todd J, Kim K-H, Redinbaugh MG, Stewart LR (2021) Transcriptome of the Maize Leafhopper (*Dalbulus maidis*) and Its Transcriptional Response to Maize Rayado Fino Virus (MRFV), Which It Transmits in a Persistent, Propagative Manner (M Kalia, Ed.). *Microbiology Spectrum*, **9**. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00612-21>
- Young MD, Wakefield MJ, Smyth GK, Oshlack A (2010) Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biology*, **11**, R14. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-2-r14>
- Zhang C-X, Brisson JA, Xu H-J (2019) Molecular Mechanisms of Wing Polymorphism in Insects. *Annual Review of Entomology*, **64**, 297–314. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112448>

Texte principal

L'étude du transcriptome de plantes infectées a permis des avancées dans la description d'acteurs impliqués dans l'établissement de l'infection, à la fois sur le plan structurel mais aussi fonctionnel (Zanardo et al., 2019). Afin d'appréhender la réponse des vecteurs aux virus de plante, des travaux d'analyse du transcriptome ont récemment été réalisés pour plusieurs pathosystèmes (He et al., 2023; Liang et al., 2021; Patton et al., 2021). Bien que ces études soient souvent réalisées sur le transcriptome de la même espèce de puceron, *Myzus persicae*, le nombre de gènes différentiellement dérégulés (DEG) en présence ou non des virus varie de quelques dizaines (Patton et al., 2021) à plus d'un millier (He et al., 2023) ou plusieurs dizaines de milliers (Liang et al., 2021). Ces résultats témoignent d'un effet virus spécifique des réponses transcriptomiques des vecteurs. L'obtention du transcriptome de pucerons après plusieurs jours d'alimentation sur des plantes infectées par le turnip yellows virus (TuYV) ou le cauliflower mosaic virus (CaMV) n'a jamais été réalisée et pourrait permettre d'expliquer les modifications comportementales ou physiologiques induites par ces derniers (voir chapitre 1 à 3).

Nous avons obtenu le transcriptome des pucerons dans les mêmes conditions que celles de l'étude transcriptomique effectuée sur les plantes infectées ainsi que l'étude des effets post-acquisitions (chapitre 3 ; Chesnais et al., 2022), c'est-à-dire que les pucerons ont pu s'alimenter pendant trois jours sur des Arabidopsis ou Camelines saines ou infectées par le TuYV ou le CaMV, avant d'être récoltés (Chesnais et al., 2022). Nous avons trié les DEG selon des critères permettant d'identifier des pools de gènes spécifiques pour des conditions distinctes (DEG communs ou spécifiques pour les virus et les plantes hôtes). La première analyse a révélé une proportion conséquente de gènes communément dérégulés par les deux infections virales, parmi lesquels de nombreux gènes ayant des fonctions générales dans les interactions plante-virus-pucerons (cathepsine, sialine-like), ou encore des gènes de réponses au stress (cytochromes P450, glutathion S-transférase). Il a également été constaté que certaines des dérégulations du transcriptome de *M. persicae* étaient virus spécifique. En effet, le TuYV a tendance à affecter les gènes de développement de *M. persicae*. On peut supposer que cela pourrait augmenter la proportion de pucerons ailés, mais aussi affecter leur locomotion, leur activité neuronale ou leur durée de vie. En revanche, le CaMV a un fort impact sur les gènes liés à l'alimentation et en particulier ceux des protéines salivaires. Ces dérégulations pourraient être impliquées dans les modifications du comportement alimentaire induite par le CaMV précédemment observées (Chapitre 1; Chesnais et al., 2021; Verdier et al., 2023). Cependant, la quantité énorme (~2000 DEG) de dérégulations transcriptomiques rend l'association d'une modification comportementale à un gène ou une famille de gènes distincts extrêmement difficile. Pour autant, nous avons commencé d'évaluer empiriquement l'implication de quelques gènes candidats dans les modifications du comportement de *M. persicae*. Pour cela, différentes approches sont possibles. Nous avons choisi de réduire artificiellement (knock-down) l'expression de certains gènes de *M. persicae* à l'aide d'un système VIGS (virus-induced gene silencing). Des fragments de séquences codantes des gènes candidats ont été clonés dans le génome du tobacco rattle virus (TRV ; Famille : *Virgaviridae* ; Genus : *Tobravirus*) afin de générer des ARNdb lors de la réplication du TRV dans Arabidopsis. Ces ARNdb sont ensuite ingérés par les pucerons s'alimentant sur les plantes infectées et

vont déclencher le mécanisme de RNA silencing contre les ARNm des candidats, permettant la réduction de leur expression. Ce système étant basé sur le vecteur VIGS construit par Burch-Smith et al. (2006) a déjà été utilisé précédemment par notre équipe (Mulot et al., 2016).

La sélection des candidats parmi la liste proposée dans Chesnais et al. (2022) a été effectuée à partir d'une étude bibliographique. Nous avons sélectionné des gènes codant des protéines potentiellement secrétées dans la salive (déterminés par la présence notamment d'une séquence « signal peptide ») afin d'étudier leurs effets sur le comportement alimentaire. Suite à des difficultés de clonage, uniquement les rôles de trois gènes candidats ont pu être évalués en comportement. Les gènes codant pour une Astacine (g7709) et une Mucine (g27683) sont dérégulés positivement chez *M. persicae* en présence du CaMV alors que le gène *ACE1* (g22588) est sur-exprimé en présence du CaMV et également du TuYV. L'Astacine appartient à une famille des métalloprotéases qui interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires et extracellulaires y compris la digestion (Sterchi et al., 2009). Si elle est sécrétée dans la salive, cette protéine pourrait participer à l'inhibition des voies de défense de la plante. Des Mucines ont déjà été caractérisées chez d'autres hémiptères comme le fulgore *Nilaparvata lugens* (Famille : *Delphacidae*), où elles sont retrouvées dans la salive aqueuse et gélifiante et sont nécessaires à l'alimentation des insectes. Il est probable que leurs homologues chez *M. persicae* aient des fonctions similaires et soient impliquées dans l'alimentation. *ACE1* a été précédemment étudiée chez *Acyrtosiphon pisum*, cette protéine est exprimée dans les glandes salivaires et module les interactions plante-puceron en affectant le comportement alimentaire et la survie des pucerons sur les plantes hôtes (Wang et al., 2015). Plus précisément, le knock-down des gènes *ACE1* et *ACE2* dans les glandes salivaires réduit la durée de vie d'*A. pisum* lorsqu'il se nourrit sur des plantes mais pas sur un milieu nutritif artificiel. Ainsi, *ACE1* pourrait favoriser les performances des pucerons en réduisant les défenses de la plante.

Confirmation de l'efficacité du système VIGS

Nous avons réduit artificiellement l'expression des gènes cibles par VIGS avec un vecteur TRV, puis mesuré la transmission virale, mais également des traits comportementaux et physiologiques chez des pucerons « silencés ». L'induction du mécanisme de RNA-silencing causé par la présence d'ARNdb du TRV a été confirmée visuellement en utilisant une construction ciblant le gène *PDS* (phytoene desaturase gene) d'*Arabidopsis* (Figure 1a). L'extinction locale de l'expression du gène *PDS* empêche le développement des chloroplastes qui ne dépassent pas le stade de proplaste et produit un phénotype caractéristique de nanisme de la plante ainsi que le blanchiment des feuilles (Qin et al., 2007) (Figure 1a).

La réduction d'expression de gènes cibles dans *Myzus* a quant à elle été quantifiée par RT-qPCR (Figure 1b). Les réductions d'expression des gènes codant pour *ACE1*, l'Astacine et la Mucine chez les pucerons « silencés » étaient de 32%, 30% et 38%, respectivement, en comparaison de pucerons s'étant développés sur des *Arabidopsis* infectées par un vecteur VIGS contrôle ciblant l'opéron lactose chez *E. coli* (TRV-LacZ) (Figure 1b). Cependant la réduction d'expression était significative uniquement pour les constructions TRV-*ACE1* et TRV-Mucine (ANOVA univariée, $F = 8.842$, $p = 0.041$; $F = 10.91$, $p = 0.0298$) et non pour la

construction TRV-Astacine, malgré une réduction comparable d'expression (ANOVA univariée, $F = 0.295$, $p = 0.616$).

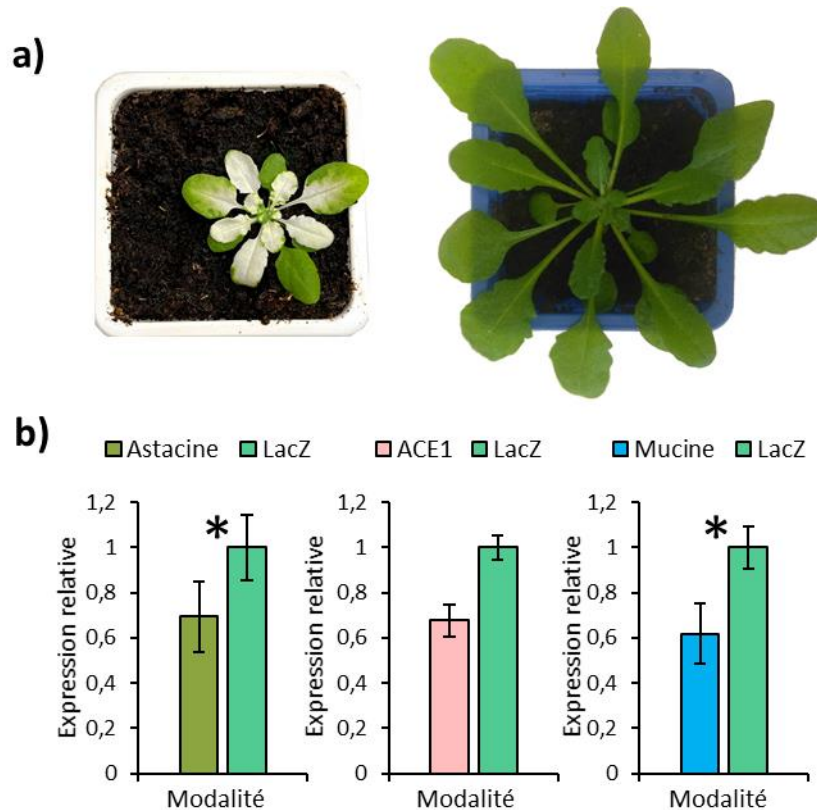


Figure 1 : Confirmation de l'efficacité du système VIGS (virus-induced gene silencing). (a) Arabidopsis infectée par la construction TRV-PDS (à gauche) et Arabidopsis infectée par la construction TRV-LacZ (à droite), 4 semaines post-inoculation. (b) Expression relative des candidats dans *Myzus persicae* après 7 jours d'alimentation sur des Arabidopsis infectées par les constructions du TRV-ACE1, -Astacine, ou -Mucine, en comparaison de contrôle TRV-LacZ. Les données représentées sont la moyenne de 3 lots de 25 pucerons \pm l'erreur standard des moyennes (SEM). Les astérisques montrent une différence significative (ANOVA univariée, $p < 0.05$).

Impact du silencing sur le taux de transmission et le comportement alimentaire

Après avoir confirmé l'efficacité du VIGS dans *M. persicae* (Figure 1), nous avons évalué si ces gènes avaient un effet sur la transmission du TuYV ou du CaMV (Figure 2ab). Le taux de transmission du TuYV est significativement réduit pour les pucerons silencés Mucine (17.5 %) en comparaison des pucerons silencés ACE1, Astacine et du contrôle TRV1 sans infection (ci-après dénommés pucerons ACE1, Astacine, Mucine ou TRV1) (Figure 2a) (GLMM, $Df = 4$, $\chi = 14.891$ $p = 0.005$). En revanche le taux de transmission des pucerons LacZ (22 %) est intermédiaire, mais n'est significativement différent d'aucun des groupes (Figure 2a). Concernant la transmission du CaMV, les taux de transmission sont homogènes entre les différentes modalités, et aucune différence significative n'a été mise en évidence (GLM, $Df = 4$, $\chi = 1.496$, $p = 0.8273$) (Figure 2b). Nous avons ensuite étudié le comportement alimentaire des pucerons silencés afin d'évaluer si la transmission réduite du TuYV par les pucerons Mucine pouvait être expliquée par une altération du comportement du vecteur (Figure 2cd). L'analyse sur les durées des différents comportements n'a pas montré de différence significative pour la durée totale de l'insertion des stylets dans la plante (GLM, $Df = 4$, $\chi = 8.521$; $p = 0.074$). En revanche, la durée des déplacements intercellulaires

des pucerons ACE1 est significativement réduite d'environ une heure en comparaison de toutes les autres modalités (GLM, Df = 4, $\chi = 18.383$; $p = 0.001$). A l'inverse, la durée d'ingestion de sève phloémienne est significativement augmentée de deux heures pour les pucerons ACE1 en comparaison des pucerons Astacine, LacZ et TRV1 (GLM, Df = 4, $\chi = 23.306$; $p < 0.001$). La durée d'ingestion de sève pour les pucerons Mucine est réduite d'environ une heure, mais cette réduction n'est pas significative. Enfin, la durée de déraillement des stylets est significativement augmentée pour les pucerons Mucine en comparaison des pucerons Astacine, avec des valeurs intermédiaires pour les autres modalités expérimentales (GLM, Df = 4, $\chi = 20.821$; $p < 0.001$) (Figure 2c).

L'analyse sur le pourcentage de temps passé dans chaque phase comportementale montre que la proportion de temps passée à réaliser des déplacements intercellulaires est significativement réduite pour les pucerons ACE1 (Kruskall, Df = 4, $\chi = 15.444$; $p = 0.004$). La proportion de temps d'ingestion de sève et celle de déraillement des stylets sont significativement augmentées respectivement pour les pucerons ACE1 et Mucine (Kruskall, Df = 4, $\chi = 20.807$; $p < 0.001$; Df = 4, $\chi = 12.868$; $p = 0.012$) (Figure 2c). Le TuYV est restreint aux tissus du phloème, l'acquisition des particules virales par son vecteur nécessite un contact prolongé avec la plante et une ingestion durable de sève dans les tubes criblés. Ainsi, la réduction de la transmission du TuYV induite par la répression de l'expression de la Mucine pourrait être causée par l'altération du comportement alimentaire de *M. persicae* et notamment la réduction du temps d'ingestion de sève. Étonnamment, l'amélioration importante de l'alimentation des pucerons ACE1 n'affecte pas la transmission du TuYV, malgré une durée totale d'ingestion de sève quasiment doublée. Le CaMV quand à lui peut être acquis ou inoculé en quelques secondes lors des premières pénétrations brèves des stylets du puceron dans la plante (Palacios et al., 2002). Ces comportements ayant lieu avant l'atteinte du phloème, le silencing de la Mucine n'impacte pas la transmission du CaMV. Au vu des comportements différents nécessaires à l'acquisition et l'inoculation du TuYV et du CaMV, il n'est donc pas surprenant d'observer un effet différent du silencing de la Mucine sur la transmission de ces deux virus.

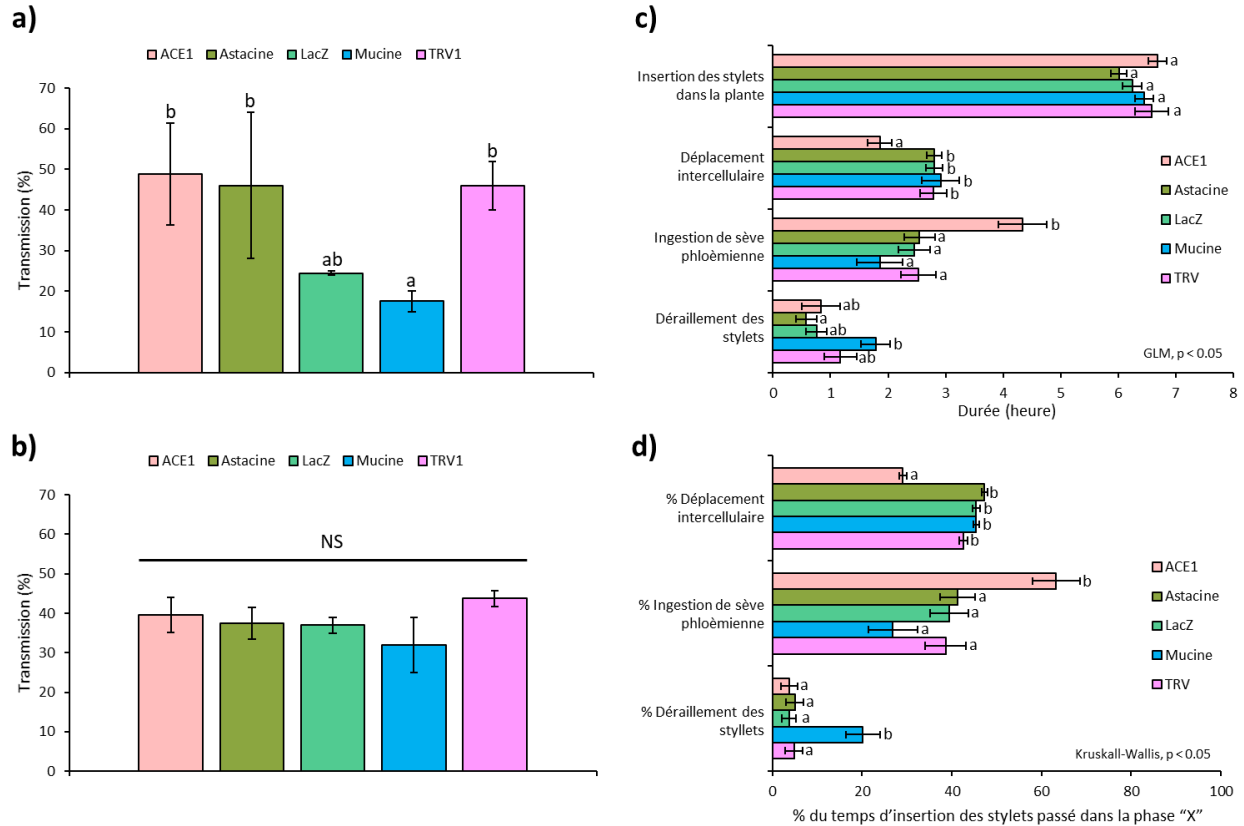


Figure 2 : Effet du silencing du candidat indiqué sur la transmission virale et le comportement alimentaire de *M. persicae* (a) Pourcentage de transmission du TuYV. L'acquisition est permise durant 8 h sur une *Arabidopsis* infectée puis les pucerons silencés pour le gène indiqué (TRV1, plantes non infectées) sont déplacés vers une plantule d'*Arabidopsis* (stade 2 vraies feuilles) afin d'inoculer le virus durant 16 h. Le taux d'infection est évalué 3 semaines post-inoculation par test sérologique ELISA. Les graphiques représentent les pourcentages de transmission moyens obtenus à partir de deux sessions de transmission (+/- SEM) (N = 45 – 50). (b) Pourcentage de transmission du CaMV. Les pucerons silencés précédemment affamés durant 2 heures sont déposés 15 minutes sur une *Arabidopsis* infectée puis sont déplacés vers une plantule de navet (stade 1 vraie feuille) afin d'inoculer le virus durant 24 h. Le taux d'infection est évalué 3 semaines post-inoculation par observation visuelle de la présence de symptômes caractéristiques de l'infection. Les graphiques représentent les pourcentages de transmission moyens obtenus à partir de deux sessions de transmission (+/- SEM) (N = 46 – 48). (c-d) Comportement alimentaire de *M. persicae* silencés sur *Arabidopsis* Col-0 saines. Sélection de paramètres de comportement alimentaire représentés selon la durée totale (c) ou pourcentage de temps moyen (d) de chaque comportement effectué durant les 8 h d'enregistrement. Les graphiques représentent les moyennes ainsi que l'erreur standard (N = 19-24). Des lettres différentes montrent une différence significative testée par (a) un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) adapté à une distribution binomiale des données, (b) un modèle linéaire généralisé (GLM) adapté à une distribution binomiale des données, (c) un modèle linéaire généralisé (GLM) adapté à une distribution gamme à cause de la distribution non normales des données, ou (d) un test de Kruskal-Wallis. Lorsque ces tests ont montré une différence significative, ils ont été suivis d'un test à comparaisons multiples utilisant le package « emmeans » (p < 0.05 méthode : Tukey).

Effet du silencing sur la biomasse et la fécondité

Le silencing de la Mucine impacte négativement le comportement alimentaire de *Myzus persicae* alors que celui de ACE1 favorise considérablement l'alimentation (Figure 2cd). De tels effets sur ces paramètres pourraient avoir des conséquences sur d'autres traits d'histoire de vie du puceron. Les pucerons Mucine ont une biomasse significativement réduite en comparaison des pucerons des autres modalités (GLM, Df = 4, $\chi = 24.286$, $p < 0.001$). Ce résultat témoigne d'une difficulté des pucerons Mucine à exploiter les ressources de la plante sur laquelle ils se nourrissent (Figure 3a). La forte proportion de déraillement des stylets des pucerons Mucine mise en évidence par l'analyse EPG peut expliquer cet effet. Néanmoins, l'amélioration de l'alimentation ne semble pas entraîner pas l'effet inverse étant donné que la masse corporelle des pucerons ACE1 est identique à celles des autres modalités. La mesure de la fécondité des pucerons silencés n'a révélé aucune différence significative (GLM, Df = 4, $\chi = 5.6477$, $p = 0.227$) (Figure 3b)

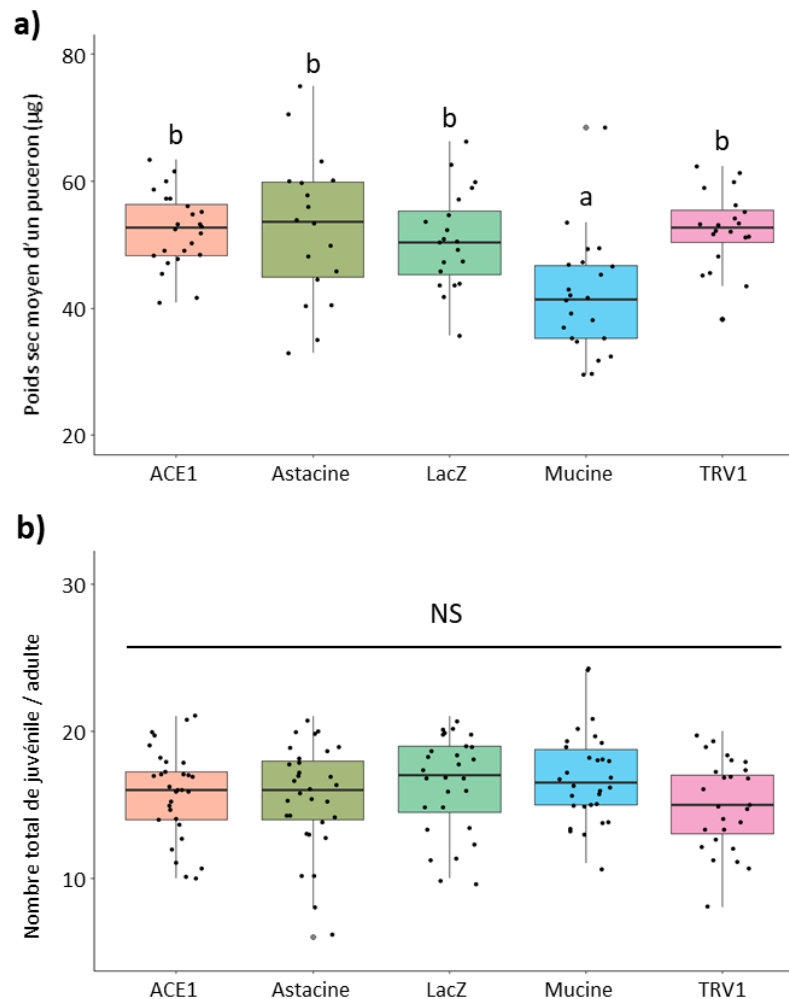


Figure 3 : Traits d'histoire de vie des pucerons silencés pour le gène indiqué. a) Poids sec des pucerons silencés. Les pucerons ont été pesés par lot de 10. Les boxplots représentent les médianes des poids moyens d'un puceron pour chacun des lots (N = 18 – 24). b) Fécondité totale de *Myzus persicae* silencés durant 5 jours passés sur des Arabidopsis infectées avec les constructions TRV-ACE1, -Astacine, -LacZ, -Mucine ou des Arabidopsis non-infectées (TRV1). Un

puceron silencé a été déposé sur une plante individuelle et à partir de la période reproductive, les néonates ont été comptés tous les jours durant 5 jours. La somme des 5 comptages est représentée pour chaque individu (N = 30 – 32). Les lettres indiquent les différences significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées à partir d'un modèle linéaire mixte (GLMM) pour les données de masse et d'un modèle linéaire généralisé (GLM) suivant une loi poisson adaptée aux données de comptage pour la fécondité. Lorsque le test a montré une différence significative, il a été suivi d'un test de comparaisons multiples à partir du package « emmeans » ($p < 0.05$ méthode : Tukey).

