

Table des Matières

Abréviations.....	1
Terminologie et Sigles.....	1
Virus.....	2
INTRODUCTION GENERALE.....	4
1. <u>La transmission des phytovirus par insecte vecteur</u>.....	7
1.1. La transmission non circulante	8
Un processus biologique et non mécanique.	8
La stratégie Capside.....	10
La stratégie FAT.....	11
1.2. La transmission circulante : Article N°1 soumis à la revue <i>Virologie</i>.....	13
2. <u>Les gémiviruses et leurs insectes vecteurs</u>.....	40
2.1. Importance économique : des maladies émergentes.....	40
2.2. Les <i>Geminiviridae</i> : des virus à ADN.....	40
Le genre <i>Mastrevirus</i>	41
Le genre <i>Curtovirus</i>	41
Le genre <i>Begomovirus</i>	42
2.3. Cycle d'infection de la plante et localisation nucléaire.....	42
Les étapes de colonisation d'une plante par un gémivirus.....	42
La multiplication des gémivirus.	43
2.4. La transmission des gémiviruses par des homoptères.....	45
La transmission des bégomovirus par le complexe de biotypes de <i>B. tabaci</i>	46
3. <u>La transmission du MSV par le genre <i>Cicadulina spp.</i> sur maïs</u>.....	49
3.1. Le maïs : céréale d'importance mondiale	49
3.2. La maladie de la striure.....	49
Conséquences agronomiques et dégâts.	49
Epidémiologie de la maladie.	50
La lutte contre la maladie de la striure.....	51
3.3. Le <i>Maize streak mastrevirus</i> (MSV)	51
Membre type du genre <i>Mastrevirus</i>	51
Distribution géographique.....	52

3.4. Les cicadelles du genre <i>Cicadulina</i>	52
Classification et distribution géographique.....	52
Biologie et description morphologique.....	52
Espèces vectrices du MSV.	53
CHAPITRE I.....	55
I.1. <u>Introduction et Objectifs</u>	55
I.2. <u>Article N°2 soumis à la revue <i>Entomologia Experimentalis et Applicata</i></u>	57
I.2. <u>Discussion</u>	89
CHAPITRE II.....	96
II.1. <u>Introduction et Objectifs</u>	96
II.2. <u>Article N°3 soumis à la revue <i>Virology</i></u>	97
II.3. <u>Discussion</u>	123
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	128
<u>Acquisition et inoculation virale</u>	128
<u>Persistance et dynamique du virus dans son vecteur</u>	130
Les barrières à la transmission circulante	131
Persistence : stockage et préservation.....	132
<u>Perspectives de travail à court terme</u>	133
<u>Perspectives de travail à long terme</u>	135
Liste des Figures et des Tableaux.....	137
Liste des Publications.....	140
Références Bibliographiques	142
Annexes.....	160

Abréviations

Terminologie et Sigles *

AAP :	Acquisition Access feeding Period
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNdb :	Acide Désoxyribonucléique double brins
ADNsb :	Acide Désoxyribonucléique simple brin
ARN :	Acide Ribonucléique
Bs :	Blob of electron dense material
CA :	Canal Alimentaire
Ch :	Chloroplaste
CIRAD :	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CP :	Capsid Protein
CS :	Canal Salivaire
Cx :	ORFs codés par le brin complémentaire
Cy :	Cytoplasme
DAG :	Acide aspartique-Alanine-Glycine
DAS-ELISA :	Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
emf :	electromotive forces
ENSAM :	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier
EPG :	Electrical Penetration Graph
EPG-AC :	Electrical Penetration Graph-Alternating Current
EPG-DC :	Electrical Penetration Graph-Direct Current
FAO :	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FAT :	Facteur Assistant à la Transmission
FFT :	Fast Fourier Transform
GFP :	Green Fluorescent Protein
GSA :	Glandes Salivaires Accessoires
GSP :	Glandes Salivaires Principales
HC-Pro :	Helper Component-Proteinase, facteur assistant à la transmission des potyvirus
HF :	High Frequency
Hz :	Hertz
IAP :	Inoculation Access feeding Period
ICTV :	International Committee on Taxonomy of Viruses
INA P-G :	Institut National Agronomique Paris-Grignon
IR :	Intergenic Region
KITC :	Lysine-Isoleucine-Thréonine-Cystéine
La :	Lacuna
LIR :	Large Intergenic Region

LTG :	Leafhopper Transmitted Geminiviruses
Lu :	Lumen
MC :	Mesophyll Cell
MET :	Microscope Electronique à Transmission
MP :	Mouvement Protein
N :	Noyau
ORF :	Open Reading Frame
pb :	paire de bases
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pd :	potential drop
Ph :	Phloem tube
PTK :	Proline-Thréonine-Lysine
RGD :	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RT :	Readthrough
RTD :	Readthrough Domain
SIR :	Small Intergenic Region
SS :	Salivary Sheath
TEM :	Transmission Electron Microscopy
Vi :	Virus Inclusion
V :	Volt
VS :	Vascular bundle Sheath
Vx :	ORFs codés par le brin viral
WTG :	Whiteflies Transmitted Geminiviruses
Xy :	Xylem vessel

Virus

AbMV :	<i>Abutilon mosaic begomovirus</i>
ACMV :	<i>African cassava mosaic begomovirus</i>
AYVV :	<i>Ageratum yellow vein begomovirus</i>
BCTV :	<i>Beet curly top curtovirus</i>
BDMV :	<i>Bean dwarf mosaic begomovirus</i>
BeYDV :	<i>Bean yellow dwarf mastrevirus</i>
BGMV :	<i>Bean golden mosaic begomovirus</i>
BYDV :	<i>Barley yellow dwarf luteovirus</i>
CaLCuV :	<i>Cabbage leaf curl begomovirus</i>
CaMV :	<i>Cauliflower mosaic caulimovirus</i>
CHIKV :	<i>Chikungunya alphavirus</i>
CMV :	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>
CpCDV :	<i>Chickpea chlorotic dwarf virus</i>
CSMV :	<i>Chloris striate mosaic mastrevirus</i>
DiSMV :	<i>Digitaria striate mosaic mastrevirus</i>

DSV :	<i>Digitaria streak mastrevirus</i>
MStV :	<i>Maize stripe tenuivirus</i>
MSV :	<i>Maize streak mastrevirus</i>
PanSV :	<i>Panicum streak mastrevirus</i>
PEMV-1 :	<i>Pea enation mosaic enamovirus</i> ARN-1
PSMV :	<i>Paspalum striate mosaic mastrevirus</i>
RDV :	<i>Rice dwarf reovirus</i>
RYMV :	<i>Rice yellow mottle sobemovirus</i>
SLCV :	<i>Squash leaf curl begomovirus</i>
SSV :	<i>Sugarcane streak mastrevirus</i>
TMV :	<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>
ToLCV-Au :	isolat australien du <i>Tomato leaf curl begomovirus</i>
ToMoV :	<i>Tomato mottle begomovirus</i>
TPCTV :	<i>Tomato pseudo curly top curtovirus</i>
TSWV :	<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>
TYDV :	<i>Tobacco yellow dwarf mastrevirus</i>
TYLCV :	<i>Tomato yellow leaf curl begomovirus</i>
TYLCV-Is :	isolat israélien du <i>Tomato yellow leaf curl begomovirus</i>
VEEV :	<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>
WDV :	<i>Wheat dwarf mastrevirus</i>
WEEV :	<i>Western equine encephalitis virus</i>

* : Par commodité, la traduction des abréviations est donnée dans la langue dont elles sont issues.

Introduction Générale



Photo Michel Peterschmitt

Champ de maïs à l'île de La Réunion.

Introduction Générale

La plupart des virus de plantes sont transmis par des organismes tiers qui assurent la pérennité de leur parasitisme obligatoire au sein de cellules vivantes. Les stratégies utilisées par les virus pour réaliser cette étape, indispensable à leurs cycles, sont multiples. De plus, c'est de l'efficacité de cette transmission dont dépend principalement la gravité des épidémies virales. La propagation spectaculaire au niveau mondial des virus transmis par mouche blanche du genre *Bemisia* en est une illustration récente et éloquente. En effet, il a été montré que cette expansion contemporaine est la conséquence d'une diffusion plus importante de ces virus, suite à l'émergence d'une population de *Bemisia* plus prolifique et plus polyphage que les populations antérieures.

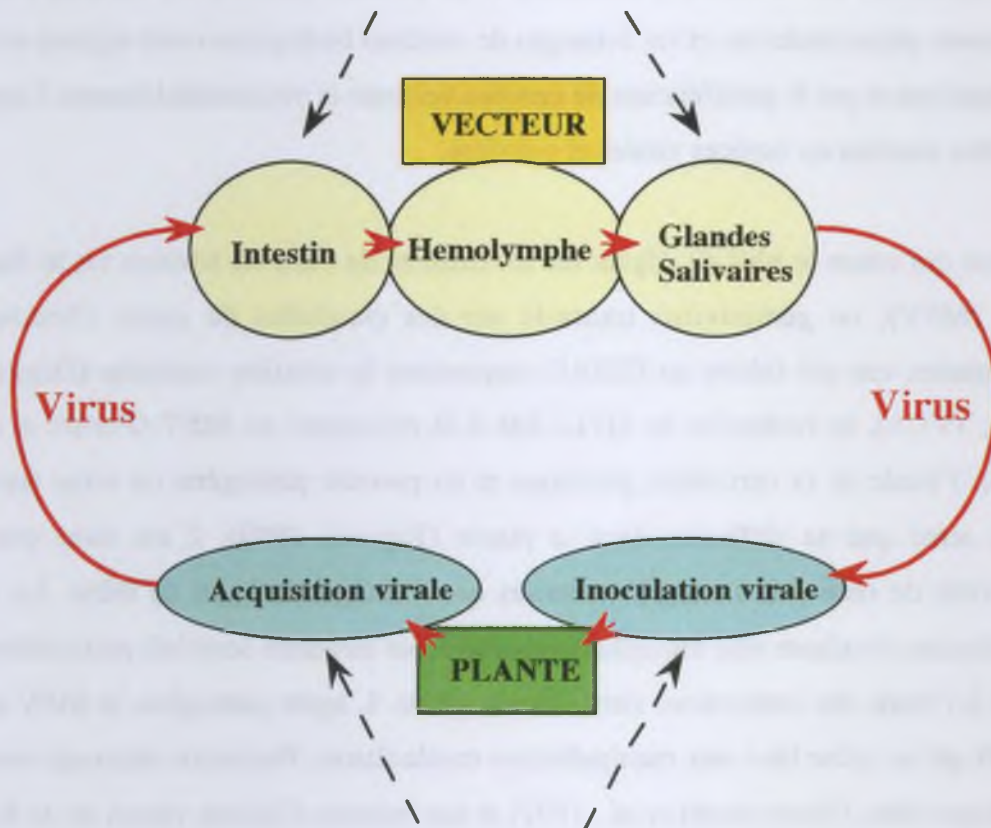
Les moyens de lutte utilisés actuellement contre les maladies transmises par vecteur, sont de deux types : la lutte contre le vecteur, qui rompt le cycle de la maladie, et la résistance au pathogène. Ces moyens sont généralement onéreux, et certains, comme les traitements insecticides, sont connus pour provoquer des dommages importants à l'environnement. La sélection classique de variétés résistantes est souvent efficace et semble être la méthode de choix, si les sources de résistance au virus et/ou à l'insecte sont disponibles. Des résistances dérivées du pathogène sont également développées grâce à la technologie de la transgénèse. Une voie innovante de contrôle des maladies virales encore peu explorée serait de 'brouiller' l'interaction entre le virus et le vecteur, en évitant ainsi que l'insecte potentiellement vecteur ne devienne apte à transmettre le virus. L'avènement d'une telle stratégie de lutte est tributaire des connaissances encore limitées sur les interactions cellulaires et moléculaires entre le virus et le vecteur et entre le vecteur et la plante. Les travaux les plus nombreux ont porté sur le rôle du comportement alimentaire des pucerons dans la transmission des virus non circulants. En revanche, très peu de données sont disponibles sur le comportement alimentaire des insectes vecteurs de virus circulants autres que les pucerons. La présente thèse avait pour objectif d'approfondir les connaissances dans ce domaine, en analysant la transmission circulante d'un géminivirus par cicadelle.

Parmi les familles virales transmises selon le mode circulant, la famille *Geminiviridae* est la plus importante en nombre d'espèces virales et en importance économique. Les dernières décennies ont vu se développer de graves épidémies à gémiovirus sur les cultures qui ont touché à la fois l'Ancien Monde et le Nouveau Monde. Ces épidémies ont été favorisées par l'intensification des cultures, l'utilisation d'un nombre restreint de variétés cultivées, les traitements phytosanitaires et les échanges de matériel biologique entre régions et continents mais également par la prolifération de certains vecteurs et vraisemblablement l'apparition de nouvelles souches ou espèces virales et vectrices.