Localisation de la Mucine dans le puceron

Plusieurs travaux sur les fulgores ont montré que les mucines étaient nécessaires pour l'établissement de l'alimentation de l'insecte. Les Mucines sont secrétées par les glandes salivaires des fulgores dans les salives aqueuse et gélifiante. Ainsi, les Mucines peuvent réduire des voies de défense de la plante comme les dépôts de callose dans le parenchyme (Shangguan et al., 2018), mais sont également nécessaires pour la formation de la gaine salivaire (Huang et al., 2017; Huo et al., 2022; Shangguan et al., 2018). Cependant, chez les insectes, les Mucines sont également des constituants majeurs de la membrane péritrophique intestinale (Wang & Granado, 1997; Wu et al., 2019). Pour savoir où est exprimé la Mucine (g27683), nous avons effectué des RT-qPCR dans des têtes et des corps entiers de pucerons. Le gène Mucine g27683 est 6.49 fois plus transcrit dans la tête des pucerons en comparaison du reste du corps (Figure 4). Ce résultat suggère que cette Mucine pourrait s'accumuler dans les glandes salivaires qui sont localisés dans la tête des pucerons. La Mucine g27683 peut donc avoir à une fonction homologue à celle observée chez les fulgores, c'est-à-dire comme composant de la salive aqueuse ou gélifiante. Nous avons tenté d'évaluer sa potentielle implication dans la formation de la gaine salivaire en effectuant des observations de gaines salivaires en microscopie. Cependant, nous n'avons pas réussi à observer ces structures, que ce soit chez les pucerons Mucine, ou des pucerons témoins.

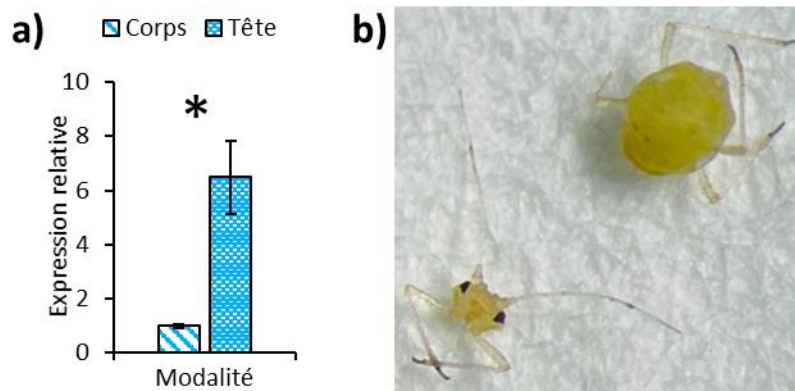


Figure 4 : Localisation de la Mucine dans le puceron. a) Expression relative du gène Mucine dans la tête ou le reste du corps chez *Myzus persicae* sauvages. Le graphique représente la moyenne de 5 lots de 30 pucerons \pm l'erreur standard des moyennes (SEM). L'astérisque témoigne d'une différence significative (ANOVA univariée, $F = 16.05$, $p = 0.004$). b) Photographie d'une dissection séparant la tête du corps de *M. persicae*. Photographie C. Villeroy et M. Verdier.

Conclusion

En résumé, l'expression d'ARNdb par l'utilisation de la technique VIGS dans *Arabidopsis* a permis de réduire artificiellement l'expression de trois gènes candidats chez *Myzus persicae*. Aucun effet n'a été observé pour le silencing du gène Astacine. En revanche, la réduction d'expression d'ACE1 améliore nettement l'alimentation de *M. persicae*. Cet effet avait précédemment été montré chez le puceron

Acyrtosiphon pisum lors du silencing simultané d'*ACE1* et *ACE2* (Wang et al., 2015). Il peut sembler étonnant que la réduction de l'expression d'un effecteur salivaire améliore l'alimentation des pucerons, cependant, l'étude de Wang (2015) montre également que le silencing de *ACE1* et *ACE2* s'accompagne d'une forte mortalité de *A. pisum*. Ce gène semble pléiotropique et nécessaire pour des fonctions vitales autres que l'ingestion de sève. Toutefois, l'augmentation de la mortalité lors du silencing seul d'*ACE1*, n'a pas été observée dans notre étude. Du point de vue de la manipulation, le TuYV et le CaMV améliorent tout deux l'alimentation de *Myzus persicae*, et l'expression de *ACE1* était augmentée en présence des deux virus. Il semble donc incohérent que ces virus influencent le gène *ACE1* pour améliorer leur transmission.

Nous avons montré que le silencing du gène codant pour une Mucine perturbait l'alimentation des pucerons. Les difficultés des pucerons Mucine pour s'alimenter sont probablement responsables de la réduction du taux de transmission du TuYV et de la masse réduite. L'analyse transcriptomique a montré que le gène de la Mucine était surexprimé chez les pucerons virulifères CaMV uniquement, or, le silencing de ce gène n'impacte pas la transmission de ce virus. Nos observations ne corroborent donc pas une manipulation de ce gène par le CaMV. Cependant, la Mucine semble impliquée dans les interactions plante-puceron, notamment dans le maintien d'un comportement alimentaire efficace. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour caractériser le fonctionnement de cette protéine chez les pucerons, qui semble nécessaire au déplacement des stylets dans la plante.

Matériel et méthodes

Culture des plantes

Les graines des plantes utilisées dans l'ensemble des expérimentations ont été semées dans des pots (70 mm x 70 mm x 65 mm) contenant du terreau TS 3 adapté aux plantes à cycles courts (Klasmann-Deilmann, Geeste, Allemagne). Les graines de navet (*Brassica rapa* L. variété « Just Right ») ont été généreusement fournies par la filiale Européenne de la société Japonaise Takii & Company située à Kwakel aux Pays-Bas. Les graines d'*Arabidopsis thaliana* (lignée « Col-0 » ; écotype « Columbia-0 ») ont été obtenues par multiplication de plantes originaires du Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NAS) de l'université de Nottingham en Angleterre. La germination de ces plantes a été réalisée en conditions contrôlées dans des chambres de culture à 20 ± 1 °C sous une photopériode 8/16 h (jour/nuit). Après 9 jours pour les navets, ou 14 jours pour les Arabidopsis (stade d'inoculation des plantules, le cas échéant), les plantes ont été déplacées dans des chambres de culture soumises à une photopériode plus étendue 14/10 h (jour/nuit).

Elevage des pucerons

Le clone de puceron de l'espèce *Myzus persicae* (Sulzer) (Hémiptère : *Aphididae*) est originaire d'une femelle parthénogénétique prélevée aux Pays-Bas. Les pucerons sont élevés sur chou chinois (*Brassica rapa* L. *pekinensis* variété « Granaat »). Les conditions de culture sont similaires à celles des expérimentations, à savoir une température de 20 ± 1 °C et une photopériode de 14/10 h (jour/nuit).

Production de pucerons Knock Down (KD) par RNA silencing

Afin d'utiliser la technique de VIGS pour induire le silencing des gènes candidats dans les pucerons, des fragments d'environ 300-500 pb de la séquence codante des gènes d'intérêts ont été insérés dans le vecteur pTRV2 (Tableau supplémentaire 2). Des Arabidopsis âgées de 2 semaines ont été agro-infiltrées de façon simultanée avec les plasmides pTRV1 et pTRV2 pour déclencher une infection au TRV et produire des ARN double brin (ARNdb). La modalité TRV1 correspond à l'agro-infiltration du plasmide pTRV1 seul, et donc à une plante non-infectée. Quatre semaines post-inoculation, des pucerons adultes ont été déposés 24 h sur les plantes afin de produire des juvéniles, puis retirés pour ne conserver que les néonates nés le même jour. Après 7 jours de développement sur les Arabidopsis produisant des ARNdb, les pucerons « silencés » ont été utilisés pour les différentes expérimentations.

RT-PCR quantitative

Chaque extraction d'ARN a été effectuée à partir de 30 pucerons (entier ou séparation corps / tête). Les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à partir de 1000 ng d'ARN total en utilisant des oligo dT et l'enzyme M-MLV (Promega, Madison, Etats Unis) afin de rétrotranscrire tous les ARN messagers. Les échantillons ont été soumis à quarante cycles composés de 10 sec à 95 ° C, 30 sec à 60 ° C et 30 sec à 72° C. Des plaques 96 puits ont été utilisées afin de réaliser des triplicats techniques et en effectuant 3 à 5 réplicats biologiques. Les réactions de qRT-PCR ont été réalisées avec du SYBR Green dans un thermocycleur CFX cyler Bio-Rad (Hercules, Etats Unis). Les expressions relatives des gènes d'intérêts ont été calculé avec la méthode $\Delta\Delta CT$ et normalisé par l'expression des gènes de références L27 et EF-1 α (Kang et al., 2017) (Tableau supplémentaire 1).

DAS-ELISA

Le test immuno-enzymatique DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) a été utilisé pour détecter la présence de particules virales du TuYV ou du TRV dans des broyats de plante obtenus à partir de 100 mg de matière fraîche. Ce diagnostic enzymatique a été utilisé avec des anticorps anti-TuYV (Loewe, Sauerlach, Allemagne) pour évaluer la proportion de plante infectées lors des tests de transmissions, ainsi qu'avec des anticorps anti-TRV (Loewe, Sauerlach, Allemagne) pour vérifier la présence de l'infection lors de la mise en place du protocole VIGS. Chaque anticorps a été utilisé à la dilution 1:400^{ème}.

Etude de la transmission virale

La transmission du CaMV a été réalisée à partir d'Arabidopsis infectées vers des navets sains. Les pucerons ont d'abord été affamés durant 2 h sur du papier filtre dans une boîte de pétri. Puis des cohortes de 5 pucerons adultes (8 ± 1 jours) ont été délicatement déposées à l'aide d'un pinceau sur chacune des Arabidopsis infectées. Après 15 minutes d'acquisition, chaque puceron a été individuellement déplacé vers un navet de 9 jours (stade 2 cotylédons + une vraie feuille). Après 24 h d'inoculation, les plantes ont été traitées à l'insecticide (Pirimor G, 1 g/L d'eau). Après 3 semaines, la proportion de plantes infectées a été évaluée visuellement par la présence ou non des symptômes caractéristiques. La transmission du TuYV a été évaluée d'Arabidopsis vers Arabidopsis. Également cinq pucerons ont été déposés sur chacune des plantes infectées, puis transférés individuellement sur des Arabidopsis saines âgées de deux semaines (stade 2 cotylédons, deux vraies feuilles). En revanche cette fois-ci les durées d'acquisition et d'inoculation ont été respectivement de 8 et 16 heures. La durée d'acquisition étant bien plus longue que celle utilisée

pour le CaMV, les pucerons n'ont pas été affamés. A la suite des 16 heures d'inoculation, les plantes ont été traitées au Pirimor. Après trois semaines, la présence de l'infection a été testée par DAS-ELISA.

Etude du comportement alimentaire

La technique de l'électro-pénétrographie (EPG) a été utilisée comme décrit dans (Tjallingii 1988). Cette technique consiste à intégrer le puceron dans un circuit électrique en collant sur la partie dorsale de l'abdomen une électrode constitué d'un mince fil d'or ($\varnothing = 12.5 \mu\text{m}$). Huit pucerons sont connectés simultanément au système Giga-8 DC-EPG amplifieur (EPG Systems, Wageningen, Pays-Bas) et déposés sur une feuille d'Arabidopsis saine âgée de 5 semaines. Les enregistrements ont été effectués en continu durant 8 heures au cours de la photopériode et à l'intérieur d'une cage de Faraday à $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Les enregistrements ont été acquis et analysés avec le logiciel PROBE 3.5 (EPG Systems) (Giordanengo, 2014; Sarria et al., 2009). Pour chaque modalité, entre 19 et 24 individus ont été analysés. Les pucerons ayant générés moins de 5 heures de signales ont été exclu de l'analyse.

Masse des pucerons

Le poids sec des pucerons a été mesuré à l'aide d'une microbalance (Sartorius MSE3.6P-000DM) pouvant distinguer des variations de masse de l'ordre du microgramme. Avant d'être pesé individuellement, les pucerons sont desséchés en les plaçant 48 h dans une étuve à $32 \text{ }^\circ\text{C}$.

Etude de la fécondité

La fécondité a été évalué en déposant un puceron adulte (8 ± 1 jours) sur une plante test, puis en comptant le nombre de juvéniles après 5 jours d'infestation. Les adultes n'ayant pas survécu ou n'ayant pas été retrouvés à la suite des 5 jours ont été retirés de l'analyse. Durant la totalité de l'étude les plantes infestées ont été placées en conditions contrôlées sous une photopériode 14/10 h (jour/nuit) à une température de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Statistiques

Les données de RT-qPCR ont été traitées avec une ANOVA univariée utilisant la fonction (aov). Nous avons utilisé un modèle linéaire généralisé (GLM) pour déterminer une différence statistiquement significative pour les données EPG sur les durées. Les paramètres de durée d'alimentation n'étant pas normalement distribués, nous avons utilisé un GLM suivant une distribution gamma (lien = "inverse"). Un test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour les données EPG sur les proportions de temps passées pour chaque comportement. Pour les mesures de masse et de transmission, nous avons utilisé la fonction "glmer" (paquetage R : "lme4") pour réaliser un modèle linéaire mixte généralisé (GLMM) afin de déterminer une différence statistiquement significative entre les modalités. Nous avons inclus le facteur "session" comme variable aléatoire (correspondant aux différentes répétitions), tous les autres facteurs étant considérés comme des effets fixes. Les GLM ou GLMM employés pour les mesures de fécondité et de transmission ont été utilisés respectivement avec une distribution Poisson ou Binomiale, pour prendre en compte la distribution des données discrètes ou codées sous la forme 0 - 1. Lorsqu'un effet significatif a été détecté, un test de comparaisons multiples (paquet R "emmeans" ; ajustement Tukey) au niveau de significativité de 0,05 a été utilisé pour tester les différences entre les traitements. Les conditions d'application de tous les GLM et GLMM ont été vérifiées en inspectant les résidus et les diagrammes QQ. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R v. 4.0.5 (www.r-project.org/).

Bibliographie

- Burch-Smith, T. M., Schiff, M., Liu, Y., & Dinesh-Kumar, S. P. (2006). Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *142*(1), 21–27. <https://doi.org/10.1104/pp.106.084624>
- Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Comparative Plant Transcriptome Profiling of Arabidopsis thaliana Col-0 and Camelina sativa var. Celine Infested with Myzus persicae Aphids Acquiring Circulative and Noncirculative Viruses Reveals Virus- and Plant-Specific Alterations Relevant to Aphid Fe. *Microbiology Spectrum*, *10*(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00136-22>
- Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Verdier, M., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Transcriptome responses of the aphid vector Myzus persicae are shaped by identities of the host plant and the virus. *Peer Community Journal*, *2*, e82. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.208>
- Chesnais, Q., Verdier, M., Burckbuchler, M., Brault, V., Pooggin, M., & Drucker, M. (2021). Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected Arabidopsis. *Molecular Plant Pathology*, *March*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>
- Giordanengo, P. (2014). EPG-Calculator: a PHP-based script to calculate electrical penetration graph (EPG) parameters. *Arthropod-Plant Interactions*, *8*(2), 163–169. <https://doi.org/10.1007/s11829-014-9298-z>
- He, M., Zuo, D., Zhang, Z., Wang, Y., & Han, C.-G. (2023). Transcriptomic and Proteomic Analyses of Myzus persicae Carrying Brassica Yellows Virus. *Biology*, *12*(7), 908. <https://doi.org/10.3390/biology12070908>
- Huang, H. J., Liu, C. W., Xu, H. J., Bao, Y. Y., & Zhang, C. X. (2017). Mucin-like protein, a saliva component involved in brown planthopper virulence and host adaptation. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.012>
- Huo, Y., Zhao, J., Meng, X., Yang, J., Zhang, Z., Liu, Z., Fang, R., & Zhang, L. (2022). Laodelphax striatellus saliva mucin enables the formation of stylet sheathes to facilitate its feeding and rice stripe virus transmission. *Pest Management Science*, *February*. <https://doi.org/10.1002/ps.6990>
- Kang, Z. W., Liu, F. H., Tian, H. G., Zhang, M., Guo, S. S., & Liu, T. X. (2017). Evaluation of the reference genes for expression analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction in the green peach aphid, Myzus persicae. *Insect Science*, *24*(2), 222–234. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12310>
- Liang, Y., Ma, K.-S., Liang, P.-Z., Yang, L.-W., Zhang, L., & Gao, X.-W. (2021). Combined Transcriptomic and Proteomic Analysis of Myzus persicae, the Green Peach Aphid, Infected with Cucumber Mosaic Virus. *Insects*, *12*(5), 372. <https://doi.org/10.3390/insects12050372>
- Mulot, M., Boissinot, S., Monsion, B., Rastegar, M., Clavijo, G., Halter, D., Bochet, N., Erdinger, M., & Brault, V. (2016). Comparative analysis of RNAi-based methods to down-regulate expression of two

- genes expressed at different levels in *Myzus persicae*. *Viruses*, *8*(11).
<https://doi.org/10.3390/v8110316>
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., & Fereres, A. (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, *83*(12), 3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163>
- Patton, M. K. F., Hansen, A. K., & Casteel, C. L. (2021). Potato leafroll virus reduces *Buchnera aphidicola* titer and alters vector transcriptome responses. *Scientific Reports*, *11*(1), 23931. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02673-6>
- Qin, G., Gu, H., Ma, L., Peng, Y., Deng, X. W., Chen, Z., & Qu, L. J. (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, *17*(5), 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
- Sarria, E., Cid, M., Garzo, E., & Fereres, A. (2009). Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. *Computers and Electronics in Agriculture*, *67*(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2009.02.006>
- Shangguan, X., Zhang, J., Liu, B., Zhao, Y., Wang, H., Wang, Z., Guo, J., Rao, W., Jing, S., Guan, W., Ma, Y., Wu, Y., Hu, L., Chen, R., Du, B., Zhu, L., Yu, D., & He, G. (2018). A mucin-like protein of planthopper is required for feeding and induces immunity response in plants. *Plant Physiology*, *176*(1), 552–565. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00755>
- Sterchi, E. E., Stöcker, W., & Bond, J. S. (2009). Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, *29*(5), 309–328. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.002>
- Tjallingii, F., & Hogen-Esch, T. (1993). Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology*, *18*(3), 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Verdier, M., Chesnais, Q., Piroilles, E., Blanc, S., & Drucker, M. (2023). The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission. *PLOS Pathogens*, *19*(2), e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>
- Wang, P., & Granado, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(13), 6977–6982. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6977>
- Wang, W., Luo, L., Lu, H., Chen, S., Kang, L., & Cui, F. (2015). Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. *Scientific Reports*, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep08885>
- Wu, P., Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Shi, M., Xiao, C., Liu, H., Liu, Q., Zhao, T., Chen, X., Zhou, H., Wang, P., & Cheng, G. (2019). A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host & Microbe*, *25*(1), 101–112.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.11.004>

Zanardo, L. G., de Souza, G. B., & Alves, M. S. (2019). Transcriptomics of plant–virus interactions: a review. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 31(1), 103–125.

Données supplémentaires :

Tableau supplémentaire 1 : Liste des primers utilisés. Les sites de restrictions XbaI (5') et BamHI (3') sont nécessaires au clonage dans le vecteur pTRV et soulignés dans le tableau.

Usage	Organisme	Gène	Sens (5'→3')	Anti-sens (5'→3')
qPCR	<i>Myzus persicae</i>	ACE1	TTTGTACGGCAGAGCAACCA	CCCGTAGCCTCTCCATTG
qPCR	<i>Myzus persicae</i>	Astacine	ACCGAAGATGGAAGGTAACGA	ATTTGGCGGTGCCCTAGA
qPCR	<i>Myzus persicae</i>	EIF1-α	AGATTGGACAAACCCGTGAA	GCTGTATGGTGGTTCACTAGAG
qPCR	<i>Myzus persicae</i>	L27	CCGAAAAGCTGTCATAATGAAGAC	GGTGAACCTTGTCTACTGTTACATCTTG
qPCR	<i>Myzus persicae</i>	Mucine	CCACCACCTAACAGTGCTCC	TTGTAACCACTCTGTGGGCG
VIGS	<i>Myzus persicae</i>	ACE1	TTT <u>CTAGAAC</u> ATTTGCTCGGTGATATGTGG	TTTGGATCCCTTCGTTAGCTCCTTCGCGG
VIGS	<i>Myzus persicae</i>	Astacine	TTT <u>CTAGACA</u> AGGAGACATGGCGATGAATA	TTTGGATCCGTAATAATTCTGTAATAGGTCTG
VIGS	<i>Myzus persicae</i>	Mucine	TTT <u>CTAGAGCA</u> ATCATCATCAGAAAGTCC	TTTGGATCCGTTGAAGAAGCACCTAGAGAT

Tableau supplémentaire 2 : Séquences des fragments de gène insérés dans le vecteur pTRV2.

Gène	Taille	Séquence du fragment (5'→3')
ACE1	404 pb	ACATTTGCTCGGTGATATGTGGGCGCAGTCGTGGGAACGTTTGGATGAATTTACTCGACCCTATCCAACCATCGACGACGTAA ACCCACATCCGCCATGATCAATCAGAACTACACTCCGAAAAAATGTTTAAAGTGGCAGAAGAATTTTACATCGTTAAACC TGAGCGCAATGCCCAAACCTTTCTGGGAAAAATCTATTTGGAGAAGCCAAATGGTCGCGATCTGGTATGCCATGCATCAGCA TGGGACTTTTACGATTCTAATGACTTTAGAATCAACAATGCACATCGGTAAATTTTATGGATTTTATACTGCCACCACGAGA TGGGACACATCCAATATTTCTACAATAACAAGACCAGCCATTATATACCGCGAAGGAGCTAACGAAG
Astacine	370 pb	CAAGGAGACATGGCGATGAATAACGAGATTTTATTGATTGGCGAGTAGGCTCGATGGGATATTTCCCGGAGAACTCTG GCTCAACCGTACCGTCCATATTTGATCAGTCCGCTTACGAAACCGAACCCGGATTCTAATATACCAAGCAATCAGGACGAT CAACTTTCTGACTTGCATCAAATTCGTGCCATGGACCGAAAAGAAAAGGATTATTTGCTGATATGGCCAGTGAATATCCTTC TGGGTGTTGGTCTGACGTGGGCGGTTACGGGGACCGCAAGTTGTGTCTCTGCAGCCACCGACGAAACAGGAGCTAATTGC TTAGGTACCGACGGACGACCTATTACGAATTATTAC
Mucine	483 pb	GCAATCATCATCAGAAAGTCTGCAAAATGAAGTAGAAAATGAATTACCTGATCAACCAGAAGAACTAGTTCTAGTGGACCAA ATTGTGAGTCAGAAGGATCCATCCATACAGTGAAGGTTGTAGTAAAAAATCATAAAGGTGCGTAGACAAAGGTGATGGGACT TTTACCAAGTATGAATTTGACTGTGGTGAAGGAACTTTATGGGACGATAGTCAACAACATGTAACCATGCTAACCTAGTAAAT TGTGGAACCACAACGGCAGCTACACCTTCCACAATAAATCAGATTCTACCGTAGCGCAGCAAATAACTACAGCCAACATATG GTCTACTTCAAGTAACTAATTCATCTATGATGTCAAGCTCAAGTTCAAGTTCTAGTAGTTCTTCAAGTAGCCAGTTTTCAACT TCAGCTGCTACTGCCGTCAAACAATGGAGGATTTAACCAACAATCTCTAGGTGCTTCTTCAAC

Discussion générale

Le CaMV, un virus aux multiples stratégies de manipulation

Identifications des protéines virales impliquées dans la manipulation par le CaMV

Un des objectifs principaux de la thèse était d'identifier les facteurs protéiques viraux du TuYV et du CaMV impliqués dans des modifications comportementales ou des différents traits d'histoire de vie du vecteur *M. persicae*.

Concernant le CaMV, ces travaux ont été valorisés sous la forme de deux articles (cf. Chapitre 1, Chesnais et al., 2021; Verdier et al., 2023). Nous avons montré que le CaMV modifiait le comportement alimentaire de son vecteur *M. persicae* dans un sens pouvant favoriser la transmission. Les deux altérations principales observées sont une augmentation de l'ingestion de sève des pucerons s'alimentant sur des plantes infectées, et une augmentation du nombre de pénétrations dans la plante et de pénétrations intracellulaires des stylets lors des premiers contacts du puceron avec une plante infectée. Nous avons respectivement associé ces effets aux protéines P6 et P2 du CaMV (Chapitre 1).

Cependant, nous avons également observé une réduction de la fécondité des pucerons s'alimentant sur des *Arabidopsis* infectées (Chesnais et al., 2021). Les mesures de fécondité effectuées sur les différents mutants de la P6 ont permis d'exclure l'implication de cette protéine dans ce phénomène, et ce malgré les variations de durées d'ingestion de sève induite par cette dernière. Il est également peu probable que l'effet de la P2 sur le comportement, limité aux tissus superficiels, puisse expliquer la fécondité diminuée. Il est donc envisageable que d'autres facteurs du CaMV soient en cause. Pour un autre virus, la protéine NIa-Pro du TuMV a été identifiée comme responsable de l'amélioration des performances de *M. persicae* en réduisant les dépôts de callose et en favorisant la production d'éthylène (Bak et al., 2017; Casteel et al., 2014a, 2015b). Notre analyse transcriptomique des plantes infectées (*Arabidopsis* et *Cameline*) a montré des fortes dérégulations de la voie de biosynthèse de l'éthylène lorsque les plantes sont infectées par le CaMV (chapitre 4, Chesnais et al., 2022). On peut supposer qu'une protéine du CaMV modifie la production de cette hormone et pourrait être responsable de la réduction de fécondité du CaMV. L'éthylène étant une phytohormone volatile elle n'a pas pu être détectée lors de l'analyse métabolomique effectuée en LC-MS (chapitre 3). Il serait nécessaire d'effectuer des analyses GC-MS pour doser la production de cette molécule, ou du moins des RT-qPCR pour confirmer les dérégulations de sa voie de biosynthèse (e.g., gènes ACC synthase et ACC oxydase). Le CMV réduit également les performances de *M. persicae*, cependant le mécanisme responsable de cet effet nécessite le dialogue de 3 protéines virales (1a, 2a et 2b) (Westwood et al., 2013). Il est donc également envisageable que la réduction de la fécondité de *M. persicae* observée sur les plantes infectées par le CaMV résulte de l'expression constitutive de plusieurs protéines virales. Effectuer le croisement d'*Arabidopsis* transgéniques exprimant des protéines virales permettrait d'étudier ces effets. Cette approche nécessite cependant des lignées de plantes transgéniques exprimant chaque protéine virale, processus long et parfois complexe. Pour pallier cette contrainte, il serait envisageable d'exprimer la seconde protéine virale de façon transitoire par agro-infiltration dans une plante transgénique déjà obtenue (par exemple les plantes P6).

Les effets manipulateurs des virus semi-persistants

L'influence des virus sur le comportement de vexion des pucerons est fortement modulé par la persistance des virus dans le vecteur mais également pas leur tropisme tissulaire dans la plante hôte (Mauck et al., 2018). Les effets manipulateurs sont effectivement similaires pour des virus partageant un mode de transmission proche, et ce malgré des distances phylogénétiques éloignées (Mauck et al., 2012). Les virus persistants et limités aux tissus du phloèmes favorisent généralement un contact prolongé entre le vecteur et la plante infectée permettant l'acquisition du virus restreint dans ces tissus profonds, ainsi qu'une amélioration générale des performances du vecteur (dos Santos et al., 2016; Patton et al., 2020; Su et al., 2015). A l'inverse, les virus non-persistants et non-limités aux tissus du phloème ont tendance à encourager la dispersion des vecteurs ayant acquis rapidement le virus dans les tissus superficiels de la plante (Carmo-Sousa et al., 2014; Mauck et al., 2010).

Très peu d'études ont été réalisées sur la manipulation virale concernant les virus semi-persistants (Mauck et al., 2018). Il est donc difficile de faire des prédictions sur les manipulations attendues ou favorables pour ces virus. D'autant plus qu'ils sont caractérisés par un temps de rétention intermédiaire entre les virus persistants et non-persistants, mais également parce qu'ils comportent des virus restreints ou non, aux tissus du phloème.

Nous n'avons pas évalué les préférences de choix de *M. persicae* entre des plantes saines et infectées par le CaMV. Cependant des travaux de revue montrent que la très grande majorité des virus de plantes induisent des préférences pour les plantes infectées ou une absence de préférences (Mauck et al., 2012, 2018). Il est donc probable que les pucerons préfèrent les plantes infectées par le CaMV, ou du moins, ne les évitent pas. Une seule piqûre intracellulaire peut suffire à transmettre le CaMV (Palacios et al., 2002), et nous avons montré que le CaMV augmentait la fréquence de ces événements lors des premiers contacts du puceron avec la plante (Chapitre 1, Verdier et al., 2023). De telles modifications du comportement sont probablement favorables à l'acquisition mais également à l'inoculation virale. Cependant, le CaMV peut également être acquis après une phase d'ingestion de sève dans le phloème, et ce, plus efficacement que lors de pénétrations cellulaires seules (Palacios et al., 2002). Nos résultats ont montré que la durée d'ingestion de sève de pucerons s'alimentant sur des plantes infectées était augmentée (Chapitre 1, Chesnais et al., 2021). Du point de vue des effets sur l'alimentation de son vecteur, le CaMV adopte donc une stratégie bimodale. D'une part, le CaMV présente des traits similaires à ceux observés chez les virus non-persistants, comme le CMV qui augmente le nombre de pénétrations intracellulaires uniquement lors des premières 15 minutes de contact avec la plante (Carmo-Sousa et al., 2014) favorisant ainsi une acquisition rapide, typique de ces virus. D'autre part, lors de contacts prolongés avec la plante infectée, le CaMV favorise l'ingestion de sève comme cela a été montré pour les virus persistants et restreints au phloème tel que le PLRV, par exemple (Alvarez et al., 2007). En revanche, l'établissement durable (3 jours) des pucerons sur les plantes infectées comme cela a été étudié dans le chapitre 3, montre de nombreux effets délétères sur la physiologie de *M. persicae* (ressources énergétiques, masse, survie, fécondité). En condition de choix, une proportion non négligeable des pucerons serait certainement encouragée à quitter ces plantes avant l'apparition de l'ensemble des effets négatifs, que ce soit après quelques minutes (~quelques piqûres intracellulaires) ou quelques heures (~ingestion de sève phloémienne). Le CaMV semble donc influencer son vecteur afin que celui-ci effectue les comportements les plus adaptés pour sa

transmission (attraction des vecteurs, comportement alimentaire propice à l'acquisition, dispersion, motilité et recherche d'hôte favorisées) (Figure 13). Le groupe des semi-persistants est un groupe composé de virus aux biologies hétérogènes. En effet, le beet yellows virus (BYV, famille : *Closteroviridae*, genre : *Closterovirus*) par exemple, est un virus semi-persistant transmis par puceron, limité aux tissus du phloème et acquis lors de phases comportementales très singulières dans ces tissus (Jiménez et al., 2020, 2021). Etant donné son tropisme tissulaire dans la plante, on peut émettre l'hypothèse que le BYV favorise l'accès aux tissus du phloème et l'ingestion de sève, comme c'est le cas du cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV, famille : *Closteroviridae*, genre : *Crinivirus*), un autre virus membre des *Closteroviridae*, également limité aux tissus du phloème mais transmis par aleurode. Pour ce dernier, il a été montré que les aleurodes vectrices s'alimentant sur les melons infectés passaient plus de temps à ingérer de la sève phloémienne que sur des melons sains (Chesnaïs et al., 2021). Il semble donc que les traits manipulateurs du CaMV soient adaptés à sa biologie particulière, et soient difficilement extrapolables à d'autres virus semi-persistants.

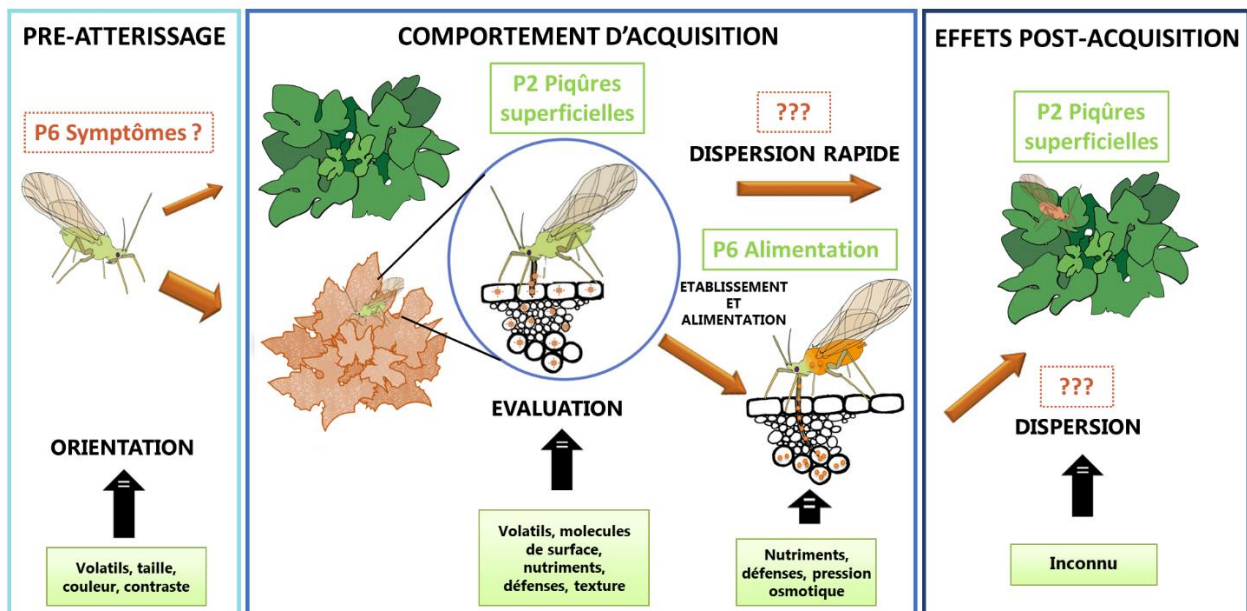


Figure 13 : Séquence comportementale potentielle d'un puceron en réponse à des aspects du phénotype d'une plante hôte infectée par le CaMV. Les encadrés oranges correspondent aux effecteurs viraux suspectés d'influencer le comportement du puceron vecteur alors que les encadrés verts correspondent aux protéines identifiées comme modifiant (de façon direct ou indirecte) le comportement de *M. persicae*. La protéine P6 est responsable de l'apparition des symptômes et pourrait favoriser le choix des pucerons vecteurs vers les plantes infectées. Il a été montré dans la thèse que la P2 était responsable des modifications de comportement alimentaire observées dans les tissus superficiels de la plante (épiderme / mésophylle) alors que la P6 favorise l'ingestion de sève à partir du phloème. Concernant les effets post-acquisitions, la P2 semble favoriser l'inoculation virale en augmentant le nombre de piqûres et de pénétrations intra-cellulaires des pucerons virulifères, mais aucun facteur viral n'a été identifié comme responsable des effets sur la motilité et la dispersion accrue des pucerons virulifères. Figure adaptée à partir de (Mauck et al., 2016).

Les facteurs viraux candidats à la manipulation par le TuYV

Identifications des protéines virales impliquées dans la manipulation par le TuYV

Les travaux réalisés dans le chapitre 2 de la thèse ont montré que le TuYV facilitait l'accès aux tissus du phloème et augmentait l'ingestion de sève des pucerons s'alimentant sur des plantes infectées, mais également que l'expression constitutive de la protéine de capsid (CP) dans des plantes transgéniques permettait de reproduire des effets similaires à ceux d'une infection authentique. La CP semble donc être le facteur viral responsable de ces modifications du comportement alimentaire. Cependant, une tendance à la facilitation de l'alimentation a également été observée lors de l'utilisation de plantes transgéniques exprimant le suppresseur de silencing (P0), ce qui suggère que cette protéine pourrait également influencer ce comportement dans une moindre mesure.

Dans la littérature, d'autres effets manipulateurs ont été attribués au TuYV. Claudel et al. (2018) ont par exemple montré que le TuYV modifiait les composés organiques volatiles (COVs) émis par des Arabidopsis ou des Camelines infectées. Cette perturbation des odeurs émises par la plante favorise l'attraction de *M. persicae* dans le cas des Camelines infectées, mais est sans effet sur le choix des pucerons lors de l'utilisation d'Arabidopsis. Les auteurs suggèrent que l'attraction est causée par l'augmentation du volume de COVs libérés par les plantes infectées, et non la variation de la composition des molécules émises. Dans ce travail, aucun facteur viral n'a cependant été identifié comme induisant ce phénomène. Une étude sur un virus phylogénétiquement proche du TuYV, le PLRV, a révélé des effets des protéines P0, P1 et P7 sur le comportement de colonisations des plantes par les pucerons via la modulation de la production d'acide jasmonique et d'éthylène (Patton et al., 2020). L'éthylène étant une molécule volatile, il est plausible que la modulation de sa production soit impliquée dans l'altération du choix de *M. persicae* dans le cas du TuYV. La protéine P7 n'est pas codée par le génome du TuYV, mais le rôle de la P0 et de la P1 dans l'attraction des pucerons par les plantes infectées reste à investiguer (Figure 15). Concernant la protéine P0, l'identification des métabolites différenciellement accumulés dans les plantes transgéniques P0 (chapitre 3) pourrait apporter des informations complémentaires et suggérer des mécanismes potentiels.

Concernant les effets post-acquisitions induit par le TuYV (chapitre 3) ou ceux décrit précédemment dans Chesnais et al. (2020), les facteurs viraux responsables restent également inconnus. La protéine P4 du PLRV altère le métabolisme de l'amidon et influence l'allocation des sucres libres des tissus puits vers les tissus sources (Herbers et al., 1997; Hofius et al., 2001). Le fructose produit lors de l'hydrolyse du saccharose étant la ressource alimentaire principale des pucerons (Ashford et al., 2000; Rhodes et al., 1997), la protéine P4 est un très bon candidat qui pourrait agir sur l'accumulation des ressources énergétiques dans le puceron lors de l'alimentation sur les plantes infectées, et par la suite, le comportement post-acquisition. De plus, le TuYV étant internalisé dans son vecteur, certains effets post-acquisitions pourraient découler d'interactions directes entre les particules virales et le puceron comme précédemment démontré pour un autre solemoviridae, le BYDV (Ingwell et al., 2012). En effet, certains virus circulants (et majoritairement propagatifs) interagissent avec les systèmes nerveux et/ou les glandes salivaires de leur vecteur et pourraient influencer son comportement (Hogenhout et al., 2003; Jia et al., 2018; Montero-Astúa et al., 2016). Une étude récente dans notre équipe ne semble cependant pas tendre vers ces conclusions concernant le TuYV (Marmonier et al., 2022).

Mes travaux de thèse, ainsi que ceux effectués par l'équipe d'accueil, mettent en avant l'importance d'étudier le rôle de l'espèce de la plante hôte dans la manipulation. En effet, il a été observé que le TuYV augmentait la fécondité de *M. persicae*, améliorerait sa motilité et favorisait son attraction chez la Cameline ou la Claytonia (Chesnais et al., 2020; Claudel et al., 2018), mais ces effets n'ont pas été retrouvés chez *Arabidopsis* (Chapitre 2 & 3, Claudel et al., 2018). Cette constatation pourrait être un exemple d'effet pléiotropique antagoniste décrit en introduction. Les effets manipulateurs sont induits par le TuYV dans certains hôtes comme la Cameline et la Claytonia, mais ces caractéristiques ne s'expriment pas chez tous ces hôtes. Ces effets pourraient être étudiés en employant plusieurs hôtes du TuYV qui possède une gamme d'hôte étendue comprenant au moins 23 familles végétales (Beuve et al., 2008). Les intérêts agroéconomique émergent au sujet de la Cameline (biocarburant et alimentation) ont permis des avancées dans la caractérisation de son génome et le développement d'outils moléculaires et génétiques adaptés à sa manipulation (Berti et al., 2016; Browne et al., 1991; Mach, 2019). Elle pourrait donc être préférée à *Arabidopsis* pour l'étude des phénomènes manipulateurs viraux. Son hexaploïdie est toutefois un frein pour la génération de plantes transgéniques (Mach, 2019), et cette limitation ne peut être contournée par l'utilisation de la Claytonia qui possède également un génome polyploïde (McIntyre, 2012). Il a été précédemment montré que les effets manipulateurs d'un virus étaient dépendants de l'adaptation de la souche à son hôte (Mauck et al., 2014). Nous avons utilisé dans cette étude le TuYV FL1 isolé à partir de laitue (Veidt et al., 1988), mais différentes souches de TuYV pourraient être comparées comme des isolats provenant du Colza (Asare-Bediako et al., 2020), ou de plantes « réservoirs » comme le sont les hôtes herbacés (Slavíková et al., 2022). Ces approches permettraient de confirmer les effets manipulateurs du TuYV observés sur certains hôtes, et probablement d'en découvrir également des nouveaux, spécifiques à certaines relations hôtes - souches virales.

Vers d'autres facteurs viraux impliqués dans la manipulation

Une partie importante des travaux de cette thèse a été consacrée à l'identification de facteurs protéiques viraux impliqués dans la manipulation du vecteur *M. persicae*. La manipulation virale peut cependant agir via d'autres déterminants. En effet, un article récent a décrit que le satellite à ARN du CMV (Y-sat) altérait la physiologie de son vecteur et augmentait la proportion d'individus ailés dans la population par la production de petit ARN interférants (siARN) (Jayasinghe et al., 2021). Une littérature croissante suggère des effets des mécanismes du silencing de la plante et de leurs produits, des petits ARN interférant induit par les virus (visi-ARN), sur les effets manipulateurs des virus (Haasnoot et al., 2007; Jayasinghe et al., 2021; Swevers et al., 2013; Yu et al., 2016). Ces mécanismes sont susceptibles de jouer un rôle "indirect" de manipulation par leurs implications majeures dans la défense de la plante hôte contre le virus et, par conséquent, sur le phénotype de l'hôte et les réponses comportementales du puceron. Les visi-ARN pourraient également être "directement" responsables de l'altération des réponses comportementales/physiologiques des pucerons. En effet, ces visi-ARN sont produits dans la plante et peuvent potentiellement être mobiles dans le phloème (Ham & Lucas, 2017). Ceux-ci pourraient donc être acquis par les pucerons s'alimentant la plante infectée et modifier l'expression des gènes comme cela a été montré pour d'autres siRNA produits par les plantes (Yu et al., 2016).

Des travaux en cours dans le laboratoire vont en ce sens. Nous avons observé qu'une quantité non négligeable de visi-ARN était internalisés par les pucerons s'alimentant sur des plantes infectées par le

TuYV (Figure 14a). Des expérimentations comportementales effectuées sur des Arabidopsis mutantes pour différentes enzymes impliquées dans la production des visi-ARN et infectées par le TuYV, indiquent une perturbation de l'alimentation de *M. persicae* (données non publiées). Ces effets pourraient être induits par certaines tailles de visi-ARN, comme l'indique nos expérimentations sur des mutants pour les enzymes dicer-like (DCL) responsables de la production de siARN de tailles spécifiques (Figure 14b, données non publiées). Ces résultats suggèrent que la compréhension des mécanismes des phénomènes manipulateurs des phytovirus nécessitera également l'étude du transcriptome des siARN (Figure 15). L'obtention du catalogue des visiARN produit dans des Arabidopsis infectées (visiARN-ome) permettrait de rechercher la liste des visiARN possédant une séquence s'hybridant à celle du génome de *M. persicae*. Ainsi ces visiARN pourraient être synthétisés et ajouter à un milieu artificiel MP148 afin d'évaluer leur implication dans la manipulation.

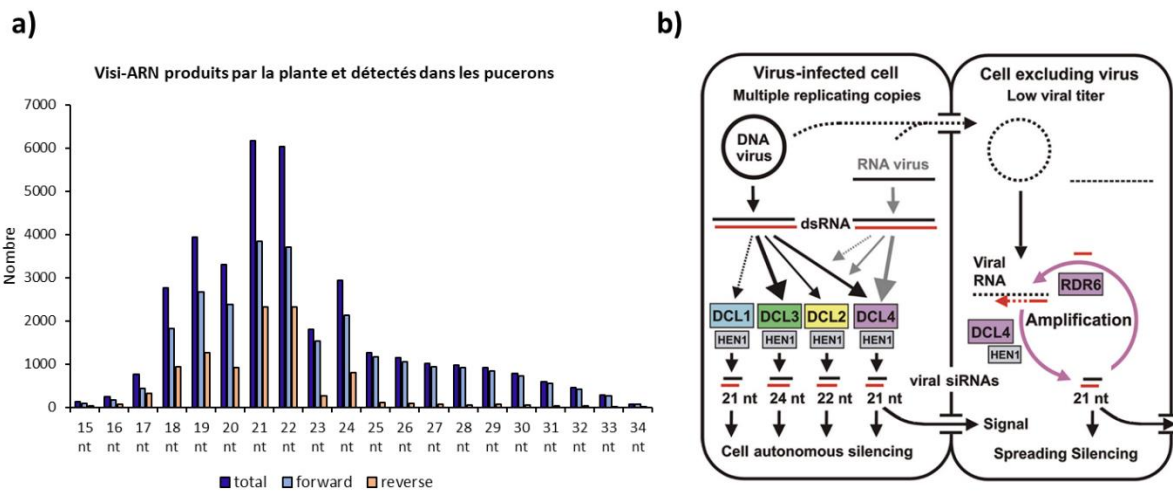


Figure 14 : Les visi-ARN, une stratégie utilisée par les virus pour manipuler les vecteurs ? (a) Profil des visi-ARN produit par Arabidopsis lors de l'infection du TuYV, et internalisés dans *M. persicae*. (b) Modèle du mécanisme de gène-silencing induit par les virus à ADN (en noir) ou à ARN (en gris). Deux cellules végétales adjacentes sont représentées schématiquement. La cellule initialement infectée (à gauche) contient des titres élevés de virus à ADN ou à ARN. Les flèches reliant l'ARNdb aux enzymes DCL représentent la contribution relative de chaque DCL à la biogenèse des siARN viraux. Pour les virus à ADN, chaque DCL clive l'ARNdb en classes de taille distinctes de siRNA, les DCL3, DCL4 et DCL2 étant privilégiées (dans cet ordre). Pour les virus à ARN, DCL4 est le plus important. Le produit DCL4 de 21 nt est potentiellement le signal nécessaire à la propagation du silencing. Les acides nucléiques infectieux et les siRNA viraux pénètrent dans la cellule de droite. Cependant, le titre viral reste faible, car DCL4 et RDR6 amplifient le signal siRNA entrant et clivent les ARN viraux. D'après des travaux en cours dans le laboratoire d'accueil (partie a) et un schéma de (Blevins et al., 2006, partie b).