Le virus qui cause le plus de dégâts sur les cultures de maïs en Afrique est le *Maize streak virus* (MSV), un gémiovirus transmis par des cicadelles du genre *Cicadulina*. Des programmes ont été initiés au CIRAD concernant la création variétale (Dintinger *et al.*, 1997a, 1997b), la recherche de QTLs liés à la résistance au MSV (Pernet *et al.*, 1999a, 1999b), l'étude de la variabilité génétique et du pouvoir pathogène du virus (Isnard *et al.*, 1998), ainsi que sa diffusion dans la plante (Bigarré, 1999). C'est dans cet ensemble d'activités de recherches complémentaires que s'intègre ce sujet de thèse. Le modèle de transmission circulante non multipliante du MSV par cicadelle semblait particulièrement bien adapté à l'étude des interactions virus-insecte-plante. L'agent pathogène, le MSV est un virus à ADN qui se prête bien aux manipulations moléculaires. Plusieurs anticorps monoclonaux sont disponibles (Peterschmitt *et al.*, 1991) et une gamme d'isolats viraux de la Réunion ont été clonés, séquencés et agroinfectés (Peterschmitt *et al.*, 1996 ; Isnard *et al.*, 1998). Le virus est transmis selon le mode circulant par huit cicadelles du genre *Cicadulina*, qui en compte 22. Il semblait intéressant de les comparer pour leurs capacités de transmission. L'espèce *C. mbila*, servira de référence car elle est le vecteur le plus efficace et peut être sélectionnée pour une réussite de 100% des transmissions individuelles (Reynaud, 1988). Les espèces du genre *Cicadulina* se multiplient rapidement (cycle en 1 mois ; conditions : 26 °C, photopériode L16:D8), le cycle de transmission virale est court (48 heures) et les symptômes de la maladie (striures) apparaissent dès 8 à 10 jours après inoculation.

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont permis d'étudier les étapes majeures de la transmission d'un virus par un insecte vecteur, dont (1) l'accessibilité du virus au moment

Persistence et Dynamique du virus dans l'insecte



Comportement alimentaire de l'insecte

Figure 1. Cycle d'un virus de végétaux transmis par insecte vecteur selon le mode circulant. Le comportement alimentaire de l'insecte intervient dans les phases d'acquisition et d'inoculation virales dans une plante. La transmission virale dépend également de la persistance et de la dynamique du virus à travers les différents compartiments de l'insecte.

de l'alimentation du vecteur, (2) la capacité d'inoculation du virus dans une nouvelle plante et (3) la persistance du virus dans le vecteur suite à une alimentation infectieuse (Figure 1).

La première partie de ce mémoire est consacrée à une présentation bibliographique des connaissances actuelles sur les différentes stratégies utilisées dans la vection et sur notre matériel d'étude. Nous étudierons ensuite, dans un premier chapitre, le comportement alimentaire de *C. mbila* intervenant dans l'efficacité de l'acquisition et de l'inoculation du MSV. Dans un deuxième chapitre, nous parlerons de la persistance et de la dynamique du virus dans son vecteur.

1. La transmission des phytovirus par insecte vecteur

Les virus sont des parasites endocellulaires obligatoires dont la pérennité dépend bien sûr de leur capacité à se répliquer au sein d'une cellule hôte, mais pas uniquement (Hébrard *et al.*, 1999). Avant la mort de la cellule, le virus doit également être capable d'infecter d'autres cellules du même hôte en opérant des mouvements de cellule à cellule et des mouvements à longue distance en empruntant les tissus vasculaires de son hôte (Stussi-Garraud *et al.*, 1998). Enfin, avant la mort de l'hôte, les virus devront impérativement en infecter un autre pour survivre. Cette étape de transmission est indispensable et commune à tous les virus connus. Exceptions faites de la transmission par voie végétative et par la semence, elle implique le plus souvent un passage délicat dans le milieu extérieur. Les solutions adoptées par les virus pour accomplir cette étape avec succès, sont impressionnantes tant par leur nature que par leur diversité.

Les virus de plantes sont confrontés aux difficultés de la transmission, qui sont accentuées par le fait que leurs hôtes sont immobiles (Hébrard *et al.*, 1999). Cela explique probablement pourquoi la majorité des stratégies de transmission adoptées par les phytovirus font appels à des organismes tiers, bien que certains virus soient transmissibles par la graine, le pollen ou par contact entre les plantes. De nombreux animaux, en particulier des invertébrés, puisent leurs ressources dans les tissus de végétaux supérieurs. Ils sont le plus souvent très mobiles, capables de passer de manière autonome d'une plante à une autre, et tuent rarement la plante sur laquelle ils se nourrissent. Tous ces organismes sont susceptibles d'être utilisés comme véhicules de transport entre plantes hôtes, dans l'espace et dans le temps, par des virus phytopathogènes et sont dénommés vecteur. Des vecteurs de virus ont été décrits chez les champignons du sol, les nématodes du sol, les acariens et les insectes. La majorité des connaissances concernent principalement les virus transmis par des insectes dont l'appareil buccal est de type piqueur suceur.

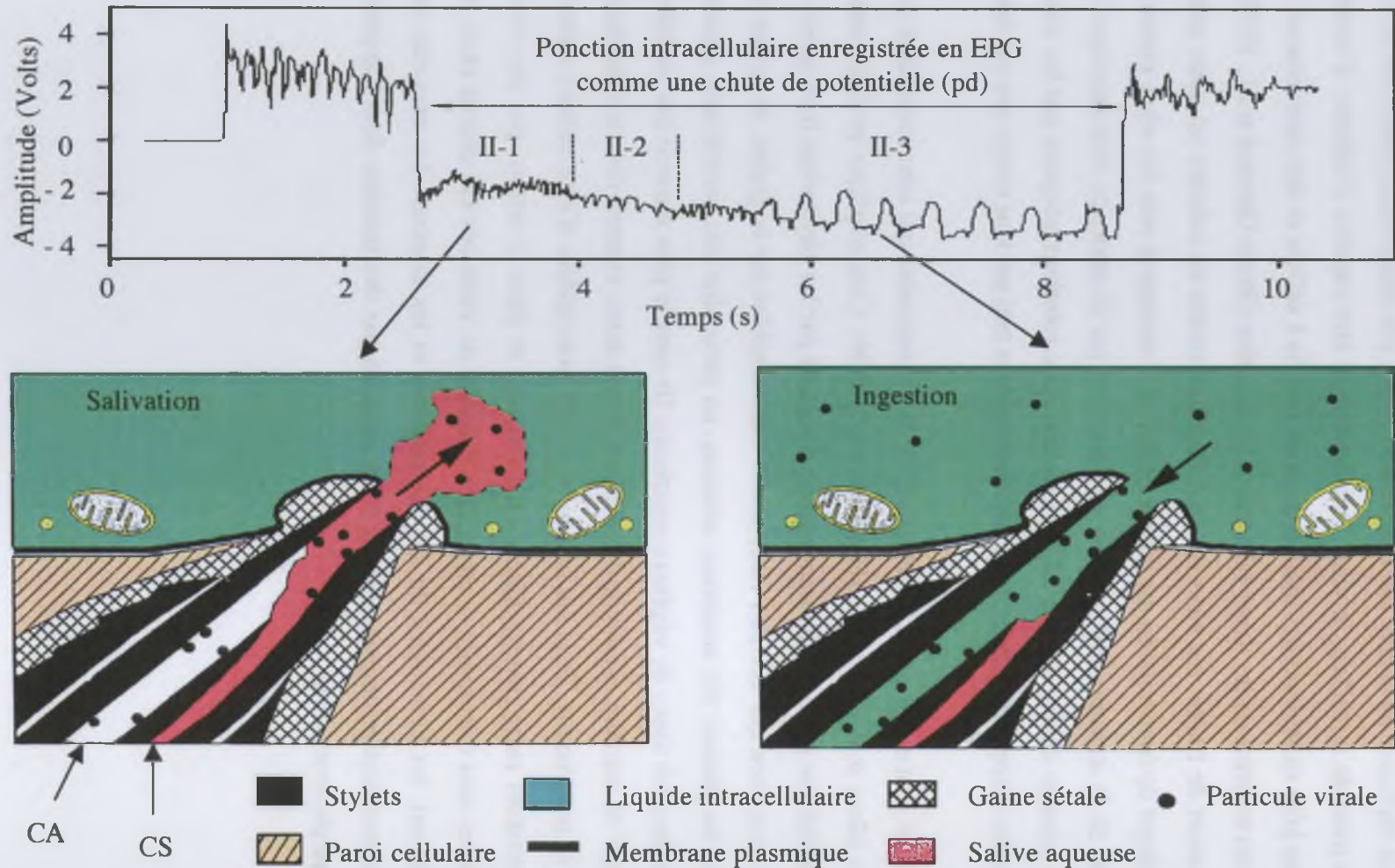


Figure 2. Chute de potentielle caractéristique, enregistrée en électropénétrographie (DC-EPG) lors d'une piqûre d'essai de *Myzus persicae* et divisée en trois sous-phases (II-1, II-2 et II-3) corrélées au mécanisme d'inoculation (encadré gauche) et d'acquisition (encadré droit) des virus non circulant non persistant (d'après Martin *et al.*, 1997). Représentation schématique d'une coupe longitudinale des stylets de l'insecte, lors d'une ponction intracellulaire dans une cellule de l'épiderme ou du mésophylle. Noter que le canal salivaire (CS) se jette dans le canal alimentaire (CA) avant l'extrémité des stylets maxillaires.

1.1. La transmission non circulante

La transmission non circulante par insecte piqueur suceur est la méthode utilisée par une grande majorité de virus de végétaux. Ce mode de transmission a été principalement décrit chez les pucerons, les aleurodes, les cicadelles et les nématodes (Hébrard *et al.*, 1999).

Un processus biologique et non mécanique.

Les virus non circulants transmis par des arthropodes et des nématodes vecteurs peuvent être subdivisés en virus semi-persistants et en virus non persistants (Nault, 1997). Cette subdivision basée sur des critères quantitatifs de persistance du virus dans l'insecte au cours du temps est encore largement utilisée aujourd'hui. Une uniformisation et une simplification de la terminologie basées sur des critères uniquement qualitatifs sont en cours (Hébrard *et al.*, 1999). En général, les virus semi-persistants tendent à être associés avec l'appareil digestif antérieur du vecteur et à être retenus plusieurs jours. L'efficacité de la transmission s'accroît lorsque la durée d'alimentation infectieuse s'allonge, suggérant que le virus est accroché de manière stable et qu'il s'accumule tant que les sites d'accrochage ne sont pas saturés. En revanche, les virus non persistants sont associés avec les stylets de leurs insectes vecteurs et ne sont retenus que quelques heures. De plus, l'efficacité de la transmission décroît en général rapidement, lorsque la durée de l'alimentation augmente, suggérant que la liaison virale est labile.

Le site d'accrochage des virus non persistant a été identifié récemment sur la partie distale des stylets maxillaires (Figure 2 ; Martin *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1996b). La rétention de virus dans cette région est fortement corrélée avec la transmission (Wang *et al.*, 1996b). Le virus peut également être observé dans la région proximale des stylets et de l'appareil digestif antérieur (Ammar *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1996b). Cependant, aucune corrélation n'a pu être identifiée entre l'accumulation de virus dans cette région et la transmission (Pirone & Thornbury, 1988).

Trois théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes de la transmission non circulante. (i) La théorie des virus des animaux, suggérant que le virus est associé de manière non spécifique avec la partie distale des stylets et qu'il est simplement inoculé dans une nouvelle plante lorsque le vecteur s'alimente. Dans ce mécanisme, le vecteur est essentiellement une « aiguille volante ». (ii) Harris (1977) proposa un mécanisme d'ingestion-égestion dans lequel les virus transmissibles adhèrent à des sites multiples le long du canal

alimentaire antérieur pendant l'alimentation. Les virus sont ensuite relargués lors de périodes de régurgitation. Dans ce mécanisme le vecteur agit comme une « seringue » plutôt qu'une « aiguille ». Cette théorie est compatible avec le fait que les pucerons effectuent un grand nombre de piqûres superficielles (piqûres d'essais), à la surface des limbes foliaires, au cours de leur recherche de nourriture. En effet, pour sélectionner ses plantes hôtes, le puceron aspire les fluides présents dans les cellules épidermiques jusqu'à ce qu'ils atteignent les organes chémorécepteurs localisés autour de la valve précibariale (McLean & Kinsey, 1984 ; Hébrard *et al.*, 1999). Si les liquides induisent une stimulation gustative, ils passent dans le cibarium avant d'atteindre l'intestin par l'intermédiaire de l'œsophage. Dans le cas contraire, les fluides seraient expulsés par le canal alimentaire. (iii) De récents travaux basés sur l'utilisation de l'électropénétrographie (EPG) comme outils d'étude du comportement alimentaire des insectes piqueur suceurs (Tjallingii, 1978), ont permis d'élaborer une troisième hypothèse : salivation-ingestion (Figure 2 ; Martin *et al.*, 1997). L'EPG a permis de diviser l'étape de piqûre d'essai des pucerons en trois phases (II-1, II-2 et II-3) (Tjallingii, 1985b). Les virus non circulants sont acquis lors d'ingestion de fluides intracellulaires au cours de la dernière sous phase II-3 (Powell *et al.*, 1995). En revanche, l'inoculation semble être réalisée lors de l'étape de salivation (sous phase II-1), précédant l'ingestion-égestion (Martin *et al.*, 1997). Comme le canal salivaire se jette dans le canal alimentaire 2 à 8 μm avant l'extrémité des stylets maxillaires, l'étape de salivation ne peut relarguer que les particules virales accrochées sur la partie distale commune aux canaux salivaire et alimentaire (Figure 2). L'autre partie du canal alimentaire, qui représente potentiellement la zone la plus importante de fixation du virus, ne peut participer à l'inoculation que par l'intermédiaire des phases d'« égestion » éventuelles. La transmission dite non persistante serait donc un phénomène rapide qui pourrait se produire lors de piqûres brèves comprenant une phase d'acquisition par ingestion sur une plante virosée et une phase d'inoculation par égestion et/ou salivation sur une plante saine (Hébrard *et al.*, 1999). Les données actuelles ne permettent pas de favoriser l'une ou l'autre hypothèse (ii ou iii). Néanmoins, dans la phase de salivation comme dans celle d'égestion, les enzymes salivaires doivent intervenir dans le décrochage du virus des sites récepteurs présents dans le canal alimentaire des stylets maxillaires. Les études les plus complètes dans la compréhension des mécanismes de transmission non circulante non persistante proviennent des travaux sur la transmission des potyvirus et des caulimovirus par pucerons (Pirone & Blanc, 1996). La spécificité de la transmission semi-persistante est