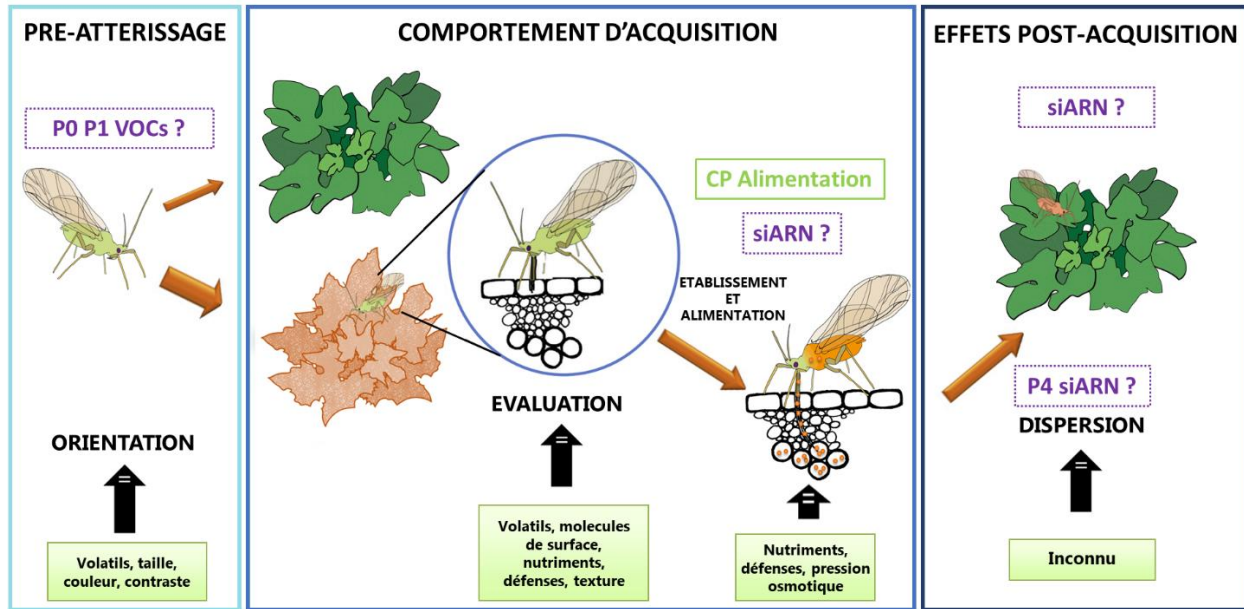


Figure 15 : Séquence comportementale potentielles d'un puceron en réponse à des aspects du phénotype d'une plante hôte infectées par le TuYV. Les encadrés violets correspondent aux effecteurs viraux suspectés d'influencer le comportement du puceron vecteur alors que l'encadré vert correspond aux protéines identifiées comme modifiant le comportement de *M. persicae*. La protéine CP a été identifiée comme responsable des modifications du comportement alimentaire de *M. persicae*, cependant des travaux complémentaires sont nécessaires pour distinguer l'implication de la P0 sur ce comportement. Les protéines P0 et P1 pourraient influencer l'orientation des vecteurs vers les plantes infectées en augmentant la quantité de COV émis (Patton et al., 2020). Des travaux non-publiés du laboratoire d'accueil suggèrent des effets des siARN sur le comportement alimentaire. Ils pourraient avoir lieu lors de l'acquisition et de l'inoculation. Enfin, une étude sur la protéine P4 d'un virus apparenté agit sur l'allocation des sucres dans la plante et pourrait ainsi moduler la qualité nutritive des plantes infectées, impactant le comportement post-acquisition des pucerons. Figure adaptée à partir de (Mauck et al., 2016).

Physiologie des pucerons virulifères

Vers le métabolome de pucerons virulifère ?

Dans le chapitre 3, nous avons montré que le TuYV et le CaMV induisaient des effets post-acquisitions sur leur vecteur commun *M. persicae*. Ces effets sont observés sur le comportement mais également la physiologie de *M. persicae*, avec des conséquences plus fortes pour le CaMV. Nous avons émis l'hypothèse que la qualité médiocre des plantes infectées par le CaMV induisait la recherche active d'un nouvel hôte, comme nous l'avons observé pour les pucerons virulifères CaMV. En effet, de nombreuses études montrent que les virus de plante peuvent influencer le comportement de leur vecteur à travers une altération du phénotype de la plante hôte (Mauck et al., 2014). Dans une moindre mesure, une altération indirecte de la physiologie (survie, fécondité...) du vecteur est également attribuée aux effets médiés par la plante (Bosque-Pérez & Eigenbrode, 2011; Dáder et al., 2017). Nous avons par exemple montré que la quantité en lipide des pucerons virulifères CaMV était réduite en comparaison des pucerons non-virulifères (chapitre 3). Au vu des effets négatifs sur la masse et la survie des pucerons, il est vraisemblable que d'autres voies métaboliques soient modifiées. L'analyse récente du métabolome de la mouche *Drosophila suzukii*, permet de discriminer des populations d'individus selon leurs régimes alimentaires constitués de différents fruits (Olazcuaga et al., 2023). Ainsi, il est probable que l'alimentation des pucerons sur des plantes saines, infectées par le TuYV ou le CaMV, module également le métabolome de l'insecte. Ces effets sur la physiologie du puceron pourraient expliquer les effets post-acquisitions observés dans notre étude.

Nous avons établi le métabolome du puceron *M. persicae* dans les mêmes conditions que celles utilisées dans l'article 4 (Chapitre 3). Après trois jours d'alimentation sur des Arabidopsis saines, infectées par le TuYV ou le CaMV, les pucerons ont été collectés et utilisés pour l'analyse métabolomique (Figure 16). Des résultats préliminaires issus de ce jeu de données montrent qu'il est possible de distinguer les trois modalités de pucerons selon leur métabolome. En effet, l'analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur l'ensemble des métabolites détectés montre que les pucerons virulifères CaMV, TuYV, ou non-virulifères possèdent un métabolome distinct entre les modalités (Figure 16a). On peut remarquer que les pucerons virulifères CaMV et TuYV sont nettement opposés du point de vue de leur métabolome, et sont situés de part et d'autre des pucerons non-virulifères (« Mock »). L'identification de ces composés pourrait permettre de caractériser le type de perturbation(s) physiologique(s) subit par les pucerons s'alimentant sur des plantes infectées. La caractérisation des effets viraux sur la physiologie des pucerons virulifères n'a jamais été étudiée directement, même si de nombreuses publications rapportent une modification des performances des vecteurs s'alimentant sur des plantes infectées, ce qui confirme des altérations physiologiques de l'insecte (Casteel et al., 2014b; Ghosh et al., 2016; Guo et al., 2010; Huang et al., 2021). Cependant, le faible nombre de dérégulations observées dans notre étude (Figure 16 b-d) suggère que le métabolome des pucerons virulifères est relativement préservé. Ces résultats préliminaires peuvent paraître surprenant au vu des effets importants sur la survie et la biomasse des pucerons virulifères CaMV (chapitre 3). En effet, l'étude du métabolome des plantes infectées a montré une forte corrélation entre l'intensité des symptômes du CaMV et les dérégulations métabolomiques que le virus induit (Chapitre 3). Il ne semble pas y avoir de corrélation entre les effets importants du CaMV sur la physiologie de *M. persicae* et le nombre de dérégulations métaboliques dans le puceron. Malgré l'ordre

de grandeur similaire entre le nombre des dérégulations induites par le TuYV et le CaMV dans le puceron, le fait qu'aucun métabolite ne soit commun peut suggérer que les perturbations du CaMV touchent des voies cruciales pour la survie de l'insecte (Figure 14b).

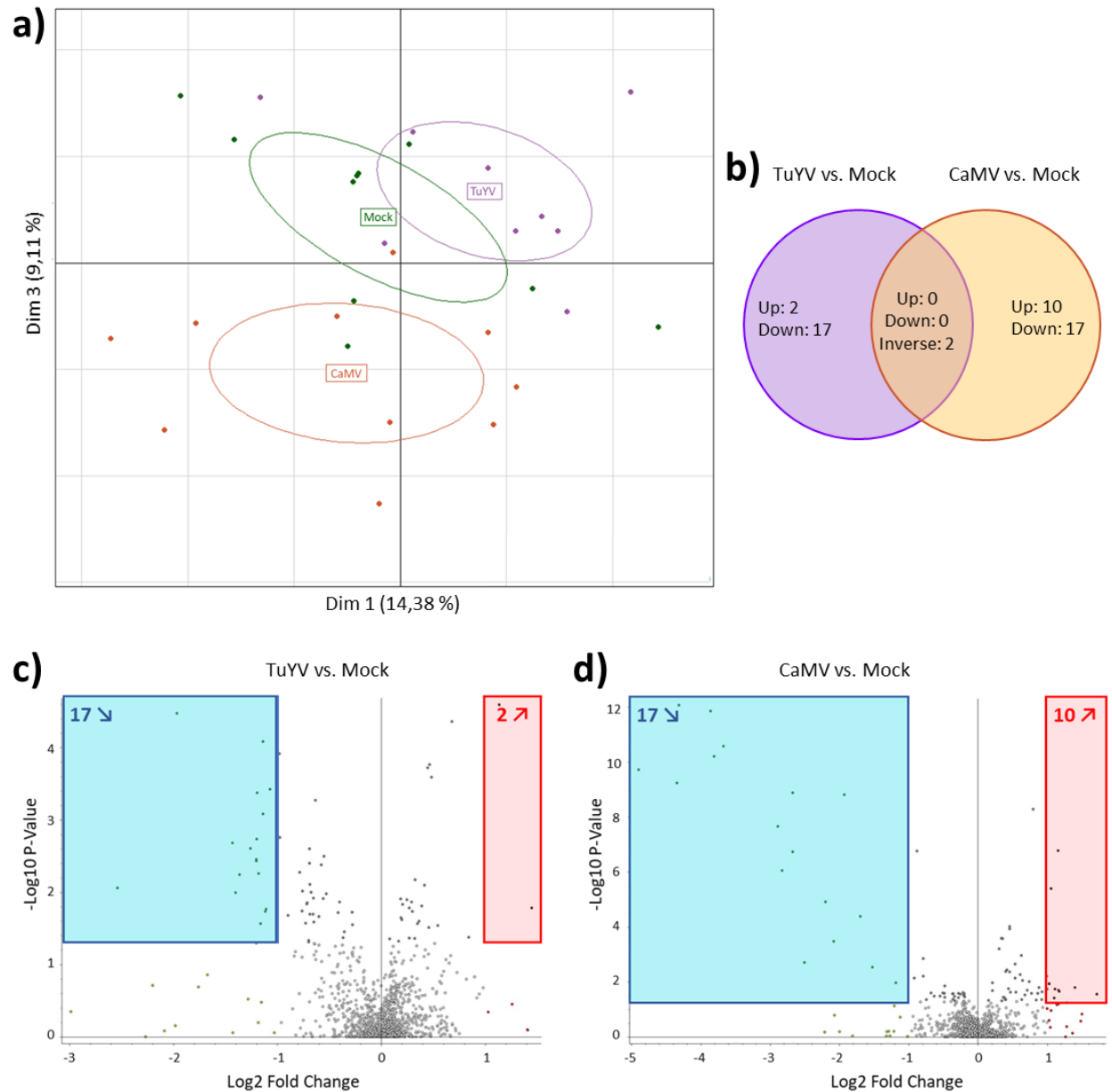


Figure 16 : Analyse métabolomique des pucerons après 3 jours sur des Arabidopsis saines, infectées par le TuYV, ou par le CaMV. (a) Analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur l'ensemble des métabolites détectés selon les dimensions une et trois. (b) Diagramme de Venn représentant les métabolites différentiellement accumulés communs ou distincts entre les pucerons virulifères en comparaison des pucerons non-virulifères. (c-d) Volcano plot représentant les métabolites différentiellement accumulés pour les comparaisons (c) pucerons virulifères TuYV vs. pucerons non-virulifères et (d) pucerons virulifères CaMV vs. pucerons non-virulifères. Les critères suivants ont été utilisés : $p \text{ value} < 0,05$ et $\text{Log}_2 \text{ Fold Change} > |1|$, les métabolites significativement enrichis dans les pucerons virulifères sont contenus dans les encadrés bleus tandis que ceux enrichis dans les pucerons non-virulifères sont contenus dans les encadrés rouges (N = 9-10).

Une autre hypothèse permettant d'expliquer les effets post-acquisitions, serait un effet direct de l'acquisition du virus sur son vecteur. En effet, le profil métabolomique d'une plante infectée par le TuYV est très proche de celui d'une plante saine (Chapitre 3), et pourtant les pucerons virulifères TuYV ont une dispersion augmentée en comparaison des pucerons contrôles, et similaire aux pucerons virulifères CaMV (Chapitre 3). Le TuYV étant internalisé dans le puceron, il pourrait modifier son comportement en interagissant avec son système nerveux ou d'autres organes, comme cela a été démontré précédemment (Ammar & Hogenhout, 2008; Hogenhout et al., 2003; Jia et al., 2018). Ces effets ont notamment été reportés pour des virus propagatifs se multipliant dans le vecteur, toutefois, ils pourraient ne pas être limités à ce type de virus. Il a été rapporté que les protéines structurales du PLRV (CP et RT), un virus proche du TuYV, interagissaient avec plusieurs partenaires protéiques dans le puceron tel que MpC1QBP, une protéine de l'immunité et impliquée dans la transmission (Deblasio et al., 2021). L'acquisition de la protéine mineur de la capsid (RT) du PLRV présentant des mutations ponctuelles peut également induire une mortalité consécutive chez *M. persicae* (Schiltz et al., 2022). Ces études suggèrent que l'internalisation des virions par les vecteurs n'est pas sans conséquence et pourrait altérer son comportement et/ou sa physiologie (Ingwell et al., 2012).

De plus, l'internalisation virale dans le puceron n'est pas nécessaire pour induire des effets directs. Comme nous l'avons montré dans le Chapitre 1, l'acquisition du complexe transmissible du CaMV altère le comportement alimentaire des pucerons virulifères (Verdier et al., 2023). Des études supplémentaires sur les effets directs des virus de plantes sont nécessaires pour discerner et décrire les mécanismes impliqués. L'effet direct du TuYV sur la motilité de *M. persicae* a précédemment été testé en utilisant des pucerons virulifères ayant acquis des particules virales purifiées (Marmonier et al., 2022). Cette étude montre un comportement similaire entre les pucerons ayant acquis ou non le TuYV. Ces résultats sont cohérents avec nos observations (chapitre 3), où la motilité des pucerons mesurée sur la cible ne varie pas. La dispersion de plante à plante, qui est augmentée pour les pucerons virulifères TuYV (chapitre 3) n'a toutefois pas été testée dans cette étude. Malgré une tendance décrivant les effets du TuYV comme étant massivement médiés par la plante, il n'est pas possible d'éclipser totalement des effets directs potentiels, d'autant plus que les auteurs ont identifié différents gènes dérégulés pouvant impacter la locomotion, la perception de l'environnement, ou la transmission (Marmonier et al., 2022).

Identification des voies de signalisations manipulées par les virus

Validation fonctionnelle des gènes candidats chez les pucerons

Dans la première partie du chapitre 4 de la thèse, nous avons décrit les modifications du transcriptome de *M. persicae* lorsque celui-ci se nourrissait trois jours sur des plantes infectées par le TuYV ou le CaMV en comparaison de pucerons sur des plantes saines. Nous avons fait l'hypothèse que certaines de ces dérégulations transcriptomiques étaient induites par les virus afin de modifier le comportement de leur vecteur dans un sens favorisant leur transmission. La seconde partie du chapitre s'est focalisée sur une liste très restreinte des gènes dérégulés dans le puceron lors de l'infection de la plante. Le but de cette partie était de réduire artificiellement l'expression de gènes candidats afin de confirmer leur implication dans la transmission, ou plus généralement dans des modifications du comportement ou de différents traits d'histoire de vie de *M. persicae* pouvant influencer la transmission. Le silencing des gènes ACE1 (g22588) et Mucine (g27683) ont modifié significativement le comportement alimentaire de *M. persicae*, et la réduction de la Mucine a également impacté la transmission du TuYV ainsi que la masse des pucerons. Cependant, les observations réalisées lors de la réduction de l'expression de ces gènes ne vont pas dans le sens d'une manipulation des vecteurs. Il est pour le moment impossible de conclure sur l'aspect adaptatif des dérégulations transcriptomiques induites par l'infection à partir de validations effectuées sur seulement trois gènes. Néanmoins, la technique de VIGS qui a été choisie, ne supporte l'analyse que d'un faible nombre de candidats et ne permet pas de contourner cette limitation.

Dans un premier temps, l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) avait été préférée à l'utilisation de la technique VIGS. Des siRNA de 21 nucléotides spécifiques d'un gène de *M. persicae* avaient été synthétisés pour une dizaine de candidats. En nourrissant les pucerons sur du milieu artificiel nutritif (MP148) supplémenté en siRNA, ces derniers devaient induire le mécanisme de silencing chez le puceron (Figure 17b). Cette technique a d'abord été privilégiée car elle est plus rapide que le VIGS. Elle ne nécessite aucun clonage dans un vecteur, les siRNA une fois commandés et synthétisés sont prêts à l'emploi, et permettent de tester plusieurs candidats efficacement. Cependant, malgré des tests avec des différences de concentration de siRNA et différents temps d'alimentation sur les milieux, aucun silencing stable n'a pu être confirmé par RT-qPCR. Nous avons donc décidé d'utiliser la technique VIGS, qui à la différence de l'approche précédente, produit une multitude de siRNA différents à partir d'un ARNdb d'environ 400 pb, ce qui peut faciliter l'induction du silencing (Figure 17a).

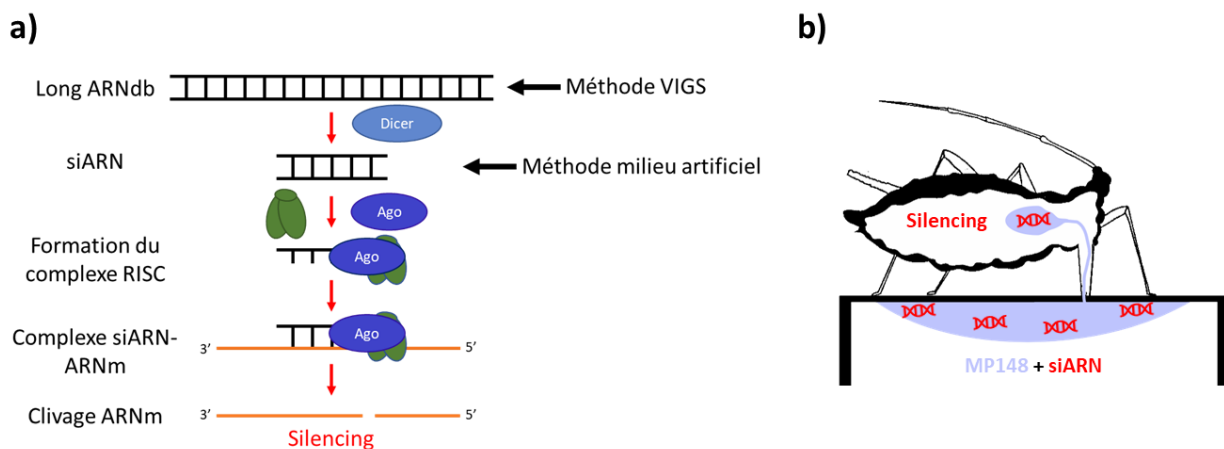


Figure 17 : Principes des techniques VIGS et de l'utilisation des siRNA. a) principales étapes conduisant au silencing de l'expression d'un ARNm. Lors de la réplication du TRV, des ARNdb sont produit puis clivés en siARN par les enzymes Dicer. Ces différents siARN sont ensuite chargés dans le complexe RISC par la protéine Ago. Les ARNm comportant une séquence homologue à la séquence du siARN vont ensuite être clivés. Lors de l'utilisation de siARN, seules les séquences synthétisées seront chargées dans le complexe RISC. b) Représentation d'un puceron s'alimentant sur un milieu nutritif supplémenté en siARN.

Quelle que soit la technique utilisée pour valider l'implication de gènes candidats dans un mécanisme biologique, le nombre de candidats à évaluer simultanément est toujours limitant, que ce soit pour l'induction du silencing, ou bien l'expérimentation elle-même. Le passage d'une liste de 2 000 DEG chez *M. persicae* (Chesnais et al., 2022) à quelques candidats testés expérimentalement peut fortement influencer les conclusions de l'expérimentation, ne serait-ce qu'à travers le choix des candidats à évaluer. De plus, le faible nombre de candidats pouvant être testés nous contraint à tendre vers une sélection de gènes ayant été partiellement décrits, au moins dans d'autres systèmes, et nous force à délaisser les gènes inconnus, limitant la découverte de gènes nouveaux et novateurs. Réduire la liste de candidat une première fois en se limitant à des fonctions de familles de gènes ou des tissus particuliers, aurait pu être pertinent. Etant donné que nous avons sélectionné une liste de gènes étant potentiellement impliqués dans l'alimentation, une analyse transcriptomique restreinte aux glandes salivaires aurait par exemple limité considérablement la liste de DEG et facilité la sélection de gènes candidats. Cette liste aurait compris à la fois des gènes codant pour des effecteurs salivaires (candidats de choix pour le CaMV, au vu des dérégulations observées sur le transcriptomes complet), mais également des gènes impliqués dans le fonctionnement des glandes salivaires (candidats intéressants au vu de la transmission du TuYV qui nécessite la sécrétion des particules virales depuis les glandes salivaires accessoires). De plus, des kits de single cell RNA analysis permettent d'effectuer des analyses transcriptomiques fines sur un nombre très faible de glandes salivaires (~ 5) et limitent la quantité de dissections à effectuer (Gebiola et al., 2022).

Cette analyse transcriptomique aurait également pu être couplée à une analyse protéomique de la salive des pucerons virulifères. En effet, le « secretome » d'insecte vecteur a déjà été réalisé et caractérisé pour *Frankliniella occidentalis* (famille : *Thripidae*) (Rajarapu et al., 2022), *M. persicae* (Thorpe et al., 2016; Vandermoten et al., 2014), ou encore *A. pisum* (Dommel et al., 2020). Cette approche serait d'autant plus pertinente que plusieurs études récentes suggèrent que les modifications du comportement alimentaire

d'insectes vecteurs pourraient être liées à des changements de la composition de la salive (Guo et al., 2023; Rajarapu et al., 2022; Wu et al., 2022), les protéines identifiées dans ces études sont retrouvées peu fréquemment entre les différents groupes de recherche utilisant ces approches protéomiques (van Bel & Will, 2016).

Validation fonctionnelle des gènes candidats de plantes

Le transcriptome de plante (*Arabidopsis* et *Cameline*) lors de l'infection ou non du TuYV et du CaMV a également été généré par l'équipe d'accueil (Chesnaïs et al., 2022). Une partie du travail de thèse, non présenté dans le manuscrit, a été de procéder à la validation fonctionnelle de gènes candidats de plante potentiellement impliqués dans la manipulation virale. De façon identique à la validation sur puceron, une liste de candidats a été établie à partir d'une analyse bibliographique basée sur l'article de Chesnaïs et al. (2022), puis testée dans des expérimentations de transmission et l'étude du comportement alimentaire. Le Nottingham *Arabidopsis* Stock Center dispose d'un catalogue d'*Arabidopsis* mutantes pour de nombreux gènes éteint (gène Knock-Out, KO), ce qui nous a facilement permis de tester quelques candidats (8) aux fonctions variées comme des gènes impliqués dans le métabolisme des sucres, dans les défenses aux insectes, aux virus, ou encore des voies hormonales. Dans la sélection des mutants effectuée, l'extinction des gènes dans les plantes est causée par l'insertion d'un transgène de plusieurs milliers de bases (ADN-T) dans la séquence codante du gène. La première étape du travail a été de confirmer la présence de l'ADN-T dans les (Figure 18). A la suite de ce processus, 8 lignées homozygotes (permettant de tester 8 candidats) n'affichant pas de modifications phénotypiques importantes, ont pu être produites et utilisées pour les expérimentations.

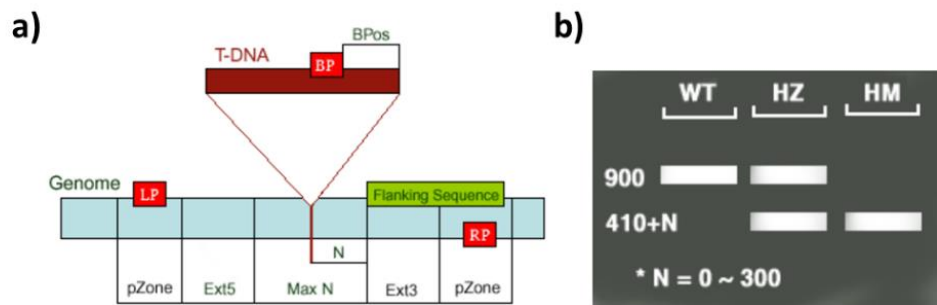


Figure 18 : Représentation de l'environnement génomique d'*Arabidopsis* avoisinant le site d'insertion de l'ADN-T (a) et bandes attendues lors des PCR de vérifications de l'insertion (b). (a) LP et RP, représentent les primers génomiques alors que BP représente le primer spécifique s'hybridant à l'ADN-T. pZone correspond aux régions de 100 pb où doivent s'hybrider les primers génomiques, alors que N est la différence du site d'insertion réel allant de 0 à 300 pb. (b) Lors d'une réaction PCR effectuée avec une *Arabidopsis* sauvage, seule la bande correspondant à la réaction LP+RP est obtenue (piste WT). Lors de l'insertion de l'ADN-T dans un seul des deux allèles du gène, les deux réactions LP+RP et BP+RP produisent un amplicon (piste HZ). Enfin, pour une plante homozygote pour l'insertion, les sites pZone où s'hybride respectivement LP et RP étant séparés de plusieurs milliers de pb, seul le produit de la réaction BP+RP est détecté (piste HM). Figure provenant du Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL).

L'implication des candidats dans la transmission a été évaluée par des tests de transmission en permettant aux pucerons d'acquérir le TuYV ou le CaMV sur les plantes mutantes infectées avant de les déplacer vers des plantules d'*Arabidopsis* ou des navets, selon le virus employé. Ces tests n'ont montré aucune différence significative entre le taux de transmission obtenu à partir d'une acquisition effectuée sur

Arabidopsis Col-0 infectée par le TuYV (GLMM, Df = 9, $\chi^2 = 10.333$, $p = 0.324$, ou le CaMV (GLMM, Df = 9, $\chi^2 = 7.6728$, $p = 0.466$), en comparaison d'une acquisition effectuée sur les différentes plantes mutantes KO (Figure 19). L'effet de l'extinction de ces gènes sur le titre viral dans la plante, ainsi que sur le comportement alimentaire de *M. persicae* ont également été testé mais n'ont montré aucune différence statistiquement significative (résultats non montrés).

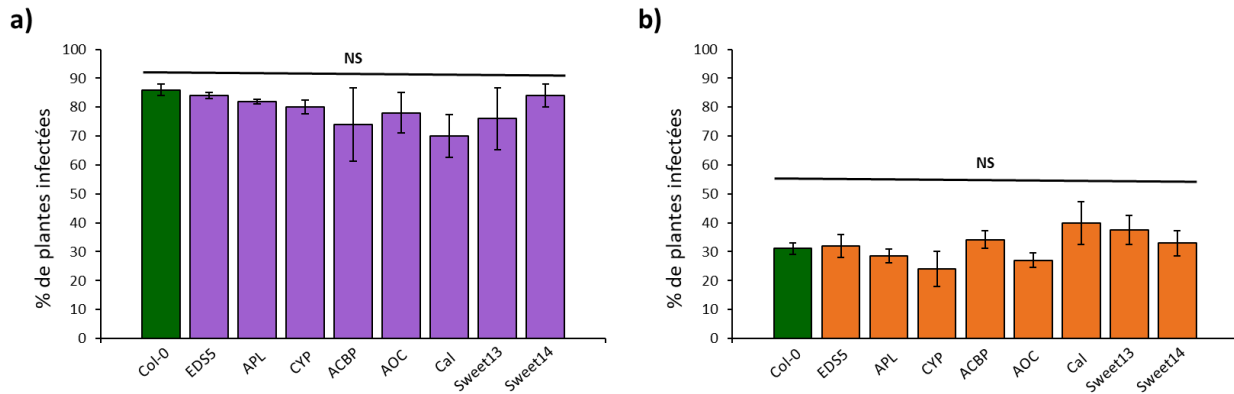


Figure 19 : Etude de la transmission virale lors de l'extinction des gènes candidats (a) Pourcentage de transmission du TuYV. L'acquisition est permise durant 12 h sur une Arabidopsis infectée Col-0 (vert) ou des Arabidopsis mutantes (violet) puis les pucerons sont déplacés vers une plantule d'Arabidopsis (Col-0) afin d'inoculer le virus durant 12 h. Le taux d'infection est évalué 3 semaines post-inoculation par tests sérologiques ELISA. Les graphiques représentent les pourcentages de transmission moyens obtenus à partir de deux sessions de transmission (+/- SEM) (N = 48 – 51). (b) Pourcentage de transmission du CaMV. Les pucerons précédemment affamés durant 2 heures sont déposés 15 minutes sur une Arabidopsis infectée Col-0 (vert) ou mutantes (orange) puis sont déplacés vers une plantule de navet afin d'inoculer le virus durant 24 h. Le taux d'infection est évalué 3 semaines post-inoculation par observation visuelle de la présence de symptômes caractéristiques de l'infection. Les graphiques représentent les pourcentages de transmission moyens obtenus à partir de deux sessions de transmission (+/- SEM) (N = 30 – 50). L'analyse statistique a été effectuée avec un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) adapté à une distribution binomiale des données, (GLMM TuYV, Df = 9, $\chi^2 = 10.333$, $p = 0.324$ et GLMM CaMV, Df = 9, $\chi^2 = 7.6728$, $p = 0.466$). Correspondance acronyme-locus des mutants testés: EDS5 : AT4G39030, APL : AT2G21590 ; CYP : AT4G13770, ACBP : AT4G24230 ; AOC : AT1G13280 ; Cal : AT3G14570 ; Sweet 13 : AT5G50800 ; Sweet 14 : AT4G25010.

Comme pour la validation fonctionnelle des gènes de puceron, la sélection des candidats de plante à évaluer expérimentalement est un paramètre clé et très restrictif. Il reste toutefois incontournable, car il est impossible de tester tous les candidats par des méthodes expérimentales évoquées précédemment. Une alternative ou complément des études transcriptomiques serait la GWAS (genome-wide association study) est une approche permettant l'association d'un trait phénotypique à une ou des régions génétiques grâce au séquençage de nombreux SNP (single nucleotide polymorphism) distribués sur tout le génome (Korte & Farlow, 2013). Cette méthode a notamment été développée pour identifier des loci impliqués dans des pathologies humaines (Burton et al., 2007; Hirschhorn & Daly, 2005). Elle nécessite cependant une cohorte de génotypes très étendue. Le fait qu'Arabidopsis puisse être maintenue sous forme de lignées consanguines par autofécondation et qu'au moins 1 300 accessions ont été génotypées pour environ 250 000 SNP (Hirschhorn & Daly, 2005), font d'Arabidopsis un organisme très adapté aux analyses GWAS (Atwell et al., 2010). Plusieurs traits phénotypiques ont été analysés chez Arabidopsis par cette méthode, comme par exemple l'accumulation de glucosinolates (Chan et al., 2011), ou métaux lourds. Utiliser cette approche afin d'identifier des loci modulant la transmission de nos virus permettrait

d'outrepasser la sélection a priori de candidats parmi des listes conséquentes de DEG générées lors d'analyses transcriptomiques. Des loci de résistance aux pucerons ont été identifiés à l'aide d'analyse GWAS chez *Arabidopsis* (*M. persicae*; Kloth et al., 2017) et le pois cultivé *Pisum sativum* (*A. pisum*; Ollivier et al., 2022). Ces études témoignent de la pertinence de cette approche dans le cadre des interactions plante-puceron et pourrait, en association avec la transcriptomique, faciliter l'identification des gènes impliqués dans la manipulation.

Ouverture

De manière générale, il est attendu que les effets manipulateurs des virus non-circulants non-persistants (NCNP) et des virus circulants-persistants (CP) sur leurs vecteurs divergent sur certains aspects (alimentation, performances, dispersion). Si de nombreux cas d'effets manipulateurs sont décrits pour des virus appartenant à chacun de ces deux groupes en infection simple, il est maintenant question des effets produits dans le cadre de la multi-infection. En effet, il semble que l'infection d'un hôte par plusieurs virus soit la norme, et non l'exception, dans la nature (Elena et al., 2014; Mascia & Gallitelli, 2016; Moreno & López-Moya, 2020). Les effets des co- ou multi-infection sur les performances des virus peuvent être neutres, synergiques ou antagonistes pour un ou plusieurs des virus co-infectants (Mascia & Gallitelli, 2016). Dans certains exemples extrêmes, la co-infection est même nécessaire car relevant de la symbiose, comme pour le PEMV-1 (famille : *Solemoviridae* ; genre : *Enamovirus*) qui a perdu les fonctions de mouvement de cellule à cellule et à longue distance, et nécessite les protéines du PEMV-2 (famille : *Tombusviridae* ; genre : *Umbravirus*) pour infecter la plante (Demler et al., 1993). Réciproquement, le PEMV-1 fournit une capsidite au PEMV-2 afin qu'il soit transmis par puceron. Des co-infections avec le PEMV-2 ont également été décrites comme synergiques avec différents polerovirus tels que le brassica yellows virus (BrYV) (Zhou et al., 2017) ou le PLRV (Ryabov et al., 2001), augmentant entre autre le titre viral et abolissant la restriction aux tissus du phloème du polerovirus. Le tropisme tissulaire dans l'hôte étant un facteur important et déterminant le type d'effets manipulateurs induits par les virus, ces changements peuvent avoir des répercussions sur la transmission et sa manipulation. Le carrot mottle virus (CMoV), un autre umbravirus, permet au TuYV d'être transmis mécaniquement (Erickson & Falk, 2023). Cependant, l'échappement du phloème n'a pas été testé dans cette étude, même si elle est suspectée par les auteurs étant donné l'augmentation du titre viral du TuYV lors de la co-infection. Des effets synergiques de virus phylogénétiquement éloignés ont été montrés au niveau de la réplication (Syller, 2012), mais également sur le comportement des insectes vecteurs (Lightle & Lee, 2014; Peñaflores et al., 2016; Srinivasan & Alvarez, 2007), ou directement sur le taux de transmission (Domingo-Calap et al., 2020). Ces exemples témoignent de la nécessité d'étudier les traits manipulateurs à la lumière de ces synergismes et antagonismes lors de la co- ou multi-infection.

Les effets manipulateurs des virus de plantes semblent être hôte spécifique (pléiotropie antagoniste), comme nous avons pu le constater avec les effets variables du TuYV chez la Cameline, la Claytonia ou Arabidopsis. Néanmoins, à peine 23 % des études emploient plus d'une espèce ou d'un génotype, alors que ces dernières rapportent un effet hôte spécifique du virus dans plus de la moitié des cas (Mauck et al., 2018). Utiliser des organismes modèles comme Arabidopsis ou *Nicotiana benthamiana* facilite certainement la mise en place et l'application de protocoles expérimentaux, de par la connaissance étendue que l'on a de leurs biologies, mais limite certainement les observations de phénomènes découlant de co-évolutions élaborées comme la manipulation des phytovirus. Une réflexion similaire est à porter pour les vecteurs utilisés. En effet, 80 % des études n'en utilisent qu'un seul (Mauck et al., 2018) et ils sont limités à quelques espèces concernant les pucerons, voir quelques clones, et ceux malgré le fait que certains virus (notamment des virus NCNP) soient transmis par plusieurs dizaines d'espèces (Mauck

& Chesnais, 2020). On sait par exemple que *A. fabae* (espèce cryptique) présente des taux de transmission très variables selon le clone (Figure 20).

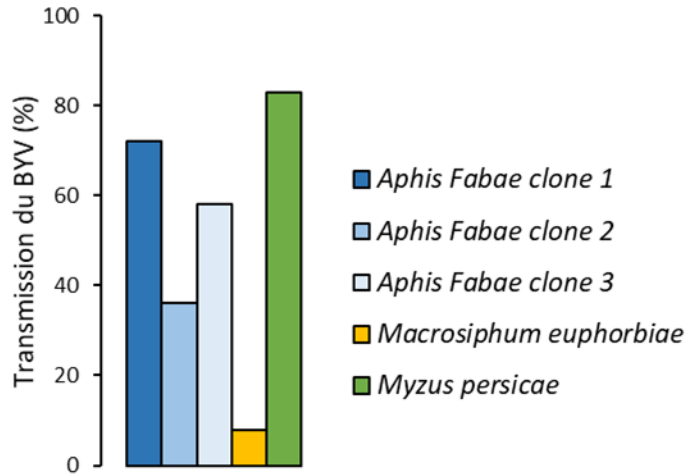


Figure 20 : Taux de transmission du beet yellows virus (BYV, famille : *Closteroviridae*, genre : *Closterovirus*). Par C. Villeroy et V. Brault, INRAE de Colmar.

Si une diversité d'espèces peut être étudiée pour appréhender les relations hôte-virus-vecteur, cette relation tripartite peut également être complexifiée. Comme nous l'avons vu en introduction (partie III-A), la présence et l'espèce de symbionte chez les pucerons peuvent moduler la transmission virale de bien des façons (élargissement de la gamme d'hôte du vecteur, interaction voire protection des virions dans l'insecte, défense contre les parasitoïdes modulant la densité de population et la dispersion des vecteurs, ...). La prise en compte des chaînes trophiques dans lesquelles sont impliqués les pucerons modulent également la dispersion des vecteurs, lorsque la présence des prédateurs (Long & Finke, 2015; Smyrnioudis et al., 2001) ou de parasitoïdes (Hodge & Powell, 2008b; Jeger et al., 2011) sont considérés. Ces effets peuvent être médiés par le prélèvement (ou le parasitisme) des pucerons, mais également par la simple perception du danger causé par la présence des prédateurs (Lee et al., 2021; Tholt et al., 2018). Des études de modélisation ont également montré que leur présence impactait la transmission virale de façon contrastée en fonction du mode de transmission du virus (Crowder et al., 2019). Quelques exemples de travaux intégrés commencent à considérer les relations écologiques complexes, comme l'étude de Shi et al. (2022), qui décrit les mécanismes de défenses du riz à différents stress biotiques (infestation de nématodes et de pucerons) et également l'attraction des prédateurs de ces agresseurs. De telles études considérant la manipulation virale seraient novatrices.

Enfin, la plupart des études négligent la phénologie ainsi que la progression de l'infection dans l'hôte et leurs conséquences sur la dynamique des effets manipulateurs (Mauck et al., 2018). Pourtant, les plantes sont typiquement plus susceptibles à l'infection lors des stades précoces de développement, puis cette sensibilité s'estompe avec le temps (Panter & Jones, 2002). Ce phénomène est appelé en anglais « age-related resistance » (ARR). Les rares études tenant compte de ce phénomène semblent suggérer que les stades précoces de l'infection et de développement de la plante tendent à favoriser l'attraction et l'appétence des vecteurs et qu'à l'inverse, les stades tardifs diminuent ces paramètres (Blua et al., 1994; Higashi & Bressan, 2013; Legarrea et al., 2015; Guanghua Lu et al., 2016). Le corpus d'étude étant très limité, cette tendance n'est peut-être pas représentative, mais dans le cas contraire, elle pourrait refléter

une adaptation des pathogènes qui forcent la dispersion des vecteurs lors des stades tardifs de l'infection avant le dépérissement de l'hôte. Certaines descriptions poussées de phénomènes manipulateurs variant au cours de l'infection, comme c'est le cas du SRBSDV, qui induit la production d'éthylène durant les stades précoces de l'infection, puis la réprime, contrôlant ainsi l'attractivité de la plante infectée pour son vecteur (Zhao et al., 2022), ne peuvent que nous suggérer d'étudier ces phénomènes à différents stades de l'infection.

En conclusion, la manipulation virale est un phénomène évolutif complexe, qui intervient au cours d'interactions écologiques multipartites. Sa pleine compréhension nécessite la combinaison d'études mécanistiques, mais également d'approches intégrées, permettant l'identification des facteurs impliqués autant que son assimilation au niveau du paysage.

Bibliographie

- Adams, M. J. (1991). Transmission of plant viruses by fungi. *Annals of Applied Biology*, 118(2), 479–492. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1991.tb05649.x>
- Alers-Velazquez, R., Jacques, S., Muller, C., Boldt, J., Schoelz, J., & Leisner, S. (2021). Cauliflower mosaic virus P6 inclusion body formation: A dynamic and intricate process. *Virology*, 553, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.10.003>
- Alvarez, A. E., Garzo, E., Verbeek, M., Vosman, B., Dicke, M., & Tjallingii, W. F. (2007). Infection of potato plants with potato leafroll virus changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 125(2), 135–144. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2007.00607.x>
- Ammar, E.-D., & Hogenhout, S. A. (2008). A neurotropic route for Maize mosaic virus (Rhabdoviridae) in its planthopper vector *Peregrinus maidis*. *Virus Research*, 131(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.08.010>
- An, C., & Mou, Z. (2011). Salicylic Acid and its Function in Plant Immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(6), 412–428. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01043.x>
- An, X., Gu, Q., Wang, J., Chang, T., Zhang, W., Wang, J., & Niu, J. (2023). Insect-specific RNA virus affects the stylet penetration activity of brown citrus aphid (*Aphis citricidus*) to facilitate its transmission. *Insect Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13242>
- Armour, S. L., Melcher, U., Pirone, T. P., Lyttle, D. J., & Essenberg, R. C. (1983). Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA. *Virology*, 129(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90392-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90392-6)
- Asare-Bediako, E., Jones, J. E., Hambidge, A. J., Stevens, M., Mead, A., Jenner, C. E., & Walsh, J. A. (2020). The incidence of turnip yellows virus in oilseed rape crops (*Brassica napus* L.) in three different regions of England over three consecutive growing seasons and the relationship with the abundance of flying *Myzus persicae*. *Annals of Applied Biology*, 176(2), 130–137. <https://doi.org/10.1111/aab.12565>
- Ashford, D. A., Smith, W. A., & Douglas, A. E. (2000). Living on a high sugar diet: The fate of sucrose ingested by a phloem-feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 46(3), 335–341. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00186-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00186-9)
- Atwell, S., Huang, Y. S., Vilhjálmsson, B. J., Willems, G., Horton, M., Li, Y., Meng, D., Platt, A., Tarone, A. M., Hu, T. T., Jiang, R., Muliyati, N. W., Zhang, X., Amer, M. A., Baxter, I., Brachi, B., Chory, J., Dean, C., Debieu, M., ... Nordborg, M. (2010). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature*, 465(7298), 627–631. <https://doi.org/10.1038/nature08800>

- Bak, A., Cheung, A. L., Yang, C., Whitham, S. A., & Casteel, C. L. (2017). A viral protease relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance. *Nature Communications*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms14493>
- Bak, A., & Emerson, J. B. (2020). Cauliflower mosaic virus (CaMV) Biology , Management , and Relevance to GM Plant Detection for Sustainable Organic Agriculture. 4(March), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00021>
- Ballinger, M. J., Gawryluk, R. M. R., & Perlman, S. J. (2019). Toxin and Genome Evolution in a *Drosophila* Defensive Symbiosis. *Genome Biology and Evolution*, 11(1), 253–262. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy272>
- Ballinger, M. J., & Perlman, S. J. (2017). Generality of toxins in defensive symbiosis: Ribosome-inactivating proteins and defense against parasitic wasps in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, 13(7), e1006431. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006431>
- Bass, C., & Nauen, R. (2023). The molecular mechanisms of insecticide resistance in aphid crop pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 156(5), 103937. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103937>
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Baumberger, N., Tsai, C. H., Lie, M., Havecker, E., & Baulcombe, D. C. C. (2007). The Polerovirus Silencing Suppressor PO Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology*, 17(18), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.039>
- Bedhomme, S., Hillung, J., & Elena, S. F. (2015). Emerging viruses: Why they are not jacks of all trades? *Current Opinion in Virology*, 10(Figure 1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.10.006>
- Belshaw, R., Gardner, A., Rambaut, A., & Pybus, O. G. (2008). Pacing a small cage: mutation and RNA viruses. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(4), 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.11.010>
- Belshaw, R., Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2007). The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Research*, 17(10), 1496–1504. <https://doi.org/10.1101/gr.6305707>
- Berthelot, E., Ducouso, M., Macia, J.-L., Bogaert, F., Baecker, V., Thébaud, G., Gallet, R., Yvon, M., Blanc, S., Khelifa, M., & Drucker, M. (2019). Turnip Mosaic Virus Is a Second Example of a Virus Using Transmission Activation for Plant-to-Plant Propagation by Aphids. *Journal of Virology*, 93(9). <https://doi.org/10.1128/JVI.01822-18>
- Berti, M., Gesch, R., Eynck, C., Anderson, J., & Cermak, S. (2016). Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. *Industrial Crops and Products*, 94(2016), 690–710. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.034>

- Betancourt, M., Fereres, A., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2008). Estimation of the Effective Number of Founders That Initiate an Infection after Aphid Transmission of a Multipartite Plant Virus. *Journal of Virology*, 82(24), 12416–12421. <https://doi.org/10.1128/jvi.01542-08>
- Beuve, M., Stevens, M., Liu, H. Y., Wintermantel, W. M., Hauser, S., & Lemaire, O. (2008). Biological and molecular characterization of an American sugar beet-infecting Beet western yellows virus isolate. *Plant Disease*, 92(1), 51–60. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0051>
- Bhat, A. I., Pamitha, N. S., Naveen, K. P., & Biju, C. N. (2020). Identification and characterization of cardamom vein clearing virus, a novel aphid-transmitted nucleorhabdovirus. *European Journal of Plant Pathology*, 156(4), 1053–1062. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01958-2>
- Bhat, A.I., Rao, G.P. (2020). Transmission Through Dodder. In: Characterization of Plant Viruses . Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0334-5_8
- Blackman, R. L. (1987). Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (Nectarosiphon) species. *Bulletin of Entomological Research*, 77(4), 713–730. <https://doi.org/10.1017/S0007485300012219>
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. *Aphids on the World's Crops, an Identification and Information Guide*, second ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Blanc, S., Ammar, E. D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V. V., Llave, C., Baker, J., & Pirone, T. P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: Effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology*, 79(12), 3119–3122. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3119>
- Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M. (2014). Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>
- Blanc, S., & Gutiérrez, S. (2015). The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Current Opinion in Virology*, 15, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.003>
- Blanc, S., López-Moya, J.-J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W., & Pirone, T. P. (1997). A Specific Interaction between Coat Protein and Helper Component Correlates with Aphid Transmission of a Potyvirus. *Virology*, 231(1), 141–147. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8521>
- Blanc, S., & Michalakakis, Y. (2016). Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Current Opinion in Insect Science*, 16(Figure 2), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.007>
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6233–6246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl886>
- Blua, M J, & Perring, T. M. (1992). Alatae production and population increase of aphid vectors on virus-infected host plants. *Oecologia*, 92(1), 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF00317263>

- Blua, Matthew J., Perring, T. M., & Madore, M. A. (1994). Plant virus-induced changes in aphid population development and temporal fluctuations in plant nutrients. *Journal of Chemical Ecology*, 20(3), 691–707. <https://doi.org/10.1007/BF02059607>
- Boissinot, S., Brault, V., & Herrbach, E. (2020). Luteovirids. In eLS (Vol. 1, Issue 2, pp. 327–339). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029206>
- Boissinot, S., Erdinger, M., Monsion, B., Ziegler-Graff, V., & Brault, V. (2014). Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of cucurbit aphid-borne yellows virus are essential for efficient systemic infection of plants. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093448>
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology*, 17(18), 1615–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.061>
- 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 Genetics*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001216>
- Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2011). The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Research*, 159(2), 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.020>
- Bouvaine, S., Boonham, N., & Douglas, A. E. (2011). Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *Journal of General Virology*, 92(6), 1467–1474. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029355-0>
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J. J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., & Torrance, L. (2013). Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1), 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102346>
- Brault, V., Herrbach, É., & Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, 38(3), 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.04.005>
- Brault, V., Pérignon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K., & Ziegler-Graff, V. (2005). The Polerovirus Minor Capsid Protein Determines Vector Specificity and Intestinal Tropism in the Aphid. *Journal of Virology*, 79(15), 9685–9693. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.15.9685-9693.2005>
- Brown, D. J. F., Robertson, W. M., & Trudgill, D. L. (1995). Transmission of viruses by plant nematodes.
- Browne, L. M., Conn, K. L., Ayert, W. A., & Tewari, J. P. (1991). The camalexins: New phytoalexins produced in the leaves of *Camelina sativa* (cruciferae). *Tetrahedron*, 47(24), 3909–3914. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86431-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86431-0)