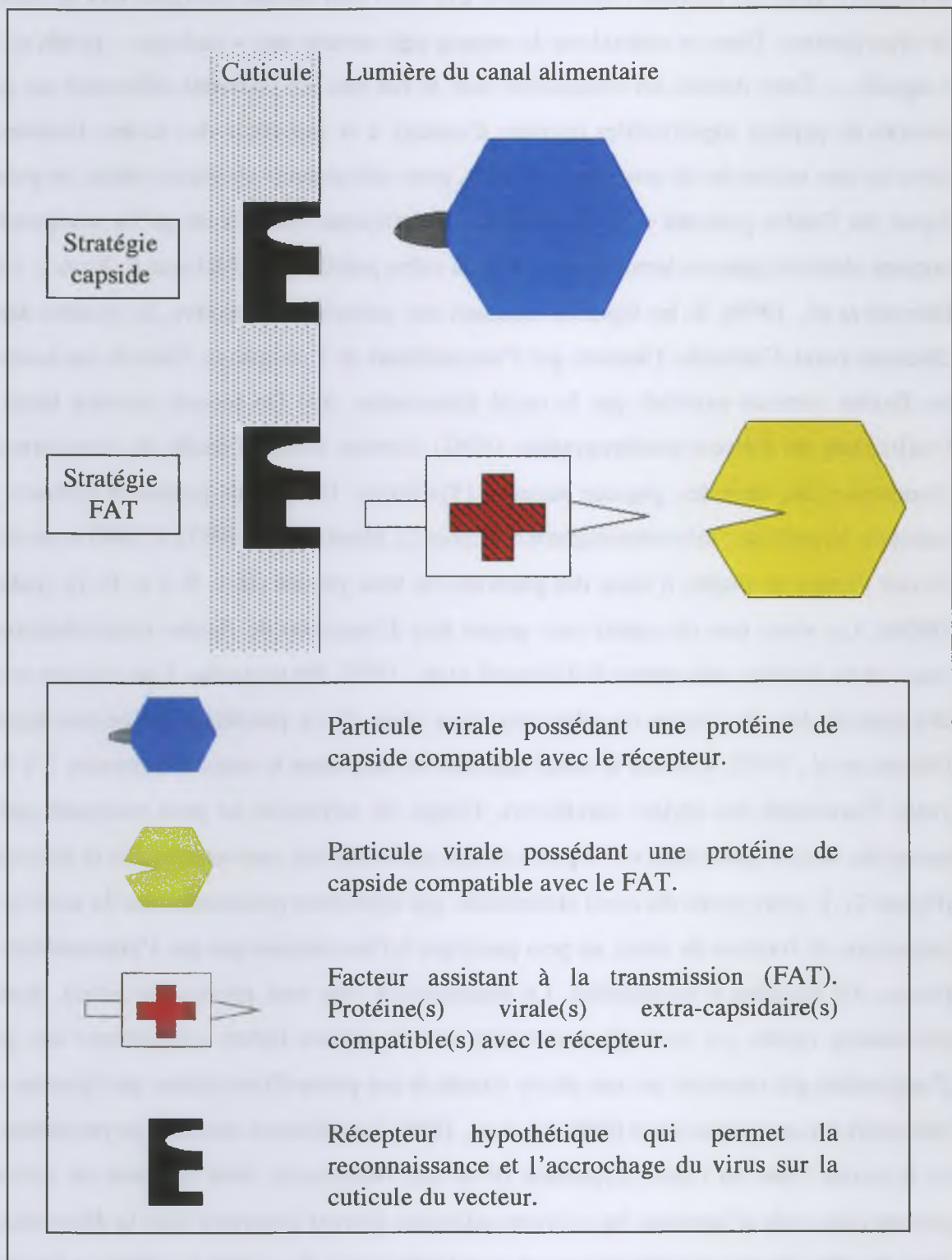


Figure 3. Les stratégies de la transmission non circulante des phytovirus par insecte vecteur de type piqueur suceur (d'après Hébrard *et al.*, 1999). Représentation schématique des interactions moléculaires entre le virus (stratégie capside ou FAT) et son vecteur.

beaucoup moins documentée. Les virus sont souvent localisés dans les vaisseaux du phloème et nécessitent des alimentations plus longues pour pouvoir être acquis par le vecteur. Ils sont le plus souvent détectés dans l'appareil digestif antérieur comportant le précibarium, le cibarium et l'œsophage. Les études de l'anatomie des pièces buccales de type piqueur suceur en MET ont permis une meilleure compréhension des structures et du mouvement des fluides alimentaires (McLean & Kinsey, 1984). Ainsi, l'égestion d'un fluide n'est possible que si celui-ci n'a pas franchi la valve précibariale. Or celle-ci sépare le canal alimentaire du cibarium (pompe alimentaire). La compréhension des mécanismes de la transmission semi-persistante reste donc problématique.

En définitive la transmission non circulante non persistante et semi-persistante n'est pas une transmission non spécifique réalisée par l'intermédiaire des stylets contaminés mais un processus biologique complexe et spécifique (Pirone & Blanc, 1996). Dans les deux cas, le virus se fixe sur des organes (stylets, tube digestif antérieur), dont les tissus sont d'origines ectodermiques et de ce fait recouverts de cuticule. Ils ne traversent aucune membrane cellulaire et se fixent sur la cuticule du vecteur, de façon externe. Cela explique en outre, pourquoi ces virus sont perdus au cours des mues.

Les progrès dans les connaissances moléculaires de l'interaction virus-vecteur et les difficultés observées dans la distinction entre virus à transmission non persistante et virus à transmission semi-persistante suggère l'abandon de la distinction basée sur un caractère quantitatif peu discriminant et l'adoption d'une dichotomie basée sur deux stratégies de transmission : la stratégie « capsidale » et la stratégie « facteur assistant à la transmission (FAT) » (Figure 3 ; Pirone & Blanc, 1996).

La stratégie Capsidale.

La transmission de virus purifié acquis sur un milieu artificiel démontre que ces particules sont capables d'interagir directement avec la cuticule du vecteur (Figure 3). Cela est le cas pour les membres des alfamovirus, des carlavirus et des cucumovirus. Le ou les seuls déterminants viraux impliqués dans la transmission de ces virus ne peuvent être qu'une ou des protéines de la capsidale. Des expériences d'hétéroencapsidation *in vitro* ont permis de transmettre l'ARN du *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV), naturellement non transmissible par pucerons, en utilisant la protéine de capsidale du *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV) pour former une particule virale chimérique. L'efficacité de la transmission du CMV est

différente selon que la capside provient de souches hautement ou peu transmissibles. Certains domaines importants de cette protéine ont été identifiés, notamment des acides aminés qui jouent un rôle dans la spécificité de vection. La stratégie de capside peut être définie comme une stratégie de transmission non circulante qui consiste à utiliser exclusivement sa protéine de capside pour interagir avec son vecteur.

La stratégie FAT.

Un grand nombre de groupes de virus, incluant notamment les potyvirus et les caulimovirus, nécessitent dans le cadre de leurs vections une ou des protéine(s) non structurale(s) codée(s) par le virus et nommée(s) facteur assistant (FAT) ou facteur « helper » à la transmission (Figure 3). L'implication de tels facteurs a été mise en évidence par la non transmission de virus purifié acquis sur membrane de paraffine. En revanche, l'ingestion d'un mélange de broyat de plante virosée, préalablement dépouillé de ses particules virales, et de virus purifié permet la transmission. L'extrait de plante saine mélangé à du virus purifié ne permet pas d'obtenir une transmission. Certains virus ont besoin d'autres virus, dits assistants, pour être transmis. Cependant dans les différents modèles connus, on ne sait pas si c'est la particule virale assistante qui est requise ou si c'est uniquement le facteur assistant qui est nécessaire. En plus de leurs fonctions dans la transmission virale, les facteurs assistants ont d'autres fonctions dans le cycle viral. Le facteur assistant des potyvirus (HC-Pro) intervient dans la maturation de la polyprotéine virale, dans le mouvement du virus dans leurs plantes hôtes, dans la réplication virale et dans la suppression de l'extinction post-traductionnelle des gènes (Maia *et al.*, 1996 ; Voinnet *et al.*, 1999). Le facteur assistant des caulimovirus peut s'associer aux microtubules, suggérant un rôle dans le mouvement du virus dans leurs plantes hôtes (Blanc *et al.*, 1996). Bien qu'il existe plusieurs hypothèses vis à vis du rôle du facteur assistant dans les interactions virus-vecteur (Gray, 1996 ; Pirone & Blanc, 1996), celle qui semble la plus plausible et la plus communément admise sera discutée ici. Il s'agit de l'hypothèse du « pont » qui suppose que le FAT joue le rôle de ligand entre le virus et le vecteur.

Ammar *et al.* (1994) ont montré au niveau ultrastructural, que les potyvirus lors d'une alimentation artificielle par des pucerons, en présence de FAT, sont associés à l'épicuticule par l'intermédiaire d'une matrice. Le virus n'est pas retenu et la matrice est absente lorsque les pucerons s'alimentent uniquement de potyvirus. Des études d'immunomarquage ont

démontré que la protéine d'assistance est associée à la persistance du virus dans la matrice. Des évidences directes des interactions entre le virus, le facteur assistant et le puceron nous proviennent de l'identification de domaines spécifiques qui sont requis à la transmission virale par puceron. Un tel domaine, proche de l'extrémité N-terminale et constitué du motif DAG (acide aspartique-alanine-glycine), a été détecté sur la protéine de capsid des potyvirus. Des mutations au sein ou adjacentes à ce motif empêchent la liaison *in vitro* entre le virus et son facteur assistant et bloquent la transmission d'un certain nombre de potyvirus (Pirone & Blanc, 1996 ; Blanc *et al.*, 1997). Récemment, Wang *et al.* (1996b) ont observé, par marquage radioactif des virus, que les mutations sur le motif DAG de la protéine de capsid agissent sur la rétention virale au niveau du canal alimentaire des stylets. Ils ont montré que les mutations dans cette région bloquent la transmission et l'accumulation virale dans les stylets. De même, des mutations à l'intérieur ou proche des motifs N-terminal KITC (lysine-isoleucine-thréonine-cystéine) et C-terminal PTK (proline-thréonine-lysine) du facteur assistant des potyvirus rendent le virus non transmissible par son vecteur naturel (Huet *et al.*, 1994 ; Atreya *et al.*, 1995 ; Pirone & Blanc, 1996). La mutation spécifique de la séquence KITC en EITC abolit la transmission virale mais n'affecte pas l'accrochage *in vitro* du virus sur le facteur assistant. De plus, le virus n'est plus observé dans les stylets lorsqu'il est acquis avec le facteur assistant mutant EITC. Ces données indiquent que les fonctions du motif KITC dans les interactions facteur assistant-puceron, interviennent spécifiquement dans la rétention du virus à la surface de l'épicuticule des stylets. Des mutations dans le motif PTK inhibent les interactions *in vitro* entre le virus et le facteur assistant. Des mutations dans ce domaine empêcheraient la dimérisation des facteurs assistants sous sa conformation active. L'ensemble de ces résultats supportent l'hypothèse que le facteur assistant des potyvirus agit comme un pont, permettant aux virus de s'accrocher sur les stylets des pucerons.

D'autres observations supportent indirectement les fonctions de « pontage réversible » des FAT, comme ceux obtenues par l'analyse des FAT du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). En effet, le CaMV requiert l'assistance de deux protéines virales, les protéines P2 (18 kDa) et P3 (15 kDa) pour une transmission efficace par pucerons (Leh *et al.*, 1999). La protéine P2 du complexe FAT du CaMV s'accumule sous forme de paracristaux dans le cytoplasme des cellules de plantes infectées à partir desquels la forme active du FAT est solubilisée (Blanc *et al.*, 1993). La structure tridimensionnelle de la protéine P2 indique un domaine en feuillet β N-terminal et une hélice α C-terminale. La protéine P3 forme un pont entre le domaine C-

terminal de la protéine P2 et la particule virale (Leh *et al.*, 1999). Comme les régions NH₂ et COOH terminales de la protéine P3 sont engagées respectivement dans les interactions avec la protéine P2 et la capside virale, l'extrémité NH₂ de P2 pourrait être impliquée dans l'interaction avec un récepteur putatif chez l'insecte vecteur.

L'implication d'un FAT a été démontrée et suggérée pour un certain nombre d'autres virus non circulants transmis par insectes et nématodes. On ne sait pas si les FAT des autres familles virales fonctionnent de la même manière que les FAT des potyvirus et des caulimovirus, et si l'hypothèse du « pontage réversible » est applicable. Le fait commun à l'ensemble de ces virus « helper » dépendants, est que les particules virales sont imprégnées dans une matrice semi-opaque associée à l'épicuticule de la partie distale du canal alimentaire (Ammar *et al.*, 1994 ; Brown *et al.*, 1995a). L'origine et la composition de cette matrice sont inconnues. Cependant, l'ensemble des données actuelles suggèrent l'implication des protéines FAT.

1.2. La transmission circulante : Article N°1 soumis à la revue *Virologie*

Les mécanismes de la transmission circulante des virus de végétaux par insectes piqueur suceurs

J.M. Lett¹

B. Reynaud²

M. Peterschmitt¹

CIRAD-AMIS, ¹Laboratoire de Virologie, TA 40/02, 34398 Montpellier Cedex 5, ²Pôle de Protection des Plantes, 97410 Saint-Pierre, Ile de La Réunion.

Tirés à part : M. Peterschmitt ; E-mail : peterschmitt@cirad.fr

Résumé. La plupart des virus de plante ont développé des interactions avec des organismes tiers pour leurs transmissions. Selon le degré d'interaction avec ces organismes appelés vecteur, on distingue la transmission circulante dans laquelle le virus traverse le corps du vecteur avec des passages trans-membranaires, de la transmission non circulante où le virus s'adsorbe sur la cuticule du vecteur. La présente revue fait le point sur les connaissances dans le domaine de la transmission circulante des phytovirus, en se limitant au vecteur de type insecte piqueur suceur. Dans la plupart des cas, le virus ne se multiplie pas dans son vecteur. Son adaptation à l'insecte consiste à franchir un certain nombre de barrières et à résister aux conditions hostiles de l'intestin, de l'hémolymphe et des glandes salivaires. Chez certains virus, apparentés à des virus animaux, cette adaptation au vecteur est encore plus grande car ils sont capables de s'y multiplier.

Mots clés : *Phytovirus – Transmission circulante – Vecteurs – Arbovirus.*

Summary. Most of the plant viruses have developed interactions with other organisms for their transmission. According to the level of interactions with these organisms called vectors, one distinguish the circulative transmission where viruses are crossing the body of the vector through cellular membranes, from the non circulative transmission where viruses are adsorbed onto the vectors cuticles. The present review is dealing with circulative transmission of plants viruses but focused on piercing sucking insect vectors. In most of the cases, viruses do not replicate in their vectors. Their adaptation to the vector consist to cross barriers and to withstand to the hostile conditions of the gut, the hemolymph and the salivary glands. For

some viruses, related to animal viruses, adaptation to vector is even higher, because they are able to multiply in their insect.

Key words : *Phytoviruses – Circulative transmission – Vectors – Arboviruses.*

Presque un millier d'espèces de virus de plantes ont été décrites dans la littérature, dont la plupart sont dépendantes d'organismes vecteurs pour leur transmission de plante à plante [1]. Les virus de plantes ont élaboré un grand nombre d'associations biologiques avec leurs vecteurs, qui peuvent être des arthropodes, des nématodes ou des champignons.

En ce qui concerne les virus transmis par insectes piqueur suceurs, les virologistes végétaux les avaient classé selon la durée des étapes de leur cycle de transmission par vecteur (pour revues [2, 3]). Cette classification qui tient compte de critères quantitatifs, permet de distinguer les virus non persistants, dont la période de rétention dans leur vecteur est de quelques minutes à quelques heures, les virus semi-persistants dont la période de rétention est de quelques heures à quelques jours, et les virus persistants dont le vecteur reste généralement infectieux à vie, après une acquisition virale. Les virus non persistants et semi persistants sont acquis et peuvent être inoculés en l'espace de quelques secondes à quelques minutes. Ils ne nécessitent pas de période de latence (temps minimum entre l'ingestion de virus et le moment où le vecteur est capable d'infecter une nouvelle plante) et ne se répliquent pas dans leur vecteur. Les virus persistants au contraire sont transmis après une période de latence de quelques heures à plusieurs jours. L'accumulation de nouvelles données sur les mécanismes de transmission, permet de proposer une nouvelle classification basée sur des critères qualitatifs (pour revues [2, 3]). Les virus non persistants sont associés à l'épicuticule des stylets et les virus semi-persistants à la partie antérieure du système digestif (valve précibariale et pompe cibariale). Etant donné que l'épicuticule des stylets et la partie antérieure du système digestif font partie de la cuticule, ces virus sont perdus à chaque mue. Ils sont référencés comme non circulant car ils ne traversent aucune membrane cellulaire et ne pénètrent pas dans l'hémolymphe de l'insecte vecteur. Les virus persistants au contraire, sont transmis selon le mode circulant car ils sont internalisés après ingestion et ne sont pas perdus au cours des mues. Ils traversent plusieurs membranes cellulaires, celles de l'épithélium intestinal pour se retrouver dans l'hémolymphe de l'insecte, et celles des glandes salivaires qui permet leur évacuation par salivation dans une plante hôte. Ces virus, à présent regroupés sous la désignation « virus circulants », peuvent être séparés en deux groupes, les virus multipliants,

capables de se répliquer dans leurs insectes vecteurs, et les virus non multipliants, qui ne s'y répliquent pas. Pour les virus non multipliants, l'insecte vecteur n'est qu'un véhicule pour aller d'une plante à une autre. Cependant, comme le suggère la transmission spécifique de ces virus par certaines espèces seulement d'insectes vecteurs, les interactions virus-vecteurs exigent des phénomènes de reconnaissances spécifiques. Cette nouvelle classification, issue des études sur les pucerons et les cicadelles, vecteurs de la plupart des phytovirus, pose quelques problèmes pour des vecteurs étudiés postérieurement. C'est le cas, des nématodes, des champignons et de certains arthropodes, tel que les coléoptères pour lesquels la classification est inadéquate [4]. Cependant, malgré l'existence de certaines variantes, la terminologie « non circulante » et « circulante » est aujourd'hui largement admise, car elle est simple et a l'avantage de s'appliquer aux virus des végétaux et des animaux (pour revues [2, 3]).

Les virus de plante transmis selon le mode circulant par insectes vecteurs sont responsables de nombreuses maladies d'importance économique. De même les arbovirus (arthropods born viruses), virus d'animaux transmis selon le mode circulant multipliant par arthropode, sont à l'origine de la plupart des nouvelles maladies virales létales chez l'Homme. Pourtant malgré l'importance de ces maladies et en dépit d'une importante littérature concernant les multiples associations entre les virus et les arthropodes, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent les processus de transmission et qui déterminent leur efficacité, commencent seulement à être compris. Les avancées de la biologie moléculaire et la possibilité de manipuler génétiquement les virus, les plantes, et depuis peu les insectes, favorisent l'étude des mécanismes de la transmission des virus. Les virologistes animaux et les entomologistes du monde médical ont focalisé leurs efforts sur la compréhension des paramètres physiologiques et génétiques des insectes qui influencent la réplication, la survie et la transmission des virus, car la grande majorité des virus animaux transmis par arthropodes, infectent leurs vecteurs en s'y multipliant. Inversement, la plupart des virus de plantes transmis par insecte ne se répliquant pas dans leurs vecteurs, les principales recherches ont consisté à analyser les interactions moléculaires entre le virus et le vecteur.

L'objet de cette revue bibliographique, essentiellement basée sur celles de Gray et Banerjee [5], Van den Heuvel *et al.* [6] et Hébrard *et al.* [2], est de décrire l'état actuel des recherches dans le domaine des insectes qui transmettent des virus de plantes, selon le mode circulant. Dans un premier temps, nous rappellerons la spécificité du comportement et des mécanismes

alimentaires des insectes piqueur suceurs, principaux organismes impliqués dans la transmission des virus. Deuxièmement, nous présenterons les données actuelles concernant la transmission circulante non multipliante chez deux familles virales pour lesquelles ce mode de transmission est le mieux connu : les *Luteoviridae* et les *Geminiviridae*. Enfin, la transmission multipliante sera abordée au niveau de la compétence de l'insecte vecteur à transmettre un virus et au niveau de la compétence du virus à être transmis par un insecte vecteur. Dans ce dernier chapitre, des analogies et des comparaisons seront effectuées avec les arbovirus.

Le comportement et les mécanismes alimentaires des vecteurs

Les pièces buccales de la plupart des arthropodes et nématodes, vecteurs de virus, témoignent d'un mode d'alimentation de type piqueur suceur [5]. Ce type morphologique est commun aux insectes qui s'alimentent de contenus cellulaires et surtout de sève phloémienne, tels que les pucerons, les aleurodes, les cicadelles et les delphacides, ou de sang tels que les moustiques et les tiques hématophages [6]. Leurs stylets leur permettent de pénétrer dans les tissus et de traverser les parois cellulaires et les membranes cytoplasmiques par l'intermédiaire de forces mécaniques et/ou avec l'aide d'enzymes salivaires et intestinales [5]. C'est au cours des périodes d'alimentation comportant des phases d'ingestion et de salivation, qu'ils acquièrent et inoculent respectivement les particules virales.

Le comportement alimentaire de la plupart des arthropodes vecteurs de phytovirus conditionne la transmission virale de plante à plante. L'acceptation ou le refus d'une plante hôte par les pucerons est majoritairement déterminé par de brèves piqûres superficielles dans l'épiderme des plantes. Ces piqûres d'essais représentent une étape privilégiée pour la transmission des virus selon le mode non circulant. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire que la plante soit hôte du vecteur pour que le virus puisse établir une infection. Si la plante est reconnue comme hôte, le vecteur peut engager une alimentation prolongée au cours de laquelle les virus circulants sont généralement transmis (Fig. 1). Dans ce cas, la gamme d'hôte du virus est comprise dans celle du vecteur. Les virus circulants ne sont généralement transmis que par une ou quelques espèces d'un même genre. Cette spécificité, ainsi que la persistance du virus chez son vecteur, suggèrent l'existence d'une association intime, dans laquelle à la fois les protéines codées par le virus et les composants du vecteur sont impliqués. L'identification des déterminants impliqués dans les différentes phases du processus de transmission représente une thématique

de recherche nouvelle, en plein développement. Les résultats de ces recherches seront évoqués plus en avant.

La transmission circulante

Les virus circulants des plantes sont transmis par des arthropodes ; aucune transmission circulante n'a été observée pour les nématodes (Tableau I). Elle consiste en une internalisation des virus au travers de membranes cellulaires de leurs vecteurs. Cette internalisation nécessite l'interaction physique entre une particule virale et un récepteur membranaire qui aboutit, soit à un phénomène d'endocytose « récepteur-dépendant », généralement par l'intermédiaire de vésicule à clathrine, comme cela a été proposé pour les lutéovirus et les polérovirus [7], soit dans le cas de virus enveloppés, à la fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire [8]. Basé sur des observations réalisées en microscopie électronique, ce dernier mécanisme a été proposé pour les bunyavirus. On peut noter que les phytovirus non multipliants possèdent une capsid simple (1 ou 2 protéines structurales), alors que les virus multipliants végétaux ou animaux sont généralement enveloppés ou présentent une capsid complexe, formée d'au moins trois protéines distinctes. La très grande majorité des arbovirus sont des virus circulants multipliants alors que la plupart des phytovirus circulants sont non multipliants. Les virus multipliants ont été décrits chez deux genres de virus de plantes, les *Tenuivirus*, les *Marafivirus*, et chez trois familles contenant des virus animaux et végétaux, les *Reoviridae*, les *Rhabdoviridae* et les *Bunyaviridae* (Tableau I). Les virus non multipliants sont regroupés au sein des familles *Luteoviridae* et *Geminiviridae*, et des genres *Nanovirus* et *Umbravirus* (Tableau I). Les principaux résultats obtenus pour la transmission circulante non multipliante nous viennent des virus de la famille *Luteoviridae* et, dans une moindre mesure, des virus de la famille *Geminiviridae*, pour laquelle les mécanismes de la transmission ne sont pas encore clairement définis et seront discutés séparément.

Le mouvement des virus circulants à travers les arthropodes vecteurs est globalement le même pour les virus animaux et végétaux. Après ingestion, les virions sont internalisés par les cellules épithéliales de l'intestin moyen ou postérieur. Les particules virales sont ensuite relarguées dans l'hémolymphe, d'où ils peuvent infecter d'autres tissus dans le cas des virus multipliants. Enfin, les virions pénètrent dans les glandes salivaires pour être relargués via le canal salivaire dans un nouvel hôte, lors des phénomènes de salivation qui accompagnent

l'alimentation. Chez les arbovirus, il a été montré que la transmission pouvait être activée par la salive, grâce à des matières actives qui sont relarguées avec le virion dans le système sanguin de l'hôte. Ces substances ont des propriétés vasodilatatrices, anticoagulantes et de suppression des mécanismes de défense. Parallèlement, certaines observations suggèrent que l'étape de salivation intervient dans l'inhibition des mécanismes généraux de défense des plantes [9]. En effet, les premières études du comportement alimentaire de pucerons vecteurs de virus par électropénéтроgraphie (EPG), en relation avec la résistance des plantes à la transmission virale, ont montré que la résistance s'accompagne le plus souvent d'une augmentation ou d'une réduction de la phase E1 (phase de salivation sans ingestion) et du non passage en phase E2 (phase d'ingestion phloémienne)[9, 10]. Klinger *et al.* [10], propose que l'arrêt d'une alimentation en phase E1 traduit l'incapacité de l'insecte à déjouer les mécanismes de résistance de la plante. Cependant, aucune étude n'a montré de lien direct entre la salivation et une infection virale facilitée.