Bukovinszky, T., Potting, R. P. J., Clough, Y., van Lenteren, J. C., & Vet, L. E. M. (2005). The role of pre- and post- alighting detection mechanisms in the responses to patch size by specialist herbivores. *Oikos*, 109(3), 435–446. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13707.x>

Burton, P. R., Clayton, D. G., Cardon, L. R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., Kwiatkowski, D. P., McCarthy, M. I., Ouwehand, W. H., Samani, N. J., Todd, J. A., Donnelly, P., Barrett, J. C., Burton, P. R., Davison, D., Donnelly, P., Easton, D., Evans, D., Leung, H.-T., ... Worthington, J. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447(7145), 661–678. <https://doi.org/10.1038/nature05911>

Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E., & Fereres, A. (2014). A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, 186, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.012>

Caspi-Fluger, A., Inbar, M., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Portnoy, V., Belausov, E., Hunter, M. S., & Zchori-Fein, E. (2012). Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734), 1791–1796. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2095>

Casteel, C. L., De Alwis, M., Bak, A., Dong, H., Whitham, S. A., & Jander, G. (2015). Disruption of ethylene responses by Turnip mosaic virus mediates suppression of plant defense against the green peach aphid vector. In *Plant Physiology* (Vol. 169, Issue 1). <https://doi.org/10.1104/pp.15.00332>

Casteel, C. L., Yang, C., Nanduri, A. C., De Jong, H. N., Whitham, S. A., & Jander, G. (2014). The NIa-Pro protein of Turnip mosaic virus improves growth and reproduction of the aphid vector, *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant Journal*, 77(4), 653–663. <https://doi.org/10.1111/tpj.12417>

Champagne, J., Laliberté-Gagné, M. E., & Leclerc, D. (2007). Phosphorylation of the termini of Cauliflower mosaic virus precapsid protein is important for productive infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 648–658. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0648>

Chan, E. K. F., Rowe, H. C., Corwin, J. A., Joseph, B., & Kliebenstein, D. J. (2011). Combining Genome-Wide Association Mapping and Transcriptional Networks to Identify Novel Genes Controlling Glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biology*, 9(8), e1001125. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001125>

Chapdelaine, Y., Kirk, D., Karsies, A., Hohn, T., & Leclerc, D. (2002). Mutation of Capsid Protein Phosphorylation Sites Abolishes Cauliflower Mosaic Virus Infectivity. *Journal of Virology*, 76(22), 11748–11752. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11748-11752.2002>

Chesnais, Q., Caballero, G., Roxane, V., Michel, C., Kerry, Y., Brault, V., & Ameline, A. (2020). Post-acquisition effects of viruses on vector behavior are important components of manipulation strategies. *Oecologia*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04763-0>

Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Comparative Plant Transcriptome Profiling of *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *Camelina sativa* var. Celine

Infested with *Myzus persicae* Aphids Acquiring Circulative and Noncirculative Viruses Reveals Virus- and Plant-Specific Alterations Relevant to Aphid Fe. *Microbiology Spectrum*, 10(4).

<https://doi.org/10.1128/spectrum.00136-22>

Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., Verdier, M., Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Transcriptome responses of the aphid vector *Myzus persicae* are shaped by identities of the host plant and the virus. *Peer Community Journal*, 2, e82. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.208>

Chesnais, Q., Mauck, K. E., Bogaert, F., Bamière, A., Catterou, M., Spicher, F., Brault, V., Tepfer, M., & Ameline, A. (2019). Virus effects on plant quality and vector behavior are species specific and do not depend on host physiological phenotype. *Journal of Pest Science*, 92(2), 791–804.

<https://doi.org/10.1007/s10340-019-01082-z>

Chesnais, Q., Sun, P., & Mauck, K. E. (2021). Advanced infections by cucurbit yellow stunting disorder virus encourage whitefly vector colonization while discouraging non-vector aphid competitors. *Journal of Pest Science*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01394-z>

Chesnais, Q., Verdier, M., Burckbuchler, M., Brault, V., Pooggin, M., & Drucker, M. (2021). Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, March, 1–10.

<https://doi.org/10.1111/mpp.13069>

Christie, S. R., Christie, R. G., & Edwardson, J. R. (1974). Transmission of a Bacilliform Virus of Sowthistle and *Bidens pilosa*. *Phytopathology*, 64(6), 840. <https://doi.org/10.1094/Phyto-64-840>

Cilia, M., Johnson, R., Sweeney, M., DeBlasio, S. L., Bruce, J. E., MacCoss, M. J., & Gray, S. M. (2014). Evidence for lysine acetylation in the coat protein of a polerovirus. *Journal of General Virology*, 95, 2321–2329. <https://doi.org/10.1099/vir.0.066514-0>

Claudel, P., Chesnais, Q., Fouché, Q., Krieger, C., Halter, D., Bogaert, F., Meyer, S., Boissinot, S., Huguency, P., Ziegler-Graff, V., Ameline, A., & Brault, V. (2018). The aphid-transmitted turnip yellows virus differentially affects volatiles emission and subsequent vector behavior in two brassicaceae plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms19082316>

Clavel, M., Lechner, E., Incarbone, M., Vincent, T., Cognat, V., Smirnova, E., Lecorbeiller, M., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Genschik, P. (2021). Atypical molecular features of RNA silencing against the phloem-restricted polerovirus TuYV. *Nucleic Acids Research*, 49(19), 11274–11293.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab802>

Colizzi, F. S., Martínez-Torres, D., & Helfrich-Förster, C. (2023). The circadian and photoperiodic clock of the pea aphid. *Journal of Comparative Physiology A*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00359-023-01660-8>

Crowder, D. W., Li, J., Borer, E. T., Finke, D. L., Sharon, R., Pattemore, D. E., & Medlock, J. (2019). Species interactions affect the spread of vector-borne plant pathogens independent of transmission mode. *Ecology*, 100(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/ecy.2782>

- Culver, J. N., & Padmanabhan, M. S. (2008). Virus-induced disease: Altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 221–243.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094422>
- Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M., Ng, J. C. K., & Drucker, M. (2017). Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Science*, 24(6), 929–946.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12470>
- Dawkins, R. (1982). *The Extended Phenotype: The Long Reach of the Gene* (Oxford University Press)
- De Moraes, C. M., Stanczyk, N. M., Betz, H. S., Pulido, H., Sim, D. G., Read, A. F., & Mescher, M. C. (2014). Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 11079–11084.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1405617111>
- DeBlasio, S. L., Chavez, J. D., Alexander, M. M., Ramsey, J., Eng, J. K., Mahoney, J., Gray, S. M., Bruce, J. E., & Cilia, M. (2016). Visualization of Host-Poliovirus Interaction Topologies Using Protein Interaction Reporter Technology. *Journal of Virology*, 90(4), 1973–1987. <https://doi.org/10.1128/jvi.01706-15>
- Deblasio, S. L., Wilson, J. R., Tamborindeguy, C., Johnson, R. S., Pinheiro, P. V., Maccoss, M. J., Gray, S. M., & Heck, M. (2021). Affinity Purification-Mass Spectrometry Identifies a Novel Interaction between a Poliovirus and a Conserved Innate Immunity Aphid Protein that Regulates Transmission Efficiency. *Journal of Proteome Research*, 20(6), 3365–3387. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00313>
- Dedryver, C. A., Le Ralec, A., & Fabre, F. (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(6–7), 539–553.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.009>
- Degnan, P. H., & Moran, N. A. (2008). Diverse Phage-Encoded Toxins in a Protective Insect Endosymbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6782–6791.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01285-08>
- Delfosse, V. C., Barrios Barón, M. P., & Distéfano, A. J. (2021). What we know about polioviruses: Advances in understanding the functions of poliovirus proteins. *Plant Pathology*, 70(5), 1047–1061.
<https://doi.org/10.1111/ppa.13368>
- Demian, E., Jaksá-Czotter, N., Molnár, J., Tusnady, G. E., Kocsis, L., & Varallyay, E. (2020). Grapevine rootstocks can be a source of infection with non-regulated viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 156(3), 897–912. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01942-w>
- Demler, S. A., Rucker, D. G., & de Zoeten, G. A. (1993). The chimeric nature of the genome of pea enation mosaic virus: the independent replication of RNA 2. *Journal of General Virology*, 74(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-1-1>
- Deshoux, M., Monsion, B., Pichon, E., Jiménez, J., Moreno, A., Cayrol, B., Thébaud, G., Mugford, S. T., Hogenhout, S. A., Blanc, S., Fereres, A., & Uzeš, M. (2022). Role of Acrostyle Cuticular Proteins in the

Retention of an Aphid Salivary Effector. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15337. <https://doi.org/10.3390/ijms232315337>

Di Mattia, J., Torralba, B., Yvon, M., Zeddami, J., Blanc, S., & Michalakakis, Y. (2022). Nonconcomitant host-to-host transmission of multipartite virus genome segments may lead to complete genome reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.2201453119>

Di Mattia, J., Vernerey, M.-S., Yvon, M., Pirolles, E., Villegas, M., Gaafar, Y., Ziebell, H., Michalakakis, Y., Zeddami, J.-L., & Blanc, S. (2020). Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector. *Journal of Virology*, 94(9), 1–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.01998-19>

Dixon, L., Jiricny, J., & Hohn, T. (1986). Oligonucleotide directed mutagenesis of cauliflower mosaic virus DNA using a repair-resistant nucleoside analogue: identification of an agnogene initiation codon. *Gene*, 41(2–3), 225–231. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(86\)90102-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(86)90102-2)

Dixon, L. K., & Hohn, T. (1984). Initiation of translation of the cauliflower mosaic virus genome from a polycistronic mRNA: evidence from deletion mutagenesis. *The EMBO Journal*, 3(12), 2731–2736. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02203.x>

Domingo-Calap, M. L., Moreno, A. B., Pendón, J. A. D., Moreno, A., Fereres, A., & López-Moya, J. J. (2020). Assessing the impact on virus transmission and insect vector behavior of a viral mixed infection in melon. *Phytopathology*, 110(1), 174–186. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-19-0126-FI>

Dommel, M., Oh, J., Huguet-Tapia, J. C., Guy, E., Boulain, H., Sugio, A., Murugan, M., Legeai, F., Heck, M., Smith, C. M., & White, F. F. (2020). Big Genes, Small Effectors: Pea Aphid Cassette Effector Families Composed From Miniature Exons. *Frontiers in Plant Science*, 11(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01230>

Döring, T. F. (2014). How aphids find their host plants, and how they don't. *Annals of Applied Biology*, 165(1), 3–26. <https://doi.org/10.1111/aab.12142>

Döring, T. F., & Kirchner, S. M. (2022). A model for colour preference behaviour of spring migrant aphids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 377(1862). <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0283>

dos Santos, R. C., Peñaflor, M. F. G. V., Sanches, P. A., Nardi, C., & Bento, J. M. S. (2016). The effects of *Gibberella zeae*, Barley Yellow Dwarf Virus, and co-infection on *Rhopalosiphum padi* olfactory preference and performance. *Phytoparasitica*, 44(1), 47–54. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0493-y>

Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43, 17–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17>

Douglas, A. E. (2006). Phloem-sap feeding by animals: Problems and solutions. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 747–754. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj067>

- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., & Crow, J. F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*, 148(4), 1667–1686. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1667>
- Drucker, M., Froissart, R., Hébrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Espérandieu, P., Mani, J. C., Pugnère, 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2422–2427. <https://doi.org/10.1073/pnas.042587799>
- Drucker, M., & Then, C. (2015). Transmission activation in non-circulative virus transmission: A general concept? *Current Opinion in Virology*, 15, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.08.006>
- Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A., & Davis, T. S. (2018). Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, 63, 169–191. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043119>
- Eigenbrode, S. D., & Gomulkiewicz, R. (2022). Manipulation of Vector Host Preference by Pathogens: Implications for Virus Spread and Disease Management. *Journal of Economic Entomology*, Xx, 1–14. <https://doi.org/10.1093/jee/toab261>
- Elena, S. F., Bernet, G. P., & Carrasco, J. L. (2014). The games plant viruses play. *Current Opinion in Virology*, 8, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.07.003>
- Erb, M., Meldau, S., & Howe, G. A. (2012). Role of phytohormones in insect-specific plant reactions. *Trends in Plant Science*, 17(5), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.01.003>
- Erickson, A., & Falk, B. W. (2023). Dissecting dynamic plant virus synergism in mixed infections of poleroviruses, umbraviruses, and tombusvirus-like associated RNAs. *Frontiers in Microbiology*, 14(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1223265>
- Escudero-Martinez, C., Leybourne, D. J., & Bos, J. I. B. (2021). Plant resistance in different cell layers affects aphid probing and feeding behaviour during non-host and poor-host interactions. *Bulletin of Entomological Research*, 111(1), 31–38. <https://doi.org/10.1017/S0007485320000231>
- Espinoza, A. M., Medina, V., Hull, R., & Markham, P. G. (1991). Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology*, 185(1), 337–344. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90781-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90781-6)
- Feng, H., Edwards, N., Anderson, C. M. H., Althaus, M., Duncan, R. P., Hsu, Y.-C., Luetje, C. W., Price, D. R. G., Wilson, A. C. C., & Thwaites, D. T. (2019). Trading amino acids at the aphid–Buchnera symbiotic interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(32), 16003–16011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906223116>
- Fereres, A., & Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, 141(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>

- Fiebig, M., Poehling, H. M., & Borgemeister, C. (2004). Barley yellow dwarf virus, wheat, and *Sitobion avenae*: A case of trilateral interactions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110(1), 11–21. <https://doi.org/10.1111/j.0013-8703.2004.00115.x>
- Forbes, A. R. (1969). The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *The Canadian Entomologist*, 101(1), 31–41. <https://doi.org/10.4039/Ent10131-1>
- Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., & Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21(1), 285–294. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90136-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90136-1)
- Froelich, D. R., Mullendore, D. L., Jensen, K. H., Ross-Elliott, T. J., Anstead, J. A., Thompson, G. A., Pélissier, H. C., & Knoblauch, M. (2011). Phloem ultrastructure and pressure flow: Sieve-element-occlusion-related agglomerations do not affect translocation. *Plant Cell*, 23(12), 4428–4445. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.093179>
- Gadhav, K. R., Dutta, B., Coolong, T., & Srinivasan, R. (2019). A non-persistent aphid-transmitted Potyvirus differentially alters the vector and non-vector biology through host plant quality manipulation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39256-5>
- Gandon, S. (2018). Evolution and manipulation of vector host choice. *American Naturalist*, 192(1), 23–34. <https://doi.org/10.1086/697575>
- García-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J. M. (2001). Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 157–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>
- Garret, A., Kerlan, C., & Thomas, D. (1993). The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Archives of Virology*, 131(3–4), 377–392. <https://doi.org/10.1007/BF01378639>
- Gebiola, M., Le, B. H., & Mauck, K. E. (2022). A reproducible and sensitive method for generating high-quality transcriptomes from single whitefly salivary glands and other low-input tissues. *Insect Science*, 29(5), 1318–1328. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13008>
- Gehrer, L., & Vorburger, C. (2012). Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids. *Biology Letters*, 8(4), 613–615. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0144>
- Ghosh, A., Das, A., Vijayanandraj, S., & Mandal, B. (2016). Cardamom Bushy Dwarf Virus Infection in Large Cardamom Alters Plant Selection Preference, Life Stages, and Fecundity of Aphid Vector, *Micromyzus kalimpongensis* (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology*, 45(1), 178–184. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv161>
- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T., Mor, N., Sela, N., Luria, N., Dombrovsky, A., Mawassi, M., Haviv, S., Czosnek, H., & Ghanim, M. (2019). Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology*, 93(15). <https://doi.org/10.1128/jvi.00488-19>

- Gonella, E., Pajoro, M., Marzorati, M., Crotti, E., Mandrioli, M., Pontini, M., Bulgari, D., Negri, I., Sacchi, L., Chouaia, B., Daffonchio, D., & Alma, A. (2015). Plant-mediated interspecific horizontal transmission of an intracellular symbiont in insects. *Scientific Reports*, 5(1), 15811. <https://doi.org/10.1038/srep15811>
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljac, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek, H., Vavre, F., Fleury, F., & Ghanim, M. (2010). The Transmission Efficiency of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by the Whitefly *Bemisia tabaci* Is Correlated with the Presence of a Specific Symbiotic Bacterium Species. *Journal of Virology*, 84(18), 9310–9317. <https://doi.org/10.1128/JVI.00423-10>
- Griffiths, D. C., Pickett, J. A., & Woodcock, C. (1982). Behaviour of alatae of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on chemically treated surfaces after tethered flight. *Bulletin of Entomological Research*, 72(4), 687–693. <https://doi.org/10.1017/S0007485300008713>
- Grigoras, I., Vetten, H.-J., Commandeur, U., Ziebell, H., Gronenborn, B., & Timchenko, T. (2018). Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission. *Virology*, 522(July), 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.07.001>
- Groen, S. C., Jiang, S., Murphy, A. M., Cunniffe, N. J., Westwood, J. H., Davey, M. P., Bruce, T. J. A., Caulfield, J. C., Furzer, O. J., Reed, A., Robinson, S. I., Miller, E., Davis, C. N., Pickett, J. A., Whitney, H. M., Glover, B. J., & Carr, J. P. (2016). Virus Infection of Plants Alters Pollinator Preference: A Payback for Susceptible Hosts? *PLoS Pathogens*, 12(8), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005790>
- Guidasci, T., Mougeot, J. L., Lebeurier, G., & Mesnard, J. M. (1992). Processing of the minor capsid protein of the cauliflower mosaic virus requires a cysteine proteinase. *Research in Virology*, 143(C), 361–370. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(06\)80124-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(06)80124-X)
- Guo, H., Zhang, Y., Li, B., Li, C., Shi, Q., Zhu-Salzman, K., Ge, F., & Sun, Y. (2023). Salivary carbonic anhydrase II in winged aphid morph facilitates plant infection by viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(14), 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.2222040120>
- Guo, J.-Y., Ye, G.-Y., Dong, S.-Z., & Liu, S.-S. (2010). An Invasive Whitefly Feeding on a Virus-Infected Plant Increased Its Egg Production and Realized Fecundity. *PLoS ONE*, 5(7), e11713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011713>
- Gutiérrez, S., Michalakis, Y., & Blanc, S. (2012). Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Current Opinion in Virology*, 2(5), 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.001>
- Gutiérrez, S., Yvon, M., Piroilles, E., Garzo, E., Fereres, A., Michalakis, Y., & Blanc, S. (2012). Circulating Virus Load Determines the Size of Bottlenecks in Viral Populations Progressing within a Host. *PLoS Pathogens*, 8(11), 9–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003009>
- Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Hember, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., & Voinnet, O. (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *The EMBO Journal*, 27(15), 2102–2112. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.129>

- Haas, M., Bureau, M., Geldreich, A., Yot, P., & Keller, M. (2002). Cauliflower mosaic virus: Still in the news. *Molecular Plant Pathology*, 3(6), 419–429. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00136.x>
- Haasnoot, J., De Vries, W., Geutjes, E. J., Prins, M., De Haan, P., & Berkhout, B. (2007). The ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 3(6), 0794–0803. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030086>
- Hafrén, A., Macia, J. L., Love, A. J., Milner, J. J., Drucker, M., & Hofius, D. (2017). Selective autophagy limits cauliflower mosaic virus infection by NBR1-mediated targeting of viral capsid protein and particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), E2026–E2035. <https://doi.org/10.1073/pnas.1610687114>
- Ham, B.-K., & Lucas, W. J. (2017). Phloem-Mobile RNAs as Systemic Signaling Agents. *Annual Review of Plant Biology*, 68(1), 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041139>
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2849–2854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013465108>
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23(6), 1473–1496. <https://doi.org/10.1111/mec.12421>
- Hao, P., Liu, C., Wang, Y., Chen, R., Tang, M., Du, B., Zhu, L., & He, G. (2008). Herbivore-induced callose deposition on the sieve plates of rice: An important mechanism for host resistance. *Plant Physiology*, 146(4), 1810–1820. <https://doi.org/10.1104/pp.107.111484>
- Hardie, J., Visser, J. H., & Piron, P. G. M. (1994). Perception of volatiles associated with sex and food by different adult forms of the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Physiological Entomology*, 19(4), 278–284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1994.tb01053.x>
- Harris, K. F., Pesic-Van Esbroeck, Z., & Duffus, J. E. (1996). Morphology of the sweet potato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) relative to virus transmission. *Zoomorphology*, 116(3), 143–156. <https://doi.org/10.1007/BF02526946>
- Hartenstein, M., Albert, M., & Krause, K. (2023). The plant vampire diaries: a historic perspective on *Cuscuta* research. *Journal of Experimental Botany*, 74(10), 2944–2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad082>
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H., & Taliansky, M. (2005). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *Journal of General Virology*, 86(10), 2891–2896. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81101-0>
- Hébrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T., Uzest, M., Froissart, R., Strub, J.-M., Sanglier, S., van Dorsseleer, A., Padilla, A., Labesse, G., & Blanc, S. (2001). Biochemical Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus. *Journal of Virology*, 75(18), 8538–8546. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8538-8546.2001>

- Heil, M. (2016). Host manipulation by parasites: Cases, patterns, and remaining doubts. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4(JUN). <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00080>
- Herbers, K., Tacke, E., Hazirezaei, M., Krause, K.-P., Melzer, M., Rohde, W., & Sonnewald, U. (1997). Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *The Plant Journal*, 12(5), 1045–1056. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12051045.x>
- Herbison, R. E. H. (2017). Lessons in Mind Control: Trends in Research on the Molecular Mechanisms behind Parasite-Host Behavioral Manipulation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00102>
- Herrbach, E., & Chesnais, Q. (2021). Vector Transmission of Plant Viruses. In *Encyclopedia of Virology* (Issue January, pp. 106–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21349-6>
- Hewer, A., Will, T., & Van Bel, A. J. E. (2010). Plant cues for aphid navigation in vascular tissues. *Journal of Experimental Biology*, 213(23), 4030–4042. <https://doi.org/10.1242/jeb.046326>
- Higashi, C. H. V., & Bressan, A. (2013). Infection Rates and Comparative Population Dynamics of *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) on Corn Plants With and Without Symptoms of Maize Mosaic Virus (Rhabdoviridae: Nucleorhabdovirus) Infection. *Environmental Entomology*, 42(5), 949–956. <https://doi.org/10.1603/EN12321>
- Hipper, C., Monsion, B., Bortolamiol-Bécet, D., Ziegler-Graff, V., & Brault, V. (2014). Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *Journal of General Virology*, 95(PART 2), 496–505. <https://doi.org/10.1099/vir.0.058867-0>
- Hirschhorn, J. N., & Daly, M. J. (2005). Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrg1521>
- Hodge, S., Hardie, J., & Powell, G. (2011). Parasitoids aid dispersal of a nonpersistently transmitted plant virus by disturbing the aphid vector. *Agricultural and Forest Entomology*, 13(1), 83–88. <https://doi.org/10.1111/j.1461-9563.2010.00493.x>
- Hodge, S., & Powell, G. (2008a). Do plant viruses facilitate their aphid vectors by inducing symptoms that alter behavior and performance? *Environmental Entomology*, 37(6), 1573–1581. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-37.6.1573>
- Hodge, S., & Powell, G. (2008b). Complex interactions between a plant pathogen and insect parasitoid via the shared vector-host: consequences for host plant infection. *Oecologia*, 157(3), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1083-1>
- Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., & Sonnewald, U. (2001). Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Journal*, 28(5), 529–543. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01179.x>

- Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46(1), 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- Hogenhout, S. A., & Bos, J. I. B. (2011). Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.003>
- Hogenhout, S. A., Redinbaugh, M. G., & Ammar, E. D. (2003). Plant and animal rhabdovirus host range: A bug's view. *Trends in Microbiology*, 11(6), 264–271. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00120-3)
- Hohn, T. (2007). Plant virus transmission from the insect point of view. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 17905–17906. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709178104>
- Honda, K., Wei, T., Hagiwara, K., Higashi, T., Kimura, I., Akutsu, K., & Omura, T. (2007). Retention of Rice dwarf virus by descendants of pairs of viruliferous vector insects after rearing for 6 years. *Phytopathology*, 97(6), 712–716. <https://doi.org/10.1094/PHTO-97-6-0712>
- Huang, L., Shi, X., Shi, J., Zhang, Z., Fang, Y., Zhang, Z., Pan, Q., Zheng, L., Gao, Y., Zhang, D., Tan, X., Liu, Y., & Zhou, X. (2021). Tomato Chlorosis Virus Infection Facilitates Bemisia tabaci MED Reproduction by Elevating Vitellogenin Expression. *Insects*, 12(2), 101. <https://doi.org/10.3390/insects12020101>
- Hull, R., Shepherd, R. J., & Harvey, J. D. (1976). Cauliflower mosaic virus: an improved purification procedure and some properties of the virus particles. *Journal of General Virology*, 31(1), 93–100. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-31-1-93>
- Huo, Y., Liu, W., Zhang, F., Chen, X., Li, L., Liu, Q., Zhou, Y., Wei, T., Fang, R., & Wang, X. (2014). Transovarial Transmission of a Plant Virus Is Mediated by Vitellogenin of Its Insect Vector. *PLoS Pathogens*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003949>
- Hurd, H. (2003). Manipulation of Medically Important Insect Vectors by Their Parasites. *Annual Review of Entomology*, 48(1), 141–161. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112722>
- Inaizumi, M. Studies on the life cycle and polymorphism of Aphis Gossypii Glover (Homoptera, Aphididae), *Special Bulletin of the College of Agriculture, Utsunomiya University*, 1980, pp. 132
- Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D., & Bosque-Pérez, N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00578>
- Irwin, M. E., Kampmeier, G. E., & Weisser, W. W. (2007). Aphid movement: process and consequences. In *Aphids as crop pests* (Issue February 2017, pp. 153–186). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851998190.0153>
- Jayasinghe, W. H., Kim, H., Nakada, Y., & Masuta, C. (2021). A plant virus satellite RNA directly accelerates wing formation in its insect vector for spread. *Nature Communications*, 12(1), 7087. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27330-4>

- Jeger, M. J., Chen, Z., Powell, G., Hodge, S., & van den Bosch, F. (2011). Interactions in a host plant-virus-vector-parasitoid system: Modelling the consequences for virus transmission and disease dynamics. *Virus Research*, 159(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.027>
- Jia, D., Chen, Q., Mao, Q., Zhang, X., Wu, W., Chen, H., Yu, X., Wang, Z., & Wei, T. (2018). Vector mediated transmission of persistently transmitted plant viruses. *Current Opinion in Virology*, 28, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.12.004>
- Jiménez, J., Garzo, E., Alba-Tercedor, J., Moreno, A., Fereres, A., & Walker, G. P. (2020). The phloem-pd: a distinctive brief sieve element stylet puncture prior to sieve element phase of aphid feeding behavior. *Arthropod-Plant Interactions*, 14(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s11829-019-09708-w>
- Jiménez, J., Moreno, A., & Fereres, A. (2020). Transmission of Phloem-Limited Viruses to the Host Plants by Their Aphid Vectors (pp. 357–382). https://doi.org/10.1007/124_2020_47
- Jiménez, Jaime, Moreno, A., & Fereres, A. (2021). Semipersistently transmitted, phloem limited plant viruses are inoculated during the first subphase of intracellular stylet penetrations in phloem cells. *Viruses*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/v13010137>
- Johansen, E., Edwards, M. C., & Hampton, R. O. (1994). Seed transmission of viruses: Current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*, 32(83), 363–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.002051>
- Kennedy JS, Day MF, Eastop VF. 1962. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. London: Commonwealth Inst. Entomol. 114 pp.
- Khelifa, M., Journou, S., Krishnan, K., Gargani, D., Espérandieu, P., Blanc, S., & Drucker, M. (2007). Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *Journal of General Virology*, 88(10), 2872–2880. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83009-0>
- Kirchner, S. M., Döring, T. F., & Saucke, H. (2005). Evidence for trichromacy in the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Insect Physiology*, 51(11), 1255–1260. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.07.002>
- Kloth, K. J., Busscher-Lange, J., Wieggers, G. L., Kruijer, W., Buijs, G., Meyer, R. C., Albrechtsen, B. R., Bouwmeester, H. J., Dicke, M., & Jongsma, M. A. (2017). SIEVE ELEMENT-LINING CHAPERONE1 restricts aphid feeding on arabidopsis during heat stress. *Plant Cell*, 29(10), 2450–2464. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00424>
- Korte, A., & Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods*, 9(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-29>
- Lalić, J., Cuevas, J. M., & Elena, S. F. (2011). Effect of host species on the distribution of mutational fitness effects for an RNA virus. *PLoS Genetics*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002378>
- Lalić, J., & Elena, S. F. (2013). Epistasis between mutations is host-dependent for an RNA virus. *Biology Letters*, 9(1), 1–4. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0396>

- Lamelas, A., Gosalbes, M. J., Manzano-Marín, A., Peretó, J., Moya, A., & Latorre, A. (2011). *Serratia symbiotica* from the Aphid *Cinara cedri*: A Missing Link from Facultative to Obligate Insect Endosymbiont. *PLoS Genetics*, 7(11), e1002357. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002357>
- Leal, W. S. (2013). Odorant Reception in Insects : Roles of Receptors , Binding Proteins , and Degrading Enzymes. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Lee, B. W., Basu, S., Bera, S., Casteel, C. L., & Crowder, D. W. (2021). Responses to predation risk cues and alarm pheromones affect plant virus transmission by an aphid vector. *Oecologia*, 196(4), 1005–1015. <https://doi.org/10.1007/s00442-021-04989-6>
- Lee, L., Palukaitis, P., & Gray, S. M. (2002). Host-Dependent Requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa Protein in Virus Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], 15(10), 1086–1094. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.10.1086>
- Lee, S.-C., Liou, M.-R., Hsu, Y.-H., Wang, I.-N., & Lin, N.-S. (2023). Trade-off between local replication and long-distance dissemination during experimental evolution of a satellite RNA. *Frontiers in Microbiology*, 14(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139447>
- Lefèvre, T., Adamo, S. A., Biron, D. G., Missé, D., Hughes, D., & Thomas, F. (2009). Chapter 3 Invasion of the Body Snatchers. *The Diversity and Evolution of Manipulative Strategies in Host-Parasite Interactions. Advances in Parasitology*, 68(08), 45–83. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00603-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00603-9)
- Lefèvre, T., Koella, J. C., Renaud, F., Hurd, H., Biron, D. G., & Thomas, F. (2006). New Prospects for Research on Manipulation of Insect Vectors by Pathogens. *PLoS Pathogens*, 2(7), e72. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020072>
- Lefèvre, T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Missé, D., Poulin, R., & Thomas, F. (2009). The ecological significance of manipulative parasites. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.08.007>
- Legarrea, S., Barman, A., Marchant, W., Diffie, S., & Srinivasan, R. (2015). Temporal Effects of a Begomovirus Infection and Host Plant Resistance on the Preference and Development of an Insect Vector, *Bemisia tabaci*, and Implications for Epidemics. *PLOS ONE*, 10(11), e0142114. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142114>
- Leh, V. (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *The EMBO Journal*, 18(24), 7077–7085. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.7077>
- Leybourne, D. J., & Aradottir, G. I. (2022). Common resistance mechanisms are deployed by plants against sap-feeding herbivorous insects: insights from a meta-analysis and systematic review. *Scientific Reports*, 12(1), 17836. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20741-3>
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S. M., & Gildow, F. (2001). Vector Specificity of Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) Transmission: Identification of Potential Cellular Receptors Binding BYDV-MAV in the Aphid, *Sitobion avenae*. *Virology*, 286(1), 125–133. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0929>

- Li, F., Hua, H., Han, Y., & Hou, M. (2020). Plant-Mediated Horizontal Transmission of *Asaia* Between White-Backed Planthoppers, *Sogatella furcifera*. *Frontiers in Microbiology*, 11(November), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.593485>
- Li, H., Chen, Y., Lu, C., Tian, H., Lin, S., Wang, L., Linghu, T., Zheng, X., Wei, H., Fan, X., & Chen, Y. (2023). Chemosensory protein regulates the behavioural response of *Frankliniella intonsa* and *Frankliniella occidentalis* to tomato zonate spot virus–infected pepper (*Capsicum annuum*). *PLOS Pathogens*, 19(5), e1011380. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011380>
- Li, P., Liu, C., Deng, W.-H., Yao, D.-M., Pan, L.-L., Li, Y.-Q., Liu, Y.-Q., Liang, Y., Zhou, X.-P., & Wang, X.-W. (2019). Plant begomoviruses subvert ubiquitination to suppress plant defenses against insect vectors. *PLOS Pathogens*, 15(2), e1007607. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007607>
- Li, S., Lyu, S., Liu, Y., Luo, M., Shi, S., & Deng, S. (2021). Cauliflower mosaic virus P6 Dysfunctions Histone Deacetylase HD2C to Promote Virus Infection. *Cells*, 10(9), 2278. <https://doi.org/10.3390/cells10092278>
- Li, X., Halpin, C., & Ryan, M. D. (2007). A novel cleavage site within the potato leafroll virus P1 polyprotein. *Journal of General Virology*, 88(5), 1620–1623. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82627-0>
- Lightle, D., & Lee, J. (2014). Raspberry viruses affect the behavior and performance of *Amphorophora agathonica* in single and mixed infections. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(1), 57–64. <https://doi.org/10.1111/eea.12170>
- Linstead, P. J., Hills, G. J., Plaskitt, K. A., Wilson, I. G., Harker, C. L., & Maule, A. J. (1988). The Subcellular Location of the Gene 1 Product of Cauliflower Mosaic Virus Is Consistent with a Function Associated with Virus Spread. *Journal of General Virology*, 69(8), 1809–1818. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-8-1809>
- Liu, S., He, X., Park, G., Josefsson, C., & Perry, K. L. (2002). A Conserved Capsid Protein Surface Domain of Cucumber Mosaic Virus Is Essential for Efficient Aphid Vector Transmission. *Journal of Virology*, 76(19), 9756–9762. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.19.9756-9762.2002>
- Long, E. Y., & Finke, D. L. (2015). Predators indirectly reduce the prevalence of an insect-vectored plant pathogen independent of predator diversity. *Oecologia*, 177(4), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3194-1>
- Lortzing, T., & Steppuhn, A. (2016). Jasmonate signalling in plants shapes plant–insect interaction ecology. *Current Opinion in Insect Science*, 14, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.01.002>
- Loxdale, H. D., Balog, A., & Harvey, J. A. (2019). Generalism in Nature...The Great Misnomer: Aphids and Wasp Parasitoids as Examples. *Insects*, 10(10), 314. <https://doi.org/10.3390/insects10100314>
- Lu, G., Li, S., Zhou, C., Qian, X., Xiang, Q., Yang, T., Wu, J., Zhou, X., Zhou, Y., Ding, X. S., & Tao, X. (2019). Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission. *PLOS Pathogens*, 15(3), e1007655. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007655>

- Lu, G., Z., T., He, Y., & Zhou, G. (2016). Virus altered rice attractiveness to planthoppers is mediated by volatiles and related to virus titre and expression of defence and volatile-biosynthesis genes. *Scientific Reports*, 6(November), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep38581>
- Lu, S., Chen, M., Li, J., Shi, Y., Gu, Q., & Yan, F. (2019). Changes in *Bemisia tabaci* feeding behaviors caused directly and indirectly by cucurbit chlorotic yellows virus. *Virology Journal*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1215-8>
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology*, 344(1), 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.026>
- Lung, M. C. Y., & Pirone, T. P. (1974). Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus. *Virology*, 60(1), 260–264. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(74\)90383-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(74)90383-3)
- Lutz, L., Raikhy, G., & Leisner, S. M. (2012). Cauliflower mosaic virus major inclusion body protein interacts with the aphid transmission factor, the virion-associated protein, and gene VII product. *Virus Research*, 170(1–2), 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.08.017>
- Mach, J. (2019). *Camelina: A History of Polyploidy, Chromosome Shattering, and Recovery*. *The Plant Cell*, 31(11), tpc.00754.2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00754>
- Maree, H. J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N., & Candresse, T. (2018). Application of HTS for Routine Plant Virus Diagnostics: State of the Art and Challenges. *Frontiers in Plant Science*, 9(August), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01082>
- Marmonier, A., Velt, A., Villeroy, C., Rustenholz, C., Chesnais, Q., & Brault, V. (2022). Differential gene expression in aphids following virus acquisition from plants or from an artificial medium. *BMC Genomics*, 23(1), 333. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08545-1>
- 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. *Journal of General Virology*, 78(10), 2701–2705.
- Martinière, 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*, 2013(2), 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.00183>
- 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 Journal*, 58(1), 135–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03768.x>
- Mascia, T., & Gallitelli, D. (2016). Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science*, 252, 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.015>
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnkar, M., Reynard, J.-S., Rumbou, A., Saldarelli, P., Škorić, D., Vainio, E. J., Valkonen, J. P. T., Vanderschuren, H., Varveri, C., & Wetzler, T. (2017). A Framework for the Evaluation of Biosecurity, Commercial, Regulatory, and Scientific Impacts of

- Plant Viruses and Viroids Identified by NGS Technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00045>
- Mauck, K., Bosque-Pérez, N. A., Eigenbrode, S. D., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2012). Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: Evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, 26(5), 1162–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>
- Mauck, K. E., & Chesnais, Q. (2020). A synthesis of virus-vector associations reveals important deficiencies in studies on host and vector manipulation by plant viruses. *Virus Research*, 285(March), 197957. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197957>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. (2014). Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of Cucumber mosaic virus on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell and Environment*, 37(6), 1427–1439. <https://doi.org/10.1111/pce.12249>
- Mauck, K. E., De Moraes, C., & Mescher, M. (2016). Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.012>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2014). Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions. *Integrative and Comparative Biology*, 54(2), 193–209. <https://doi.org/10.1093/icb/icu012>
- Mauck, K. E. (2016). Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what can it teach us about virus evolution? *Current Opinion in Virology*, 21, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.002>
- Mauck, K. E., Chesnais, Q., & Shapiro, L. R. (2018). Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 101). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2010). Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3600–3605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107>
- Mauck, K. E., Kenney, J., & Chesnais, Q. (2019). Progress and challenges in identifying molecular mechanisms underlying host and vector manipulation by plant viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 33(Figure 1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.01.001>
- McIntyre, P. J. (2012). Cytogeography and genome size variation in the *Claytonia perfoliata* (Portulacaceae) polyploid complex. *Annals of Botany*, 110(6), 1195–1203. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs187>
- Medina-Ortega, K. J., Bosque-Perez, N. A., Ngumbi, E., Jiménez-Martínez, E. S., & Eigenbrode, S. D. (2009). *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Environmental Entomology*, 38(3), 836–845. <https://doi.org/10.1603/022.038.0337>

- Medina-Ortega, K. J., Bosque-Pérez, N. A., Ngumbi, E., Jiménez-Martínez, E. S., & Eigenbrode, S. D. (2009). *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) Responses to Volatile Cues From Barley Yellow Dwarf Virus–Infected Wheat. *Environmental Entomology*, 38(3), 836–845. <https://doi.org/10.1603/022.038.0337>
- Mink, G. I. (1993). Pollen- and seed-transmitted viruses and viroids. In *Annual Review of Phytopathology* (pp. 1–3). CRC Press. <https://doi.org/10.1081/E-EPCS-120006098>
- Monsion, B., Froissart, R., Michalakakis, Y., & Blanc, S. (2008). Large bottleneck size in Cauliflower mosaic virus populations during host plant colonization. *PLoS Pathogens*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000174>
- Montero-Astúa, M., Ullman, D. E., & Whitfield, A. E. (2016). Salivary gland morphology, tissue tropism and the progression of tospovirus infection in *Frankliniella occidentalis*. *Virology*, 493, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.003>
- Moreno, A. B., & López-Moya, J. J. (2020). When viruses play team sports: Mixed infections in plants. *Phytopathology*, 110(1), 29–48. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0250-FI>
- 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. *Journal of Virology*, 79(21), 13587–13593. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13587-13593.2005>
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., & van den Heuvel, J. F. J. M. (1999). A GroEL Homologue from Endosymbiotic Bacteria of the Whitefly *Bemisia tabaci* Implicated in the Circulative Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology*, 256(1), 75–84. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9631>
- Morkunas, I., Mai, V. C., & Gabryś, B. (2011). Phytohormonal signaling in plant responses to aphid feeding. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2057–2073. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0751-7>
- Moury, B., Fabre, F., & Senoussi, R. (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), 17891–17896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702739104>
- Müller, C. B., Williams, I. S., & Hardie, J. (2001). The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. In *Ecological Entomology* (Vol. 26, Issue 3, pp. 330–340). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00321.x>
- 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. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00457>
- Murphy, A. M., Jiang, S., Elderfield, J. A. D., Pate, A. E., Halliwell, C., Glover, B. J., Cunniffe, N. J., & Carr, J. P. (2023). Biased pollen transfer by bumblebees favors the paternity of virus-infected plants in cross-pollination. *iScience*, 106116. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106116>

- Musser, R. O., Hum-Musser, S. M., Felton, G. W., & Gergerich, R. C. (2003). Increased larval growth and preference for virus-infected leaves by the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant, a plant virus vector. *Journal of Insect Behavior*, 16(2), 247–256. <https://doi.org/10.1023/A:1023919902976>
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A. K., Smid, H. M., Goldbach, R., & Peters, D. (1999). Tissue tropism related to vector competence of *Frankliniella occidentalis* for tomato spotted wilt tospovirus. *Journal of General Virology*, 80(2), 507–515. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-507>
- Ng, J. C. K., Josefsson, C., Clark, A. J., Franz, A. W. E., & Perry, K. L. (2005). Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Virology*, 332(1), 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.021>
- Ng, J. C. K., & Perry, K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, 5(5), 505–511. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2004.00240.X>
- Nottingham, S. F., & Hardie, J. (2008). Flight behaviour of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and non-host plant odour. *Physiological Entomology*, 18(4), 389–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00612.x>
- Olazcuaga, L., Baltenweck, R., Leménager, N., Maia-Grondard, A., Claudel, P., Hugueney, P., & Foucaud, J. (2023). Metabolic consequences of various fruit-based diets in a generalist insect species. *ELife*, 12, 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.84370>
- Oliver, K. M., Degan, P. H., Burke, G. R., & Moran, N. A. (2010). Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 247–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305>
- Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36), 12795–12800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506131102>
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803–1807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100>
- Ollivier, R., Glory, I., Cloteau, R., Le Gallic, J. F., Denis, G., Morlière, S., Miteul, H., Rivière, J. P., Lesné, A., Klein, A., Aubert, G., Kreplak, J., Burstin, J., Pilet-Nayel, M. L., Simon, J. C., & Sugio, A. (2022). A major-effect genetic locus, ApRVII, controlling resistance against both adapted and non-adapted aphid biotypes in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(5), 1511–1528. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04050-x>
- Osterbaan, L. J., & Fuchs, M. (2019). Dynamic interactions between plant viruses and their hosts for symptom development. *Journal of Plant Pathology*, 101(4), 885–895. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00323-5>
- Paaby, A. B., & Rockman, M. V. (2013). The many faces of pleiotropy. *Trends in Genetics*, 29(2), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.010>

- Pagán, I. (2022). Transmission through seeds: The unknown life of plant viruses. *PLoS Pathogens*, 18(8), 7–12. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010707>
- Pagán, I., Montes, N., Milgroom, M. G., & García-Arenal, F. (2014). Vertical Transmission Selects for Reduced Virulence in a Plant Virus and for Increased Resistance in the Host. *PLoS Pathogens*, 10(7), 23–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004293>
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., & Fereres, A. (2002). Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *Journal of General Virology*, 83(12), 3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163>
- Pan, L., Miao, H., Wang, Q., Walling, L. L., & Liu, S. (2021). Virus-induced phytohormone dynamics and their effects on plant–insect interactions. *New Phytologist*, 230(4), 1305–1320. <https://doi.org/10.1111/nph.17261>
- Panter, S. N., & Jones, D. A. (2002). Age-related resistance to plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, 38, 251–280. [https://doi.org/10.1016/s0065-2296\(02\)38032-7](https://doi.org/10.1016/s0065-2296(02)38032-7)
- Park, K. C., & Hardie, J. (2004). Electrophysiological characterisation of olfactory sensilla in the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Journal of Insect Physiology*, 50(7), 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.04.011>
- Patton, M. F., Bak, A., Sayre, J. M., Heck, M. L., & Casteel, C. L. (2020). A polerovirus, Potato leafroll virus, alters plant–vector interactions using three viral proteins. *Plant, Cell & Environment*, 43(2), 387–399. <https://doi.org/10.1111/pce.13684>
- Peccoud, J., Mahéo, F., de la Huerta, M., Laurence, C., & Simon, J.-C. (2015). Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conservation and Diversity*, 8(5), 484–492. <https://doi.org/10.1111/icad.12131>
- Peccoud, J., Simon, J. C., Von Dohlen, C., Coeur d’acier, A., Plantegenest, M., Vanlerberghe-Masutti, F., & Jousset, E. (2010). Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(6–7), 474–487. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.004>
- Peñaflor, M. F. G. V., Mauck, K. E., Alves, K. J., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2016). Effects of single and mixed infections of Bean pod mottle virus and Soybean mosaic virus on host-plant chemistry and host–vector interactions. *Functional Ecology*, 30(10), 1648–1659. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12649>
- Perbal, M. C., Thomas, C. L., & Maule, A. J. (1993). Cauliflower mosaic virus gene i product (p1) forms tubular structures which extend from the surface of infected protoplasts. *Virology*, 195(1), 281–285. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1375>
- Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G., & Ziegler-Graff, V. (2002). PO of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of Virology*, 76(13), 6815–6824. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6815-6824.2002>

- Phelan, P. L., & Miller, J. R. (1982). Post-Landing Behavior Of Alate Myzus Persicae As Altered By (E)-B-Farnesene And Three Carboxylic Acids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 32(1), 46–53. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1982.tb03180.x>
- Pirone, T. P., & Blanc, S. (1996). Helper-Dependent Vector Transmission of Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1), 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.227>
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 346(1), 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.052>
- Pooggin, M. M., & Ryabova, L. A. (2018). Ribosome shunting, polycistronic translation, and evasion of antiviral defenses in plant pararetroviruses and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00644>
- Poulin, R. (1994). The evolution of parasite manipulation of host behaviour: a theoretical analysis. *Parasitology*, 109(S1), S109–S118. <https://doi.org/10.1017/S0031182000085127>
- Poulin, R. (1995). “Adaptive” changes in the behaviour of parasitized animals: A critical review. *International Journal for Parasitology*, 25(12), 1371–1383. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00100-X](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00100-X)
- Poulin, R. (2010). Parasite Manipulation of Host Behavior: An Update and Frequently Asked Questions. In *Advances in the Study of Behavior* (1st ed., Vol. 41, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(10\)41005-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(10)41005-0)
- Poulin, R., & Maure, F. (2015). Host Manipulation by Parasites: A Look Back Before Moving Forward. *Trends in Parasitology*, 31(11), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.07.002>
- Powell, G., Hardie, J., & Pickett, J. A. (1995). Behavioural evidence for detection of the repellent polygodial by aphid antennal tip sensilla. *Physiological Entomology*, 20(2), 141–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00810.x>
- Powell, G., Maniar, S. P., Pickett, J. A., & Hardie, J. (1999). Aphid responses to non-host epicuticular lipids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 91(1), 115–123. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00473.x>
- Powell, G., Tosh, C. R., & Hardie, J. (2006). Host Plant Selection By Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151107>
- Rajabaskar, Dheivasigamani, Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2014). Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Research*, 186, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.11.005>