La transmission circulante non multipliante


Luteoviridae

Les virus appartenant à la famille *Luteoviridae* sont transmis par pucerons selon le mode circulant non multipliant. Chaque espèce virale est transmise efficacement par une ou, tout au plus, quelques espèces de pucerons. Les études ultrastructurales effectuées sur des virus des genres lutéovirus et polérovirus ont montré que les virions ne sont pas détruits ou inactivés dans le tractus intestinal, mais qu'ils pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen [11] ou de l'intestin postérieur [7], par endocytose récepteur-dépendant (Fig. 1). Ils sont transportés à travers le cytoplasme par l'intermédiaire de vésicules d'endocytoses qui en fusionnant avec la membrane basolatérale, les libèrent dans l'espace formé par la membrane plasmique et la lamelle basale, et de là vers l'hémolymphe. L'hémolymphe agirait comme un réservoir à l'intérieur duquel les particules virales sont retenues sous forme infectieuse sans réplication [12, 13]. Dans la plupart des combinaisons -isolat viral / espèce de puceron- étudiées, le virus se retrouve dans l'hémolymphe qu'il soit transmissible ou non [14]. C'est pour cela, que la paroi intestinale ne semble pas représenter une barrière majeure à l'acquisition des virus de la famille *Luteoviridae*. Il faut cependant noter que d'autres virus, morphologiquement similaires, ne sont pas capable de franchir la paroi intestinale [14]. Les

virus de la famille *Luteoviridae* sont capables de survivre dans l'hémolymphe des pucerons malgré les réponses immunitaires des insectes, potentiellement capables de neutraliser une invasion virale. Les mécanismes potentiels impliqués dans la préservation des virions seront discutés plus en avant.

Les glandes salivaires des pucerons sont constituées de deux glandes salivaires principales (GSP) et de deux glandes salivaires accessoires (GSA). Les GSP sécrètent les protéines impliquées dans la construction de la gaine sétale et les enzymes qui interviennent dans l'oxydation et l'hydrolyse de ces protéines, alors que les GSA produisent de manière intensive des sécrétions aqueuses contenant peu ou pas d'enzymes. Les virus de la famille des *Luteoviridae* s'associent exclusivement avec les GSA et plus spécifiquement avec leurs parties antérieures. Les fortes invaginations de la membrane plasmique apicale des cellules des GSA est compatible avec un transport rapide de l'eau et des ions. Les GSA fonctionneraient comme un organe diurétique jouant un rôle dans l'élimination du matériel cireux, provenant de la dégradation des cellules graisseuses présentes dans l'hémolymphe. Des études effectuées sur les glandes salivaires des tiques ont montré qu'elles joueraient un rôle dans l'élimination des substances reconnues comme étrangères dans l'hémolymphe, et que cela pourrait contribuer aux mécanismes immunitaires des tiques [15]. Il est possible que les virus de la famille *Luteoviridae* aient évolué de manière à utiliser des voies d'excrétions de l'insecte, leur permettant d'accéder au canal salivaire. Les observations ultrastructurales indiquent que le passage des lutéovirus et des polérovirus à travers les GSA est similaire au passage à travers l'intestin moyen et postérieur, faisant intervenir un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant. L'incapacité de certains isolats viraux à pénétrer les GSA des pucerons suggère qu'elles interviennent dans la spécificité de vection. De récents travaux concernant la transmission de différentes combinaisons -isolats de *Luteoviridae* / espèces de pucerons- ont montré que la lamelle basale et la membrane plasmique basale des GSA fonctionnent comme des barrières indépendantes [14, 16, 17].

Les protéines des virus de la famille *Luteoviridae* impliquées dans la transmission par pucerons ont montré des caractéristiques communes au niveau moléculaire. Divisés en trois genres taxonomiques sur la base de leur organisation génomique, les virus de la famille *Luteoviridae* ont cependant en commun l'arrangement de trois de leurs cadres ouverts de lecture (ORF), dont deux codent pour les protéines de structure. La coque protéique virale est composée d'une protéine de capsid (CP) prédominante de 22 à 24 kDa, et d'une protéine

mineure (readthrough=RT) plus grande, obtenue par translecture du codon stop de la protéine de capsid. La taille de la protéine de translecture (RT) est de 72 à 74 kDa, mais la portion C-terminale du domaine de translecture (readthrough domain=RTD) présente un site de coupure protéolytique pour former un composé protéique de 55 à 58 kDa, généralement associé aux extractions de virus purifié [18, 19]. On ne sait pas si ce processus existe en conditions *in vivo*. Cependant, il a été montré que les virus purifiés et les virus obtenus par clonage d'ADN complémentaire de virus qui ne possèdent pas la partie C-terminale du RTD, sont transmissibles [20]. Aucun facteur assistant non structural intervient dans le processus de transmission par pucerons des virus de la famille *Luteoviridae*. On peut noter que la RT du *Pea enation mosaic enmovirus* ARN-1 (PEMV-1) est plus petite que son homologue des lutéovirus et des polérovirus. La RT n'est pas requise pour l'assemblage des particules ou pour l'infection des plantes [19], mais les particules qui ne contiennent pas de RT ne sont pas transmissibles par les pucerons [13, 18, 21]. Cette observation semblait indiquer que la RT est un facteur nécessaire du phénotype « transmissible par puceron ». Cependant, les virions sans RT, ingérés par des pucerons vecteurs ou non vecteurs, ont été détectés dans leur hémolymphe, indiquant que la CP semble contenir à elle seule tous les déterminants impliqués dans l'internalisation et le passage à travers la paroi intestinale [21]. Etant donné que l'intestin ne semble pas contribuer de façon significative à la spécificité de transmission des virus de la famille *Luteoviridae* par vecteur, les domaines conservés de leur CP sont autant de candidats pour servir de médiateur dans l'accrochage et le transport du virus à travers le tractus intestinal des pucerons. 

L'expression, par baculovirus en cellule d'insecte, du gène de la CP de plusieurs virus de la famille *Luteoviridae*, a permis d'obtenir des pseudo-particules virales [22]. Après purification, ces particules ont été données en alimentation à des pucerons par l'intermédiaire d'une membrane de paraffine ou injectées directement dans leurs hémolymphe. Les études structurales ont montré que les particules ingérées traversent la paroi intestinale, et sont observées dans les cellules des glandes salivaires accessoires et dans le canal salivaire [23]. Les résultats sont compatibles avec les études précédentes, montrant que la RT n'est pas requise pour le passage à travers l'intestin, mais contraste avec l'hypothèse que la RT détermine la spécificité du vecteur, en régulant le transport du virus à travers les glandes salivaires accessoires. Quelle est alors la fonction du domaine de translecture dans le processus de transmission par pucerons ?

Récemment encore, on supposait que les seules barrières impliquées dans la transmission des virus de la famille *Luteoviridae* étaient de nature membranaire, au niveau des épithéliums intestinaux et des glandes salivaires accessoires. Cette compréhension des interactions virus/pucerons, négligeait cependant le système immunitaire des insectes. Or, les études du système immunitaire des insectes montrent que l'hémolymphe est un environnement hostile aux pathogènes et que des mécanismes de défense semblent actifs dans un grand nombre d'insectes, comprenant les homoptères [24]. Aussi, malgré le peu d'études qui ont porté sur le système immunitaire des pucerons, on peut penser que les virus de la famille *Luteoviridae* ont développé un mécanisme pour déjouer cette défense immunitaire et que ce mécanisme pourrait être lié à la protéine de translecture.

Intervention de bactéries endosymbiotiques. Les pucerons comme l'ensemble des homoptères, hébergent des bactéries endosymbiotiques, dans des cellules spécialisées au sein de l'abdomen, nommées mycétocytes. Ces bactéries fournissent les acides aminés essentiels que le puceron n'est pas capable de synthétiser mais seraient également impliquées dans d'autres fonctions qui ne sont pas encore élucidées [25]. En outre, les bactéries produisent de très fortes quantités d'une protéine nommée symbionine, homologue de la protéine chaperone GroEL d'*Escherichia coli* [25, 26]. GroEL est un oligomère de 840 kDa qui comporte 14 sous-unités identiques de 60 kDa chacune. Les protéines chaperones interviennent généralement dans la maturation des protéines, leurs translocations à travers les membranes et la 'récupération' suite à un stress. Cependant, le rôle de la symbionine dans le métabolisme du puceron est inconnu. Elle est produite et stockée exclusivement dans les mycétocytes, et est rarement exportée dans l'hémolymphe du puceron [27]. La détection de symbionines dans l'hémolymphe des pucerons [12], est très probablement liée à une dégradation des endosymbiotes et des mycétocytes lors des phénomènes de vieillissement des pucerons [25].

Il a été montré que les sous-unités ainsi que la protéine native de 14 sous-unités sont capables de se lier *in vitro* à des virions de la famille *Luteoviridae* ou à des protéines RT recombinantes [26, 12, 13, 28]. Lorsque les pucerons sont débarrassés de leurs endosymbiotes par un traitement aux antibiotiques, leur capacité à transmettre du virus est significativement réduite et la quantité de protéines de capsid détectée dans les pucerons est diminuée. De façon étonnante, la quantité de RT n'est pas affectée [13, 28]. Cependant, les résultats de ces expériences doivent être interprétés avec précautions, car la destruction des endosymbiotes a certainement des effets dramatiques sur le métabolisme interne et la physiologie des pucerons.

On a pu montrer l'existence d'une affinité différentielle des virions de six virus de la famille *Luteoviridae* avec le GroEL d'*E. coli* ainsi qu'avec des homologues de GroEL provenant de pucerons vecteurs et non vecteurs [13]. La capacité de liaison n'était pas corrélée à la capacité ou à l'efficacité de la transmission, ce qui suggère que si les symbionines jouent un rôle dans la transmission, elles n'interviennent pas dans la spécificité du vecteur. Une analyse de la capacité de liaison symbionine/virion testée *in vitro* avec une série de mutants viraux contenant des délétions dans la RT, indique que la partie N-terminale du RTD contient les déterminants de l'interaction protéique. Les virions qui ne contiennent pas la RT, ne se lient pas à la symbionine en conditions *in vitro* et persistent moins longtemps dans l'hémolymphe des pucerons que la souche sauvage de virus [13]. La capacité de GroEL à interagir avec des virions de la famille *Luteoviridae* réside dans les régions N-terminale (acides aminés 1 à 121) et C-terminale (acides aminés 409 à 474) du domaine équatoriale de GroEL [29]. Ces régions sont très conservées chez tous les homologues de GroEL du genre *Buchnera*, qui sont capables de s'associer à la plupart des virus de la famille *Luteoviridae* [13].

L'ensemble de ces études suggèrent l'existence d'une interaction spécifique entre les virus de la famille *Luteoviridae* et les homologues de GroEL des pucerons, qui aurait une influence sur la stabilité des virions dans l'hémolymphe des pucerons [12, 13]. Les mécanismes de dégradation des virus dans l'hémolymphe sont inconnus. On ne sait pas non plus si la liaison entre les symbionines et le virus protège la particule virale des mécanismes de reconnaissance du système immunitaire des pucerons, ou si elle facilite l'interaction du virus avec les glandes salivaires accessoires.

Identification de récepteurs membranaires. Plusieurs protéines de pucerons, avec des masses moléculaires de 31 à 85 kDa, ont montré des capacités d'interactions avec des lutéovirus purifiés, en conditions *in vitro* [30]. Ainsi, le *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) présente de fortes affinités avec des protéines de 31 et 44 kDa, extraites des pucerons vecteurs *Sitobion avenae* et *Schizaphis graminum* [30]. Cette interaction n'est pas observée avec *Rhopalosiphum padi*, non vecteur du BYDV. Les antisérums spécifiques de ces deux protéines réagissent spécifiquement avec des extraits des glandes salivaires des pucerons vecteurs, suggérant que ces protéines semblent impliquées dans la reconnaissance spécifique des lutéovirus par les GSA.

Geminiviridae

Contrairement aux virus de la famille *Luteoviridae* qui sont tous transmis par pucerons, quel que soit le genre viral, les virus de la famille *Geminiviridae* sont transmis par différents homoptères selon le genre auquel ils appartiennent (Tableau 1). Les virus faisant partie du genre *Mastrevirus* sont transmis par plusieurs genres de cicadelles (*Auchenorrhyncha* : *Cicadellidae*). Les virus du genre *Curtovirus* sont transmis par des cicadelles (*Auchenorrhyncha* : *Cicadellidae*) et des membracides (*Auchenorrhyncha* : *Membracidae*). Les virus du genre *Begomovirus* sont exclusivement transmis par des aleurodes du genre *Bemisia* (*Sternorrhyncha* : *Aleyrodidae*). Les virus de la famille *Geminiviridae* sont des virus à ADN simple brin circulaire, dont les capsides sont formées de deux particules quasi-icosaédriques. Les extraits contenant des particules virales en doublets sont infectieux, alors que les préparations ne contenant que des particules icosaédriques simples ne le sont pas. Chaque doublet renferme un seul exemplaire d'ADN circulaire simple brin. La plupart des particules de géminivirus sont facilement endommagées et disloquées, si elles ne sont pas maintenues dans des conditions contrôlées et spécifiques à chaque virus. Le maintien de leur structure semble dépendant de l'interaction entre la coque protéique et l'acide nucléique [31]. Aucune structure icosaédrique vide n'a été décrite chez les géminivirus. Cette observation suggère que les interactions protéine/protéine de la capside des géminivirus ne sont pas aptes à conférer une stabilité suffisante à ce type de particule [31]. Dans la sève élaborée, le pouvoir infectieux des particules virales est assez faible et disparaît après une incubation à 55°C pendant dix minutes. Malgré cette faible stabilité apparente, la majorité des géminivirus persiste pendant de nombreux jours voir plusieurs semaines dans leurs vecteurs, alors qu'aucune multiplication virale n'a jamais été décrite. De ce fait, la transmission des géminivirus a été classée comme circulante non multipliante.