- Rajabaskar, D., Ding, H., Wu, Y., & Eigenbrode, S. D. (2013). Different Reactions of Potato Varieties to Infection by Potato Leafroll Virus, and Associated Responses by its Vector, *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 1027–1035. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0311-2>
- Rajabaskar, Dheivasigamani, Wu, Y., Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D. (2013). Dynamics of *Myzus persicae* arrestment by volatiles from Potato leafroll virus-infected potato plants during disease progression. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148(2), 172–181. <https://doi.org/10.1111/eea.12087>
- Rajarapu, S. P., Ben-Mahmoud, S., Benoit, J. B., Ullman, D. E., Whitfield, A. E., & Rotenberg, D. (2022). Sex-biased proteomic response to tomato spotted wilt virus infection of the salivary glands of *Frankliniella occidentalis*, the western flower thrips. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 149(September), 103843. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2022.103843>
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Gonçalves, M. C., van den Heuvel, J. F. J. M., & Brault, V. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, 82(8), 1995–2007. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1995>
- Remaudière, G. & Remaudière, M. (1997) *Catalogue des Aphididae du monde– Catalogue of the world’s Aphididae*, Homoptera, Aphidoidea, Paris.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., & Jonard, G. (1993). Identification of Beet Western Yellows Luteovirus Genes Implicated in Viral Replication and Particle Morphogenesis. *Virology*, 195(2), 692–699. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1420>
- Rhodes, J. D., Croghan, P. C., & Dixon, A. F. G. (1997). Dietary sucrose and oligosaccharide synthesis in relation to osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiological Entomology*, 22(4), 373–379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1997.tb01182.x>
- Richert-Pöggeler, K. ., & Shepherd, R. . (1997). Petunia Vein-Clearing Virus: A Plant Pararetrovirus with the Core Sequences for an Integrase Function. *Virology*, 236(1), 137–146. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8712>
- Riddick, E. W., & Simmons, A. M. (2014). Do plant trichomes cause more harm than good to predatory insects? *Pest Management Science*, 70(11), 1655–1665. <https://doi.org/10.1002/ps.3772>
- Rochon, D. (2009). Fungal Transmission of Plant Viruses. *Current Protocols in Microbiology*, 12(1), 87–108. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b04s12>
- Roosien, B. K., Gomulkiewicz, R., Ingwell, L. L., Bosque-Pérez, N. A., Rajabaskar, D., & Eigenbrode, S. D. (2013). Conditional vector preference aids the spread of plant pathogens: Results from a model. *Environmental Entomology*, 42(6), 1299–1308. <https://doi.org/10.1603/EN13062>
- Roossinck, M. J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1), 191–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.191>

- Roselló, S., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus — a review. *Scientia Horticulturae*, 67(3–4), 117–150. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00946-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00946-6)
- Roy, L., Barrès, B., Capderrey, C., Mahéo, F., Micoud, A., Hullé, M., & Simon, J. C. (2022). Host plants and insecticides shape the evolution of genetic and clonal diversity in a major aphid crop pest. *Evolutionary Applications*, September 2021, 1653–1669. <https://doi.org/10.1111/eva.13417>
- Ryabov, E. V., Fraser, G., Mayo, M. A., Barker, H., & Taliansky, M. (2001). Umbravirus gene expression helps Potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology*, 286(2), 363–372. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0982>
- Sadowy, E., Juszczuk, M., David, C., Gronenborn, B., & Hulanicka, M. D. (2001). Mutational analysis of the proteinase function of Potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 82(6), 1517–1527. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-6-1517>
- Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Moya, A., & Elena, S. F. (2005). Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics*, 170(3), 1001–1008. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.040741>
- Sanjuán, R., & Elena, S. F. (2006). Epistasis correlates to genomic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14402–14405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604543103>
- Sanjuán, R., Moya, A., & Elena, S. F. (2004). The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(43), 15376–15379. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404125101>
- Sanna, C. R., Li, W. H., & Zhang, L. (2008). Overlapping genes in the human and mouse genomes. *BMC Genomics*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-169>
- Sasaki, T., & Ishikawa, H. (1995). Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 41(1), 41–46. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)00080-Z](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)00080-Z)
- Sastry, K.S. (2013). Plant Virus Transmission Through Vegetative Propagules (Asexual Reproduction). In: Seed-borne plant virus diseases. Springer, India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6_9
- Schiltz, C. J., Wilson, J. R., Hosford, C. J., Adams, M. C., Preising, S. E., DeBlasio, S. L., MacLeod, H. J., Van Eck, J., Heck, M. L., & Chappie, J. S. (2022). Ploverovirus N-terminal readthrough domain structures reveal molecular strategies for mitigating virus transmission by aphids. *Nature Communications*, 13(1), 6368. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33979-2>
- Schmid, M., Sieber, R., Zimmermann, Y.-S., & Vorburger, C. (2012). Development, specificity and sublethal effects of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Functional Ecology*, 26(1), 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01904.x>

- Schoelz, J. E., Angel, C. A., Nelson, R. S., & Leisner, S. M. (2016). A model for intracellular movement of cauliflower mosaic virus: The concept of the mobile virion factory. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 67, Issue 7, pp. 2039–2048). <https://doi.org/10.1093/jxb/erv520>
- Schoelz, J. E., & Shepherd, R. J. (1988). Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology*, 162(1), 30–37. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(88\)90391-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(88)90391-1)
- Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Selman, I. W., Brierley, M. R., Pegg, G. F., & Hill, T. A. (1961). Changes in the free amino acids and amides in tomato plants inoculated with tomato spotted wilt virus. *Annals of Applied Biology*, 49(4), 601–615. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1961.tb03657.x>
- Shapiro, L., De Moraes, C. M., Stephenson, A. G., & Mescher, M. C. (2012). Pathogen effects on vegetative and floral odours mediate vector attraction and host exposure in a complex pathosystem. *Ecology Letters*, 15(12), 1430–1438. <https://doi.org/10.1111/ele.12001>
- Shi, J. H., Liu, H., Pham, T. C., Hu, X. J., Liu, L., Wang, C., Foba, C. N., Wang, S. B., & Wang, M. Q. (2022). Volatiles and hormones mediated root-knot nematode induced wheat defense response to foliar herbivore aphid. *Science of the Total Environment*, 815, 152840. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152840>
- Shih, P.-Y., Sugio, A., & Simon, J.-C. (2023). Molecular Mechanisms Underlying Host Plant Specificity in Aphids. *Annual Review of Entomology*, 68(1), 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-020526>
- Simon, J. C., & Peccoud, J. (2018). Rapid evolution of aphid pests in agricultural environments. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 26, pp. 17–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.12.009>
- Sisterson, M. S. (2008). Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: Insights from a model. *Journal of Economic Entomology*, 101(1), 1–8. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[1:EOIPFH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[1:EOIPFH]2.0.CO;2)
- Slavíková, L., Ibrahim, E., Alquicer, G., Tomašechová, J., Šoltys, K., Glasa, M., & Kundu, J. K. (2022). Weed Hosts Represent an Important Reservoir of Turnip Yellow Virus and a Possible Source of Virus Introduction into Oilseed Rape Crop. *Viruses*, 14(11), 2511. <https://doi.org/10.3390/v14112511>
- Smirnova, E., Firth, A. E., Miller, W. A., Scheidecker, D., Brault, V., Reinbold, C., Rakotondrafara, A. M., Chung, B. Y. W., & Ziegler-Graff, V. (2015). Discovery of a Small Non-AUG-Initiated ORF in Pouteroviruses and Luteoviruses That Is Required for Long-Distance Movement. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004868. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004868>

- Smith, J. L., De Moraes, C. M., & Mescher, M. C. (2009). Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Management Science*, 65(5), 497–503. <https://doi.org/10.1002/ps.1714>
- Smith, T. J., Chase, E., Schmidt, T., & Perry, K. L. (2000). The Structure of Cucumber Mosaic Virus and Comparison to Cowpea Chlorotic Mottle Virus. *Journal of Virology*, 74(16), 7578–7586. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7578-7586.2000>
- Smyrnioudis, I. N., Harrington, R., Clark, S. J., & Katis, N. (2001). The effect of natural enemies on the spread of barley yellow dwarf virus (BYDV) by *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research*, 91(4), 301–306. <https://doi.org/10.1079/BER2001110>
- Srinivasan, R., & Alvarez, J. M. (2007). Effect of mixed viral infections (potato virus Y-potato leafroll virus) on biology and preference of vectors *myzus persicae* and *macrosiphum euphorbiae* (hemiptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 100(3), 646–655. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[646:EOMVIP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[646:EOMVIP]2.0.CO;2)
- Stace-Smith, R., & Hamilton, R. I. (1988). Inoculum Thresholds of Soilborne Pathogens: Viruses. In *Phytopathology* (Vol. 78, Issue 6, p. 875). <https://doi.org/10.1094/phyto-78-875>
- Stafford-Banks, C. A., Yang, L. H., McMunn, M. S., & Ullman, D. E. (2014). Virus infection alters the predatory behavior of an omnivorous vector. *Oikos*, 123(11), 1384–1390. <https://doi.org/10.1111/oik.01148>
- Stafford, C. A., Walker, G. P., & Ullman, D. E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(23), 9350–9355. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100773108>
- Stavolone, L., Villani, M. E., Leclerc, D., & Hohn, T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), 6219–6224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407731102>
- Stearns, F. W. (2010). One hundred years of pleiotropy: A retrospective. *Genetics*, 186(3), 767–773. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.122549>
- Su, Q., Preisser, E. L., Zhou, X. M., Xie, W., Liu, B. M., Wang, S. L., Wu, Q. J., & Zhang, Y. J. (2015). Manipulation of host quality and defense by a plant virus improves performance of whitefly vectors. *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 11–19. <https://doi.org/10.1093/jee/tou012>
- Swevers, L., Broeck, J. Vanden, & Smagghe, G. (2013). The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: A hypothesis. *Frontiers in Physiology*, 4 NOV(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00319>
- Syller, J. (2012). Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology*, 13(2), 204–216. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x>

- Tholt, G., Kis, A., Medzihradzsky, A., Szita, É., Tóth, Z., Havelda, Z., & Samu, F. (2018). Could vectors' fear of predators reduce the spread of plant diseases? *Scientific Reports*, 8(1), 8705. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27103-y>
- Thorpe, P., Cock, P. J. A., & Bos, J. (2016). Comparative transcriptomics and proteomics of three different aphid species identifies core and diverse effector sets. *BMC Genomics*, 17(1), 172. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2496-6>
- Trocza, B. J., Singh, K. S., Zimmer, C. T., Vontas, J., Nauen, R., Hayward, A., & Bass, C. (2021). Molecular innovations underlying resistance to nicotine and neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science*, 77(12), 5311–5320. <https://doi.org/10.1002/ps.6558>
- Tscheuschner, G., Ponader, M., Raab, C., Weider, P. S., Hartfiel, R., Kaufmann, J. O., Völzke, J. L., Bosc-Bierne, G., Prinz, C., Schwaar, T., Andrie, P., Bäßler, H., Nguyen, K., Zhu, Y., Mey, A. S. J. S., Mostafa, A., Bald, I., & Weller, M. G. (2023). Efficient Purification of Cowpea Chlorotic Mottle Virus by a Novel Peptide Aptamer. *Viruses*, 15(3), 697. <https://doi.org/10.3390/v15030697>
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., Simon, J.-C., & Fukatsu, T. (2010). Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color. *Science*, 330(6007), 1102–1104. <https://doi.org/10.1126/science.1195463>
- Ullman, D. E. (1995). Compartmentalization, Intracellular Transport, and Autophagy of Tomato Spotted Wilt Tospovirus Proteins in Infected Thrips Cells. *Phytopathology*, 85(6), 644. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-644>
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazevieuille, C., Cot, D., & Blanc, S. (2010). The “acrostyle”: A newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Structure and Development*, 39(4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2010.02.005>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(46), 17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104>
- van Bel, A. J. E., & Will, T. (2016). Functional Evaluation of Proteins in Watery and Gel Saliva of Aphids. *Frontiers in Plant Science*, 07(december2016), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01840>
- van den Heuvel, J. F. (1991). Transmission of Potato Leafroll Virus from Plants and Artificial Diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology*, 81(2), 150. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-150>
- van den Heuvel, J. F., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., & Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology*, 71(10), 7258–7265. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.10.7258-7265.1997>

- van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., & van der Wilk, F. (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *Journal of General Virology*, 75(10), 2559–2565. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2559>
- van Emden, H. F., Eastop, V. F., Hughes, R. D., & Way, M. J. (1969). The Ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*, 14(1), 197–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.001213>
- van Emden, H.F., Harrington, R., 2007. Aphids as Crop Pests. CABI, 717 p
- Vandermoten, S., Harmel, N., Mazzucchelli, G., De Pauw, E., Haubruge, E., & Francis, F. (2014). Comparative analyses of salivary proteins from three aphid species. *Insect Molecular Biology*, 23(1), 67–77. <https://doi.org/10.1111/imb.12061>
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K., & Jonard, G. (1988). Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Research*, 16(21), 9917–9932. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9917>
- Verdier, M., Chesnais, Q., Piroilles, E., Blanc, S., & Drucker, M. (2023). The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission. *PLOS Pathogens*, 19(2), e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>
- Vorburger, C. (2022). Defensive Symbionts and the Evolution of Parasitoid Host Specialization. *Annual Review of Entomology*, 67(1), 329–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-072621-062042>
- Walker, G. P. (2022). Sieve element occlusion: Interactions with phloem sap-feeding insects. A review. *Journal of Plant Physiology*, 269(November 2021), 153582. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153582>
- Wang, K. Der, Empleo, R., Nguyen, T. T. V., Moffett, P., & Sacco, M. A. (2015). Elicitation of hypersensitive responses in *Nicotiana glutinosa* by the suppressor of RNA silencing protein P0 from poleroviruses. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 435–448. <https://doi.org/10.1111/mpp.12201>
- Watson, M. A., & Roberts, F. M. (1939). A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 127(849), 543–576. <https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0039>
- Webster, B., Bruce, T., Pickett, J., & Hardie, J. (2010). Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. *Animal Behaviour*, 79(2), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.11.028>
- Webster, C. G., Pichon, E., Munster, M. Van, Monsion, B., Deshoux, M., & Gargani, D. (2018). Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets. *Journal of Virology*, 92(14), 1–15.
- Wensler, R. J., & Filshie, B. K. (1969). Gustatory sense organs in the food canal of aphids. *Journal of Morphology*, 129(4), 473–491. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051290406>

- Westwood, J. H., Groen, S. C., Du, Z., Murphy, A. M., Anggoro, D. T., Tungadi, T., Luang-In, V., Lewsey, M. G., Rossiter, J. T., Powell, G., Smith, A. G., & Carr, J. P. (2013). A trio of viral proteins tunes aphid-plant interactions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8(12), 1–18.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083066>
- Whitfield, A. E., Huot, O. B., Martin, K. M., Kondo, H., & Dietzgen, R. G. (2018). Plant rhabdoviruses—their origins and vector interactions. *Current Opinion in Virology*, 33, 198–207.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.11.002>
- Wu, W., Yi, G., Lv, X., Mao, Q., & Wei, T. (2022). A leafhopper saliva protein mediates horizontal transmission of viral pathogens from insect vectors into rice phloem. *Communications Biology*, 5(1).
<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03160-y>
- Wu, Y., Davis, T. S., & Eigenbrode, S. D. (2014). Aphid behavioral responses to virus-infected plants are similar despite divergent fitness effects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153(3), 246–255.
<https://doi.org/10.1111/eea.12246>
- Wright, S. “fisher and ford on ‘the sewall wright effect.’” *American Scientist*, vol. 39, no. 3, 1951, pp. 452–79. JSTOR, <http://www.jstor.org/stable/27826387>. Accessed 7 Aug. 2023.
- Yu, X.-D., Liu, Z.-C., Huang, S.-L., Chen, Z.-Q., Sun, Y.-W., Duan, P.-F., Ma, Y.-Z., & Xia, L.-Q. (2016). RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Management Science*, 72(6), 1090–1098.
<https://doi.org/10.1002/ps.4258>
- Yu, X. D., Liu, Z. C., Huang, S. L., Chen, Z. Q., Sun, Y. W., Duan, P. F., Ma, Y. Z., & Xia, L. Q. (2016). RNAi-mediated plant protection against aphids. *Pest Management Science*, 72(6), 1090–1098.
<https://doi.org/10.1002/ps.4258>
- Zhang, H., Zhu, Y., Liu, Z., Peng, Y., Peng, W., Tong, L., Wang, J., Liu, Q., Wang, P., & Cheng, G. (2022). A volatile from the skin microbiota of flavivirus-infected hosts promotes mosquito attractiveness. *Cell*, 185(14), 2510-2522.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.016>
- Zhang, L., Wu, N., Ren, Y., & Wang, X. (2021). Insights Into Insect Vector Transmission and Epidemiology of Plant-Infecting Fijiviruses. *Frontiers in Microbiology*, 12(February), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628262>
- Zhang, X.-Y., Zhao, T.-Y., Li, Y.-Y., Xiang, H.-Y., Dong, S.-W., Zhang, Z.-Y., Wang, Y., Li, D.-W., Yu, J.-L., & Han, C.-G. (2018). The Conserved Proline18 in the Polerovirus P3a Is Important for Brassica Yellow Virus Systemic Infection. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00613>
- Zhao, Y., Cao, X., Zhong, W., Zhou, S., Li, Z., An, H., Liu, X., Wu, R., Bohora, S., Wu, Y., Liang, Z., Chen, J., Yang, X., Zhou, G., & Zhang, T. (2022). A viral protein orchestrates rice ethylene signaling to coordinate viral infection and insect vector-mediated transmission. *Molecular Plant*, 15(4), 689–705.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.01.006>

Zhou, C.-J., Zhang, X.-Y., Liu, S.-Y., Wang, Y., Li, D.-W., Yu, J.-L., & Han, C.-G. (2017). Synergistic infection of BrYV and PEMV 2 increases the accumulations of both BrYV and BrYV-derived siRNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 7(1), 45132. <https://doi.org/10.1038/srep45132>

Ziegler-Graff, V. (1996). The Coat Protein of Beet Western Yellows Luteovirus is Essential for Systemic Infection but the Viral Gene Products P29 and P19 are Dispensable for Systemic Infection and Aphid Transmission. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(6), 501. <https://doi.org/10.1094/MPMI-9-0501>

Zvereva, A. S., Golyaev, V., Turco, S., Gubaeva, E. G., Rajeswaran, R., Schepetilnikov, M. V., Srour, O., Ryabova, L. A., Boller, T., & Pooggin, M. M. (2016). Viral protein suppresses oxidative burst and salicylic acid-dependent autophagy and facilitates bacterial growth on virus-infected plants. *New Phytologist*, 211(3), 1020–1034. <https://doi.org/10.1111/nph.13967>

Annexe 1 : Contributions scientifiques issues de la thèse

Liste des articles dans des revues internationales à comité de lecture

Verdier, M., Baltenweck, R., Brault, V., Huguenev, P., Drucker, M., Chesnais, Q. (2023). Post-acquisition effects on aphid vectors are related to the plant virus transmission mode and correlate with metabolic modifications of the host plant. (In prep)

Verdier, M., Boissinot, S., Baltenweck, R., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Huguenev, P., Chesnais, Q., Drucker, M. (2023). The turnip yellows virus capsid protein promotes access of its aphid vector to phloem tissues. (In prep)

Verdier, M., Chesnais, Q., Piroilles, E., Blanc, S., & Drucker, M. (2023). The cauliflower mosaic virus transmission helper protein P2 modifies directly the probing behavior of the aphid vector *Myzus persicae* to facilitate transmission. *PLOS Pathogens*, 19(2), e1011161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011161>

Chesnais, Q., Golyaev, V., Velt, A., Rustenholz, C., **Verdier, M.**, Brault, V., Pooggin, M. M., & Drucker, M. (2022). Transcriptome responses of the aphid vector *Myzus persicae* are shaped by identities of the host plant and the virus. *Peer Community Journal*, 2, e82. <https://doi.org/10.24072/pcjournal.208>

Chesnais, Q., **Verdier, M.**, Burckbuchler, M., Brault, V., Pooggin, M., & Drucker, M. (2021). Cauliflower mosaic virus protein P6-TAV plays a major role in alteration of aphid vector feeding behaviour but not performance on infected *Arabidopsis*. *Molecular Plant Pathology*, March, 1–10. <https://doi.org/10.1111/mpp.13069>

Liste des communications orales dans un congrès international ou national

ECE 2023 - *CaMV and TuYV modify the post-acquisition behavior of aphids with consequences on virus transmission*. 12^{ème} European Congress of Entomology, 16-20 octobre 2023, Heraklion, Grèce

RVV 2023 - *Post-acquisition effects of TuYV and CaMV on an aphid vector*. 19^{èmes} rencontres de virologie végétale, 15-19 janvier 2023, Aussois, France

BAPOA 2022 - *Identification of a key viral factor in the manipulation of the vector Myzus persicae by Turnip yellows virus (TuYV)*. 12^{ème} réunion du réseau "Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés", 17-18 mai 2022, Nice, France

RVV 2021 - *The cauliflower mosaic virus protein P2 modulated aphid vector behaviour*. 18^{èmes} rencontres de virologie végétale, 13-16 septembre 2021, Aussois, France

Manipulation virale, comment les virus de plante influencent hôte et vecteur pour favoriser leur transmission ?

Résumé

La manipulation virale est un concept évolutif décrivant les effets induits par les virus sur le phénotype de leur plante hôte et les réponses comportementales des vecteurs étant favorables à la transmission. Dans ces travaux de thèse, nous étudions le cauliflower mosaic virus (CaMV) et le turnip yellows virus (TuYV), deux virus transmis par puceron et aux biologies différentes. Nous caractérisons les effets manipulateurs de ces virus sur le comportement des vecteurs interagissant avec des plantes infectées, puis tentons d'identifier et de caractériser les déterminants viraux et gènes impliqués (chez les vecteurs et la plante-hôte). Nous avons montré que deux protéines du CaMV et une du TuYV sont responsables d'altérations du comportement alimentaire des pucerons. Des études transcriptomiques de plantes infectées et de pucerons s'alimentant sur les plantes infectées ont permis de générer des listes de gènes candidats potentiellement « manipulés » par les virus. La validation fonctionnelle de certains candidats a donné lieu à l'identification de gènes de pucerons impliqués dans le comportement alimentaire, leur rôle manipulateur reste à confirmer. Enfin, nous avons caractérisé des effets importants après le départ du puceron des plantes infectées, en lien avec des altérations métaboliques chez les plantes-hôtes et vecteurs. Ces effets post-acquisitions, très peu étudiés, pourraient avoir des conséquences majeures pour les dynamiques de transmission virale.

Mots clés : Manipulation virale – phytovirus – puceron – comportement – électropénétrographie – transcriptomique – métabolique

Abstract

Host and vector manipulation by plant viruses is an evolutionary concept describing the effects of viruses on their host plant phenotype and vector behavior, in ways that are conducive to their transmission. In this thesis, we studied cauliflower mosaic virus (CaMV) and turnip yellows virus (TuYV), two aphid-borne viruses with different mode of transmission. We characterize the manipulative effects of these viruses on the behavior of vectors interacting with infected plants, and then attempt to identify and characterize the viral components and genes (in the host-plant and/or vector) involved. We have demonstrated that two CaMV proteins and one TuYV protein are responsible for altering aphid feeding behavior. Transcriptomic studies of infected plants and aphids feeding on infected plants generated lists of candidate genes potentially "manipulated" by the viruses. Functional validation of some candidates led to the identification of aphid genes involved in feeding behavior, but their manipulative role remains to be confirmed. Finally, we characterized important effects once aphids have left infected plants, which could be related to metabolomic alterations in the host-plant and vector. These poorly studied post-acquisition effects might have significant implications for viral transmission dynamics.

Keywords: Host and vector manipulation – plant viruses – aphid – behavior – electrical penetration graph (EPG) technique – behavior – transcriptomic – metabolomic