La protéine de capside (CP) semble être le seul déterminant de la transmission pour les virus transmis par aleurodes [32] et par cicadelles [31]. L'échange du gène de la CP de l'*African cassava mosaic begomovirus* (ACMV) avec celui du *Beet curly top curtovirus* (BCTV) montre que seule la CP est impliquée dans la reconnaissance moléculaire du virus par son vecteur [33]. En effet, l'ACMV ainsi modifié n'est plus transmis par aleurode mais par une cicadelle, vecteur naturel du BCTV. Cette propriété a été associée à l'extrémité N-terminale de la protéine de capside d'*Abutilon mosaic begomovirus* (AbMV). L'analyse génétique de l'ACMV montra que le composant génétique B (ADN-B) contribue à l'efficacité de la

transmission car il détermine la répartition du virus dans la plante pour permettre son acquisition par le vecteur [34].

L'utilisation de systèmes d'alimentation artificielle sur membrane a permis de montrer, que les cicadelles [31] et les aleurodes [35], doivent acquérir du virus purifié dont les particules virales sont intactes pour que la transmission soit possible. Des virions dont la coque protéique a été altérée par des traitements aux UV, des ADN simple brin nus ou des ADN double brins clonés ne sont pas transmis. Les suppositions qui ont été faites sur les mécanismes de transmission circulante des géminivirus par les cicadelles et les aleurodes sont pour le moment une transposition des connaissances obtenues sur la transmission circulante des virus de la famille *Luteoviridae* par puceron. Les recherches en cours visent à évaluer dans quelle mesure une telle extrapolation est permise et à identifier d'éventuelles spécificités de la transmission des géminivirus.

La plupart des études ont été conduites sur la transmission des bégomovirus par *Bemisia tabaci*. Les premiers travaux d'immunomarquage en microscopie photonique du *Squash leaf curl virus* (SLCV), du *Tomato mottle virus* (ToMoV) et du *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) dans leur vecteur *B. tabaci* indiquent que le virus est présent dans les différents compartiments impliqués dans la transmission circulante [36]. Cependant, contrairement aux virus de la famille *Luteoviridae* aucun détail ultrastructural n'a été publié [35]. Suite à une période alimentaire d'acquisition virale, aucune augmentation de la charge virale n'a pu être détectée dans les aleurodes vectrices au cours du temps, ce qui suggère une absence de réplication virale. Des travaux similaires sur un couple mastrévirus/cicadelle ont débouché sur la même conclusion [37]. Cependant, l'ADN viral persiste plus longtemps dans les insectes que ce que leur capacité d'infection pourrait suggérer [38, 35, 39]. L'hypothèse de la non multiplication virale au sein du vecteur *B. tabaci* a été confirmé pour le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) par l'absence de forme répllicative du génome viral dans des aleurodes virulifères. D'autres résultats cependant mettent en doute l'hypothèse de la non multiplication virale, tels que les modifications cytopathologiques observées dans certains tissus d'aleurode infectés par le SLCV [40] et l'impact négatif du TYLCV sur la biologie et la reproduction de *B. tabaci* [39]. En comparaison, aucunes modifications cytopathologiques ou diminutions de la valeur sélective n'ont été documentées chez les pucerons infectés par des virus de la famille des *Luteoviridae*.

La transmission par *B. tabaci* semble également dépendre de protéines homologues à GroEL (symbionines) produites par des bactéries endosymbiotiques, et libérées dans l'hémolymphe des insectes. L'alimentation artificielle des aleurodes avec des anticorps anti-GroEL, avant l'acquisition du TYLCV, réduit de 80% la transmission virale sur des plantes de tomate [41]. L'extraction d'anticorps actifs de l'hémolymphe des insectes traités, suggère que les anticorps sont potentiellement capables de fixer l'homologue de GroEL, qui serait ainsi gêné dans son interaction avec le TYLCV. La diminution de l'efficacité de la transmission s'accompagne d'une rapide diminution de la charge virale présente dans l'hémolymphe, suggérant que les particules virales non protégées par les symbionines sont vouées à une destruction protéolytique. La très forte identité de la séquence N-terminale entre l'homologue de GroEL de *B. tabaci* et les homologues de GroEL des pucerons, indique que cette région de la protéine, impliquée dans l'interaction avec les *Luteoviridae*, a été conservée au cours de l'évolution. En revanche, aucune homologie n'a été détectée entre la protéine de capsid du TYLCV et la région N-terminale du domaine RTD des virus de la famille *Luteoviridae*, impliquée dans l'interaction avec les homologues de GroEL. Ceci suggère que l'interaction - CP / homologues de GroEL- n'est pas séquence spécifique pour la CP, mais pourrait être induite par l'intermédiaire de régions hydrophobes ou de structures secondaires [41].

Une transmission transovarienne et sexuelle ? La découverte récente d'une transmission transovarienne [42] et d'une transmission sexuelle [43], d'un isolat israélien du TYLCV (TYLCV-Is) chez *B. tabaci*, rajoute une originalité supplémentaire à la transmission des bégomovirus. Ces résultats, contraires aux données publiées précédemment [35], décrivent pour la première fois l'existence d'une transmission sexuelle d'un phytovirus [43]. Quant à la transmission transovarienne, elle cautionnerait l'hypothèse d'une multiplication du TYLCV dans son vecteur, car cette transmission, dite verticale, est généralement décrite pour les virus multipliants. Etant donné que tous les gènes du génome des géminivirus ont pu être associés à des fonctions spécifiques dans la plante, il faut supposer que certains de ces gènes pourraient également être fonctionnels dans l'insecte vecteur. En revanche, si l'absence de multiplication virale se confirme, il faudra admettre qu'un bégomovirus (TYLCV-Is) a réussi à développer un mode d'interaction original avec son vecteur, à savoir, une transmission verticale en absence de réplication virale. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les mécanismes de la transmission circulante des géminivirus sont plus complexes que ceux des virus de la famille des *Luteoviridae* et demeurent encore largement inconnus.

La transmission circulante multipliante

Les phytovirus dont le mode de transmission est de type circulant multipliant, sont classés dans les genres *Tenuivirus* et *Marafivirus*, et dans trois familles virales contenant aussi des virus animaux de type arbovirus (Tableau I). Les virus des végétaux présents dans ces groupes peuvent être considérés comme des arbovirus infectants des plantes ou comme des phytoarbovirus. La plupart de ces virus ne présentent pas d'effets délétères marqués sur leurs hôtes arthropodes, suggérant une longue coévolution entre les virus et leurs hôtes vecteurs [44]. Cependant, certains arbovirus et phytoarbovirus affectent la longévité et la fécondité de leurs insectes vecteurs [45, 44]. Du fait de leur faible impact économique, les phytoarbovirus n'ont pas reçu beaucoup d'attention, à quelques exceptions près, tel que le *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV) (Tableau I). Leurs génomes semblent relativement grands et complexes, et la plupart se sont avérés récalcitrant aux analyses classiques effectuées par les techniques de la biologie moléculaire.

La compétence du vecteur

Chaque espèce d'arbovirus et de phytoarbovirus est généralement transmise par une seule ou un nombre réduit d'espèces vectrices. Des variations intraspécifiques en ce qui concerne la sensibilité au virus et la capacité à transmettre le virus ont été observées dans différentes populations d'insectes vecteurs [46]. De ce fait, la majeure partie des recherches effectuées sur la transmission a porté sur la spécificité des vecteurs à transmettre. Globalement, le parcours du virus à travers l'insecte est sensiblement le même pour tous ces virus. Le virus est acquis par l'intermédiaire des liquides vasculaires des plantes ou sanguins des animaux. Il s'associe à la paroi intestinale pour infecter les cellules des tissus intestinaux, qui peuvent accumuler de fortes charges virales. Le virus est ensuite relargué dans l'hémolymphe et infecte secondairement d'autres types de tissus. Quand les organes reproducteurs sont infectés, il peut être transmis verticalement à la descendance. La transmission horizontale à d'autres plantes ou animaux hôtes dépend de l'infection des glandes salivaires qui relarguent les virions par l'intermédiaire des sécrétions salivaires, lors d'une alimentation.

Les barrières à la transmission par vecteur. La compétence du vecteur, c'est à dire sa capacité à transmettre un virus, n'est pas seulement déterminée par la « perméabilité » des

membranes cellulaires à l'entrée et à la sortie des virus mais également par la sensibilité des tissus à l'infection virale. Réciproquement, les barrières à la transmission virale, qui ont fait l'objet de nombreuses études (pour revue [45]), ne seraient pas uniquement liées à la perméabilité membranaire mais également à l'infection des tissus. La non sensibilité des cellules épithéliales de l'intestin moyen fut longtemps considérée comme l'obstacle majeur, qui empêchait certains vecteurs potentiels à transmettre des virus. La découverte de vecteurs potentiels infectés par du virus qu'ils n'étaient pas capable de transmettre, manifestait la présence d'autres barrières. Hardy *et al.* [47] rapportèrent pour la première fois l'existence de deux barrières, en analysant la transmission d'arbovirus par moustique, une barrière au niveau du relarguage du virus de l'intestin moyen vers l'hémolymphe et une barrière au niveau de l'infection des glandes salivaires. La barrière liée au relarguage du virus de l'intestin moyen a également été démontrée pour un virus de plante, le TSWV. Ce virus doit être acquis par un thrips au stade larvaire pour que la transmission soit possible au stade adulte. Le TSWV peut indifféremment infecter et se multiplier dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen des thrips larvaires et adultes, mais la migration vers d'autres types de tissus n'est possible que chez les larves [48]. La barrière au niveau des glandes salivaires a également été démontrée pour des virus de plantes, le *Wound tumor reovirus* et le *Sowthistle yellow vein rhabdovirus* transmis par cicadelles et pucerons respectivement. Dans des populations vectrices, ces phytoarbovirus sont capables d'envahir et de se répliquer dans différents types de tissus, alors que chez les individus non transmetteurs, le virus n'est pas associé aux glandes salivaires. Ceci suggère l'existence d'une barrière à l'infection des glandes salivaires à moins que le virus soit incapable de survivre dans l'hémolymphe. L'existence d'une barrière empêchant l'émission des virions des glandes salivaires vers le canal salivaire a été mise en évidence chez des moustiques vecteurs d'arbovirus. Une telle barrière n'a pas encore été détectée pour les phytoarbovirus [44]. Le succès de la transmission virale dépend de la capacité du virus à franchir chacune des barrières potentielles. L'efficacité de ces barrières à la transmission est déterminée par des interactions moléculaires qui sont propre à chaque combinaison virus-vecteur. Les facteurs environnementaux ou abiotiques jouent également un rôle dans le devenir des interactions virus-vecteurs, mais leurs influences semblent porter sur le niveau d'efficacité de l'interaction plutôt que sur son résultat définitif.

La capacité à transmettre des arbovirus est variable selon les individus testés au sein d'une population vectrice [49]. Cette variabilité est connue depuis longtemps chez les vecteurs de

phytovirus. Comprendre ce qui fait qu'un insecte soit vecteur, et développer des outils qui permettent d'identifier rapidement et avec précision des vecteurs potentiels, est important pour la compréhension de l'épidémiologie du virus et pour développer des mesures de contrôle. La prévention de l'infection des vecteurs ou le blocage de la transmission du virus peuvent être envisagés dans une stratégie de lutte intégrée contre une maladie virale.

La génétique de la transmission virale par vecteur. L'analyse génétique des populations d'insectes vecteurs a permis de montrer que la capacité d'un insecte à transmettre un virus était en général un caractère multigénique complexe [49]. Cependant, l'incapacité d'une souche de *Aedes aegypti* à transmettre plusieurs flavivirus a été corrélée à un gène unique ou quelques gènes étroitement associés [50]. Chez les insectes vecteurs des phytoarbovirus, il a été montré que la multiplication du *Rice hoja blanca tenuivirus* dans son delphacide hôte, *Sagades oryzicola*, était contrôlée par un gène récessif [51]. Bien que les mécanismes génétiques qui régulent la compétence des vecteurs à transmettre les arbovirus et les phytoarbovirus soient largement inconnus, des avancées dans ce domaine sont à prévoir grâce aux technologies moléculaires, largement utilisées pour les analyses génétiques des animaux et des végétaux.

L'intervention de récepteurs membranaires. Des protéines de moustiques jouant le rôle de récepteur membranaire pour les virus du genre *Alphavirus*, dont le *Chikungunya virus* (CHIKV) et le *Western equine encephalitis virus* (WEEV), ont été localisées dans les intestins moyens [52]. La liaison du CHIKV est sensiblement plus forte dans les fractions membranaires des intestins de moustiques compétentes que ceux issus des insectes réfractaires [52]. Cinq protéines issues de la fraction membranaire de l'épithélium intestinal et de la fraction membranaire des cellules C6/36 d'*Aedes albopictus* sont connues pour s'associer avec le CHIKV. Des études ultérieures d'accrochage de virus sur cette lignée cellulaire, indiquent que plusieurs protéines de surface pourraient servir de récepteurs membranaires au virus de la *Dengue* de type 4 (DENV-4 ; genre *Flavivirus*) et au *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV). Il y a de fortes présomptions qu'une protéine de 32 kDa de type laminine, intervient dans l'interaction C6/36-VEEV. Le fait que les protéines réceptrices de type laminine sont généralement très conservées, pourrait expliquer le très large spectre de vecteurs qui transmettent le VEEV, plusieurs genres de moustiques et de tiques.

Les glycoprotéines (G1 et G2) de l'enveloppe externe des bunyavirus sont suspectées d'intervenir dans l'interaction entre le virus et le vecteur [53]. L'utilisation des techniques de

Far Western, dans le but d'identifier les interactions protéine-protéine entre un virus et son vecteur, ont permis d'isoler des protéines de thrips présentant des affinités particulières pour le TSWV. Une protéine de thrips de 50 kDa, associée aux tissus de l'intestin moyen des larves de thrips et présentant des affinités avec les glycoprotéines du TSWV, pourrait jouer le rôle de récepteur membranaire [53]. Une deuxième protéine de thrips (~94kDa), présentant des affinités spécifiques avec la glycoprotéine G2 du TSWV, a été identifiée par une deuxième équipe [54]. G2 contient le motif très conservé en acides aminés Arg-Gly-Asp (RGD), proche de l'extrémité N-terminale. Ce motif est connu pour être un déterminant important dans l'accrochage cellulaire de plusieurs pathogènes et virus animaux, dont le *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), le Cocksackievirus humain A9 (CAV-9) et le spiroplasme *Borrelia burgdorferi*, responsable de la maladie de Lyme. Cependant, en raison de la sensibilité de la protéine G2 aux protéases et la forte concentration d'enzymes protéolytiques probablement présente dans la lumière intestinale, G2 ne semble pas intervenir dans l'accrochage cellulaire du virus au niveau du tractus intestinal des thrips [54]. Une caractérisation supplémentaire et une localisation tissulaire de la protéine de 94 kDa sont requis pour pouvoir élucider son rôle potentiel dans le passage du TSWV à travers le thrips.

L'intervention des endosymbiotes. Les bactéries endosymbiotiques des cicadelles sont impliquées dans la transmission verticale du *Rice dwarf reovirus* (RDV). De façon similaire, les mouches tsétsé qui sont d'importants vecteurs de maladies chez l'homme et l'animal, présentent des associations symbiotiques, très proches de celles observées chez les pucerons, incluant une surexpression des protéines GroEL [55].

La compétence virale

La génétique de la transmission virale n'est pas seulement contrôlée par le vecteur, mais également par le virus qui contribue à l'ensemble du processus. Cependant dans le cas des phytoarbovirus, très peu de progrès ont été obtenus dans l'identification des gènes et de leurs produits qui influencent la transmission par vecteur. L'absence de lignées cellulaires stables d'insectes vecteurs et la difficulté d'obtenir des mutants viraux stables avec un phénotype déficient pour la transmission ont contribué à cette faible progression.

La dynamique du virus dans son vecteur. Les études sur insectes entiers virulifères ont permis d'identifier des différences dans l'accumulation des protéines et des ARNs viraux, entre les plantes et les insectes hôtes. Ainsi, une protéine non structurale du *Maize stripe tenuivirus*

(MStV) s'accumule dans le maïs mais pas dans son delphacide vecteur. Des résultats similaires ont été décrit récemment pour le *Rice grassy stunt tenuivirus* dans le riz et dans les delphacides hôtes [56]. La fonction de cette protéine non structurale est inconnue. Elle pourrait intervenir soit comme protéine de mouvement du virus ou comme facteur assistant à l'acquisition du virus par le vecteur, sans pour autant être indispensable à sa réplication dans le vecteur. Au contraire, les ARNs du MStV codant pour des protéines de type glycoprotéine membranaire sont abondants à la fois dans les cellules hôtes de l'insecte et de la plante [57]. Les données actuelles ne permettent pas de dire si ces protéines s'accumulent à un niveau équivalent dans les cellules des deux hôtes et si elles sont indispensables à l'infection des deux hôtes. Cependant, par analogie avec d'autres modèles [58], on peut supposer qu'elles interviennent dans l'interaction avec les membranes cellulaires de l'insecte.

Toutes les protéines sérologiquement détectables du RDV sont présentes à la fois dans les insectes et dans les plantes hôtes [59]. Des données similaires ont été décrites chez les alphavirus [60]. Cependant, des divergences dans les processus post-traductionnels de maturation des protéines virales et dans les voies de glycosylation, entre les cellules des moustiques et des vertébrés, entraînent des différences dans l'accrochage des polysaccharides et de ce fait dans les clivages protéolytiques. De plus, des différences dans les voies de méthylation et de maturation des ARN viraux entre les cellules des invertébrés et des vertébrés semblent affecter la réplication des alphavirus et leurs taux d'accumulation [60]. Ces dissemblances fondamentales semblent contribuer aux divergences observées dans la pathogénicité induite par les alphavirus dans les cultures cellulaires de moustiques et de vertébrés [61].

Les mutants viraux non transmis par vecteur. Un certain nombre de mutants stables, présentant un phénotype déficient pour la transmission, ont été obtenus par des inoculations mécaniques répétées de plantes hôtes, sans passage par l'insecte vecteur. Par ailleurs, une souche du RDV non transmise par vecteur a été obtenue en maintenant le virus pendant 12 ans sur des plantes de riz propagées végétativement. Cette souche virale ne produisait plus sa protéine de capsid externe P2, non pas par perte de sa séquence codante mais en raison d'une mutation ponctuelle qui bloquait sa transcription. La protéine P2 ne s'est pas avérée indispensable à l'infection de la plante hôte, mais son absence ne permettait pas au virus d'infecter son insecte hôte et d'être transmis à d'autres plantes [62]. Ces données argumentent l'hypothèse, déjà décrite, que les protéines externes de la capsid des phytoarbovirus,

interviennent dans les mécanismes d'infection des cellules des insectes. Cela ne semble pas être le cas pour les cellules des plantes hôtes, dans lesquelles le virus est déposé par les insectes grâce à leurs stylets, capables de perforer parois et membranes cellulaires sans tuer les cellules. Les progrès technologiques, qui permettent de caractériser génétiquement des mutants non transmis, devraient nous octroyer la possibilité de mieux comprendre les interactions virus-vecteur, en dépit des difficultés à obtenir des cultures cellulaires d'insectes vecteurs et de construire des clones viraux infectieux.

Les stratégies et les défis futurs

Les techniques permettant d'exprimer des gènes viraux et d'analyser leurs fonctions sont de plus en plus performantes. Elles devraient permettre d'identifier les gènes viraux qui interviennent dans la transmission par vecteur et de mettre en évidence les interactions du produit de ces gènes avec des protéines d'insectes. Le prochain défi sera de mieux comprendre les interactions virus-vecteur dans les différents compartiments de l'arthropode vecteur et de déterminer quels sont les facteurs génétiques codés par le vecteur qui déterminent le processus général de la transmission.

La sensibilité des techniques de détection s'améliore comme en témoigne par exemple la détection des particules de potyvirus marquées à l'iode 125 au niveau des stylets des insectes, la visualisation des particules virales de la famille *Luteoviridae* dans des vésicules d'endocytose de cellules épithéliales de la paroi intestinale et des glandes salivaires par MET, et la mise en évidence de l'association des symbionines avec la protéine de translecture des *Luteoviridae*. Cependant, un certain nombre d'obstacles persistent. Des environnements aussi différents que l'intestin, l'hémolymphe et les sécrétions salivaires doivent induire des changements conformationnels des particules virales à l'intérieur de leurs vecteurs. Ces changements sont très certainement critiques pour les interactions virus-vecteur et pour le processus de transmission viral. La présence d'un nombre réduit de particules virales dans un petit groupe de cellules du vecteur ou sur une surface réduite de la cuticule de l'insecte, représente un problème majeur pour l'étude des interactions biologiques.

L'identification des récepteurs qui interviennent dans la spécificité de vection de nombreux pathogènes de plantes et de mammifères, devrait nous offrir de nouvelles opportunités pour contrôler les maladies, comprenant la neutralisation de la transmission par le biais de

traitements ou de protéines recombinantes produites par les plantes. Nos moyens de contrôler la transmission virale dans une stratégie de lutte intégrée sont dépendants de notre capacité à comprendre les processus de transmission et à prédire efficacement les étapes de ce processus qui sont vulnérables à des interventions. Malgré les progrès importants réalisés ces dernières années dans la compréhension des composants viraux impliqués dans la transmission, les mécanismes par lesquels les virus reconnaissent ou sont reconnus par leurs vecteurs ne sont que très partiellement compris. Des virus d'animaux ou de végétaux transmis par arthropodes vont continuer à émerger ou à réémerger. Le succès de la bataille dépendra de l'intégration des expertises des virologistes, des entomologistes, des biologistes moléculaires et des généticiens.

1. Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L. Viruses of plants. *CAB International, Cambridge, United Kingdom* 1996.
2. Hébrard E, Froissart R, Louis C, Blanc S. Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie* 1999 ; 3 : 35-48.
3. Nault LR. Arthropod Transmission of Plant Viruses : A new Synthesis. *Ann Entomol Soc Am* 1997 ; 90(5) : 521-541.
4. Gergerich R, Scott HA. Determinants in the specificity of virus transmission by leaf-feeding beetles. *Adv Dis Vector Res* 1991 ; 8 : 1-14.
5. Gray SM , Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999 ; 63 : 128-148.
6. Van den Heuvel JFJM, Hogenhout SA, Van der Wilk F. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends Microbiol* 1999 ; 7 : 71-76.
7. Gildow FE. Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Adv Dis Vector Res* 1987 ; 4 : 93-120.
8. Marsh M, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res* 1989 ; 36 : 107-151.
9. Tjallingii WF. Sieve element acceptance by aphids. *Eur J Entomol* 1994 ; 91 : 47-52.
10. Klingler J, Powell G, Thompson GA, Isaacs R. Phloem specific aphid resistance in *Cucumis melo* line AR 5: effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. *Entomol Exp Appl* 1998 ; 86 : 79-88.
11. Garret A, Kerlan C, Thomas D. The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector *Myzus persicae*. *Arch Virol* 1993 ; 131 : 377-392.
12. Van den Heuvel JFJM, Verbeek M, Van der Wilk F. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 1994 ; 75 : 2559-2565.

13. Van den Heuvel JFJM, Bruyere A, Hogenhout SA, Ziegler Graff V, Brault V, Verbeek M, Van der Wilk F, Richards K. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* 1997 ; 71 : 7258-7265.
14. Gildow FE. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* 1993 ; 83 : 270-277.
15. Wang H, Nuttall PA. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 1994 ; 109 : 525-530.
16. Gildow FE, Gray SM. The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* 1993 ; 83 : 1293-1302.
17. Peiffer ML, Gildow FE, Gray SM. Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 495-503.
18. Brault V, Van den Heuvel JFJM, Verbeek M, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, Herrbach E, Garaud JC, Guilley H, Richards K, Jonard G. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J* 1995 ; 14 : 650-659.
19. Filichkin SA, Lister RM, McGrath PF, Young MJ. *In vivo* expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus read-through gene. *Virology* 1994 ; 205 : 290-299.
20. Bruyere A, Brault V, Ziegler Graff V, Simonis MT, Van Den Heuvel JFJM, Richards K, Guilley H, Jonard G, Herrbach E. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on a virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 1997 ; 230 : 323-334.
21. Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh KSP, Miller WA, Gray SM. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein read-through domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* 1996 ; 219.
22. Lamb JW, Duncan GH, Reavy B, Gildow FE, Mayo MA, Thay RT. Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 1349-1358.
23. Gildow FE, Reavy B, Mayo MA, Woodford T, Duncan GH. Potato leafroll virus-like particles lacking readthrough protein are transmitted by *Myzus persicae*. *Phytopathology* 1997 ; 87 : S33.
24. Ham PJ. Immunity in haematophagous insect vectors of parasitic infection. *Adv Dis Vector Res* 1992 ; 9 : 41-66.
25. Baumann P, Baumann L, Lai C, Rouhbakhsh D, Moran NA, Clark MA. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera* : intercellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol* 1995 ; 49 : 55-94.

26. Filichkin SA, Brumfield S, Filichkin TP, Young MJ. *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic symL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J Virol* 1997 ; 71 : 569-577.
27. Fukatsu T, Ishikawa H. Synthesis and localization of symbionin an aphid endosymbiont protein. *Insect Biochem Mol Biol* 1992 ; 22 : 167-174.
28. Hogenhout SA, Verbeek M, Hans F, Houterman PM, Fortass M, Van Der Wilk F, Huttinga H, Van Den Heuvel JFJM. Molecular bases of the interactions between luteoviruses and aphids. *Agronomie* 1996 ; 16 : 167-173.
29. Hogenhout SA, Van der Wilk F, Verbeek M, Goldbach RW, Van den Heuvel JFJM. Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *J Virol* 1998 ; 72 : 358-365.
30. Wang X, Zhou G. 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, UK, Abstr.1.13.16 1998.
31. Harrison BD. Advances in geminivirus research. *Annu Rev Phytopathol* 1985 ; 23 : 55-82.
32. Ozzam O, Frazer J, De La Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 1994 ; 204 : 289-296.
33. Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 1990 ; 177 : 85-94.
34. Liu S, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 1791-1794.
35. Cohen S, Antignus Y. Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv Dis Vector Res* 1994 ; 10 : 259-288.
36. Hunter WB, Hiebert E, Webb SE, Tsai JH, Polston JE. Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis* 1998 ; 82 : 1147-1151.
37. Reynaud B, Peterschmitt M. A study of the mode of transmission of MSV by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann Appl Biol* 1992 ; 121 : 85-94.
38. Caciagli P, Bosco D. Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* 1997 ; 87 : 610-613.
39. Rubinstein G, Czosnek H. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* : effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J Gen Virol* 1997 ; 78 : 2683-2689.
40. Pesic-Van Esbroeck Z, Harris KF, Duffus JE. Immunocytochemical localization of squash leaf curl virus in squash and the sweet potato whitefly. *Phytopathology* 1995 ; 85 : 1180.
41. Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* 1999 ; 256 : 75-84.

42. Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H. Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 1998 ; 240 : 295-303.
43. Ghanim M, Czosnek H. Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *J Virol* 2000 ; 74 : 4738-4745.
44. Nuttall PA, Jones LD, Davies CR. The role of arthropod vectors in arbovirus evolution. *Adv Dis Vector Res* 1991 ; 8 : 15-45.
45. Ammar ED. Propagative transmission of plant and animal viruses by insects : factors affecting vector specificity and competence. *Adv Dis Vector Res* 1994 ; 10 : 289-331.
46. Holbrook FR, Tabachnick WJ. *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) complex in California. *J Med Entomol* 1995 ; 32 : 413-419.
47. Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Rev Entomol* 1983 ; 28 : 229-262.
48. Ullman DE, Cho JJ, Mau RFL, Westcot DM, Custer DM. A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology* 1992 ; 82 : 1333-1342.
49. Tabachnick WJ. Genetics of insect vector competence for arboviruses. *Adv Dis Vector Res* 1994 ; 10 : 93-108.
50. Miller BR, Mitchell CJ. Selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 1991 ; 45 : 399-407.
51. Zeigler RS, Morales JF. Genetic determination of replication of rice hoja blanca virus within its planthopper vector, *Sogatodes oryzicola*. *Phytopathology* 1990 ; 80 : 559-566.
52. Mourya DT, Ranadive SN, Gokhale MM, Barde PV, Padbidri VS, Banerjee K. Putative Chikungunya virus-specific receptor proteins on the midgut brush border membrane of *Aedes aegypti* mosquito. *Indian J Med Res* 1998 ; 107 : 10-14.
53. Bandla MD, Campbell L, Ullman DE, Sherwood JL. Interaction of tomato spotted wilt tospovirus glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* 1998 ; 88 : 98-104.
54. Kikkert M, Meurs C, Van De Wetering F, Dorfmüller S, Peters D, Kormelink R, Goldbach R. Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology* 1998 ; 88 : 63-69.
55. Aksoy S. Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies : 16S rDNA locus and over-expression of a chaperonin. *Insect Mol Biol* 1995 ; 4 : 23-29.
56. Miranda GJ, Hoganezawa H. Identification, purification, and serological detection of the major non capsid protein of rice grassy stunt virus. *Phytopathology* 1995 ; 85 : 1530-1533.
57. Estabrook EM, Suyenaga K, Tsai JH, Falk BW. Maize stripe tenuivirus RNA2 transcripts in plant and insect hosts and analysis of pvc2, a protein similar to the Phlebovirus virion membrane glycoproteins. *Virus Genes* 1996 ; 12 : 239-247.

58. Ludwig GV, Israel BA, Christensen BM, Yull TM, Schultz KT. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology* 1991 ; 181 : 564-571.
59. Suzuki N, Sugawara M, Kusano T, Mori H, Matsura Y. Immunodetection of rice dwarf phytoreoviral proteins in both insect and plant hosts. *Virology* 1994 ; 202 : 41-48.
60. Stollar V. Insect-transmitted vertebrate viruses : alphatogaviruses. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1993 ; 29A : 289-295.
61. Karpf AR, Brown DT. Comparison of Sindbis virus-induced pathology in mosquito and vertebrate cell cultures. *Virology* 1998 ; 240 : 193-201.
62. Omura T, Yan J. Role of outer capsid proteins in transmission of Phytoreovirus by insect vectors. *Adv Virus Res* 1999 ; 54 : 15-43.



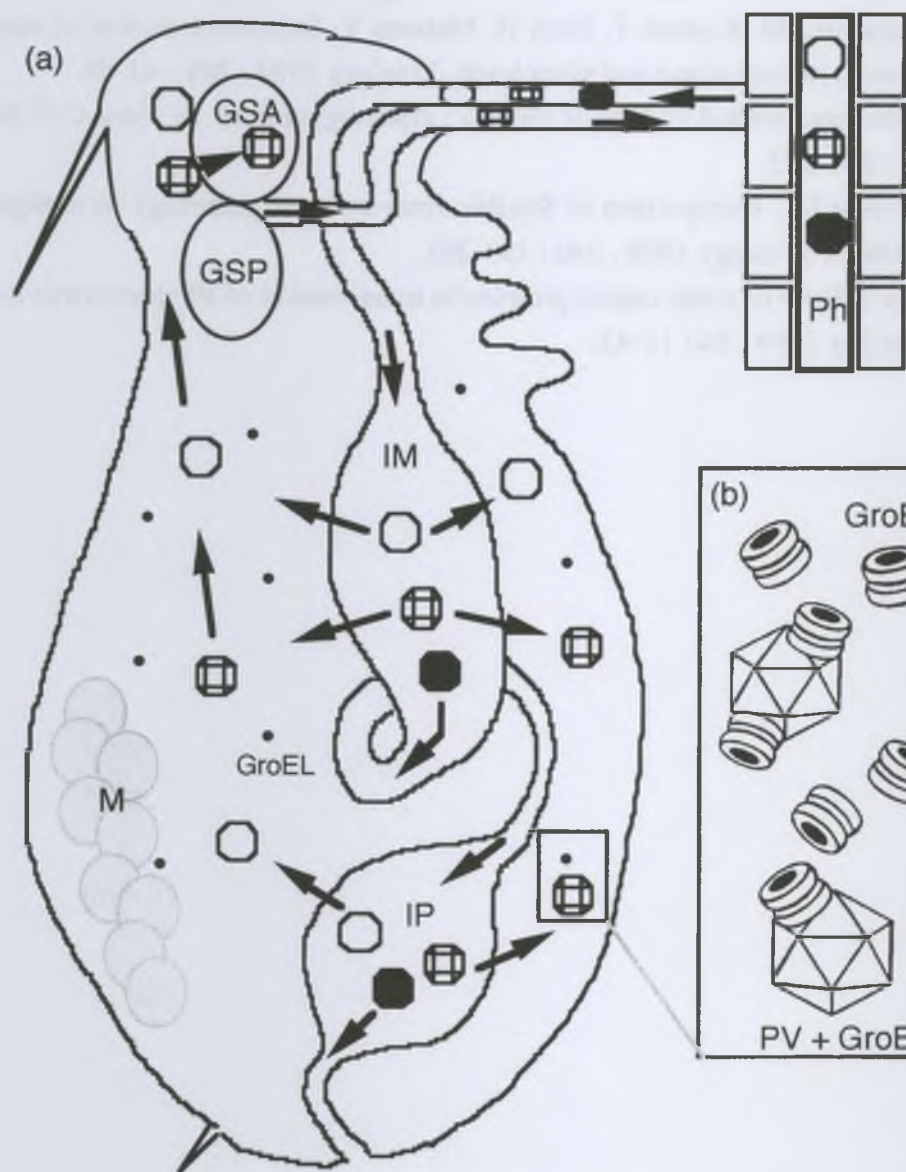


Figure 1. (a) Représentation schématique des barrières à la transmission des virus de la famille *Luteoviridae* par pucerons, selon le mode circulant non multipliant. Les virions sont ingérés lors d'une alimentation de sève phloémienne (Ph) sur une plante infectée. Ils atteignent l'hémolymphes en traversant les épithéliums de l'intestin moyen (IM) ou de l'intestin postérieur (IP), dans lesquels ils persistent pendant toute la vie des pucerons. La persistance des virions dans l'hémolymphes semble déterminée par leur capacité à interagir avec des protéines homologues de GroEL, produites par des bactéries endosymbiotiques. Ces bactéries appartiennent au genre *Buchnera* et sont hébergées dans les mycétocytes (M). Les particules virales circulent ensuite jusqu'aux glandes salivaires accessoires (GSA), avant d'être évacuées par la salive. La première barrière à la transmission par puceron est représentée par les épithéliums intestinaux. Seuls les virions qui sont reconnus spécifiquement par la membrane apicale des cellules épithéliales de l'IM ou de l'IP (hexagones blanc ou rayé), pénètrent dans les cellules par endocytose, les traversent par transcytose et sont évacués vers l'hémolymphes par exocytose. Les particules virales non reconnues (hexagone noir) sont éliminées par le transit intestinal. La deuxième barrière à la transmission est le passage à travers les GSA. Seuls les virions reconnus spécifiquement par la membrane plasmique basolatérale des cellules épithéliales des GSA (hexagone rayé), pénètrent par endocytose dans les GSA, traversent les cellules par transcytose et sont évacués vers la lumière salivaire par exocytose. Les particules virales non reconnues (hexagone blanc), ne peuvent pas pénétrer dans les GSA. GSP : glandes salivaires principales. (b) Représentation schématique des interactions entre les homologues de GroEL et les virions. PV : particules virales.

Tableau I. Familles et genres viraux contenant des espèces transmissent selon le mode circulant

Taxonomie	N° de membres	Hôte ^a	Génôme	Multipliant	Arthropodes vecteurs
Asfarviridae					
<i>Asfivirus</i>	1	M	ADN db	Oui	Tiques du genre <i>Ornithodoros</i>
Bunyaviridae					
<i>Bunyavirus</i>	161	M	ARN sb -	Oui	Moustiques, tiques, phlébotomes et cératopogonides
<i>Nairovirus</i>	33	M	ARN sb -	Oui	Tiques
<i>Phlebovirus</i>	23	M	ARN sb -	Oui	Moustiques, phlébotomes et cératopogonides
<i>Tospovirus</i>	5	P	ARN sb -	Oui	Thrips
Flaviviridae					
<i>Flavivirus</i>	53	M	ARN sb +	Oui	Moustiques et tiques
Geminiviridae					
<i>Mastrevirus</i>	11	P	ADN sb +	Non	Cicadelles
<i>Curtovirus</i>	2	P	ADN sb +	Non	Cicadelles et membracides
<i>Begomovirus</i>	41	P	ADN sb +	Non ?	Aleurodes du genre <i>Bemisia</i>
Luteoviridae					
<i>Enamovirus</i> ARN-1	1	P	ARN sb +	Non	Pucerons
<i>Luteovirus</i>	25	P	ARN sb +	Non	Pucerons
<i>Polerovirus</i>	2	P	ARN sb +	Non	Pucerons
Reoviridae					
<i>Coltivirus</i>	3	M	ARN db	Oui	Tiques
<i>Phytoreovirus</i>	3	P	ARN db	Oui	Cicadelles
<i>Fijivirus</i>	5	P	ARN db	Oui	Delphacides
<i>Orbivirus</i>	83	M	ARN db	Oui	Moustiques anophèles et culicines, tiques
<i>Oryzavirus</i>	2	P	ARN db	Oui	Delphacides
Rhabdoviridae					
<i>Cytorhabdovirus</i>	8	P	ARN sb -	Oui	Pucerons et delphacides
<i>Ephemerovirus</i>	6	M	ARN sb -	Oui	Culicoides et moustiques
<i>Nucleorhabdovirus</i>	8	P	ARN sb -	Oui	Pucerons, cicadelles et delphacides
Togaviridae					
<i>Alphavirus</i>	26	M	ARN sb +	Oui	Moustiques et punaises
<u>Genres non assignés à une famille</u>					
<i>Marafivirus</i>	3	P	ARN sb +	Oui	Cicadelles
<i>Nanovirus</i>	5	P	ADN sb +	Non	Pucerons et cixiides
<i>Tenuivirus</i>	7	P	ARN sb -	Oui	Delphacides
<i>Umbravirus</i>	10	P	ARN sb +	Non	Pucerons
<u>Transmission circulante non défini</u>					
<i>Tymovirus</i>	21	P	ARN sb +	Non	Coléoptères
Bromoviridae					
<i>Bromovirus</i>	6	P	ARN sb +	Non	Coléoptères
Tombusviridae					
<i>Carmovirus</i>	12	P	ARN sb +	Non	Coléoptères
Comoviridae					
<i>Comovirus</i>	15	P	ARN sb +	Non	Coléoptères
Potyviridae					
<i>Rymovirus</i>	7	P	ARN sb +	Non	Acariens

^a Ces espèces virales infectent des plantes (P) ou des mammifères (M)

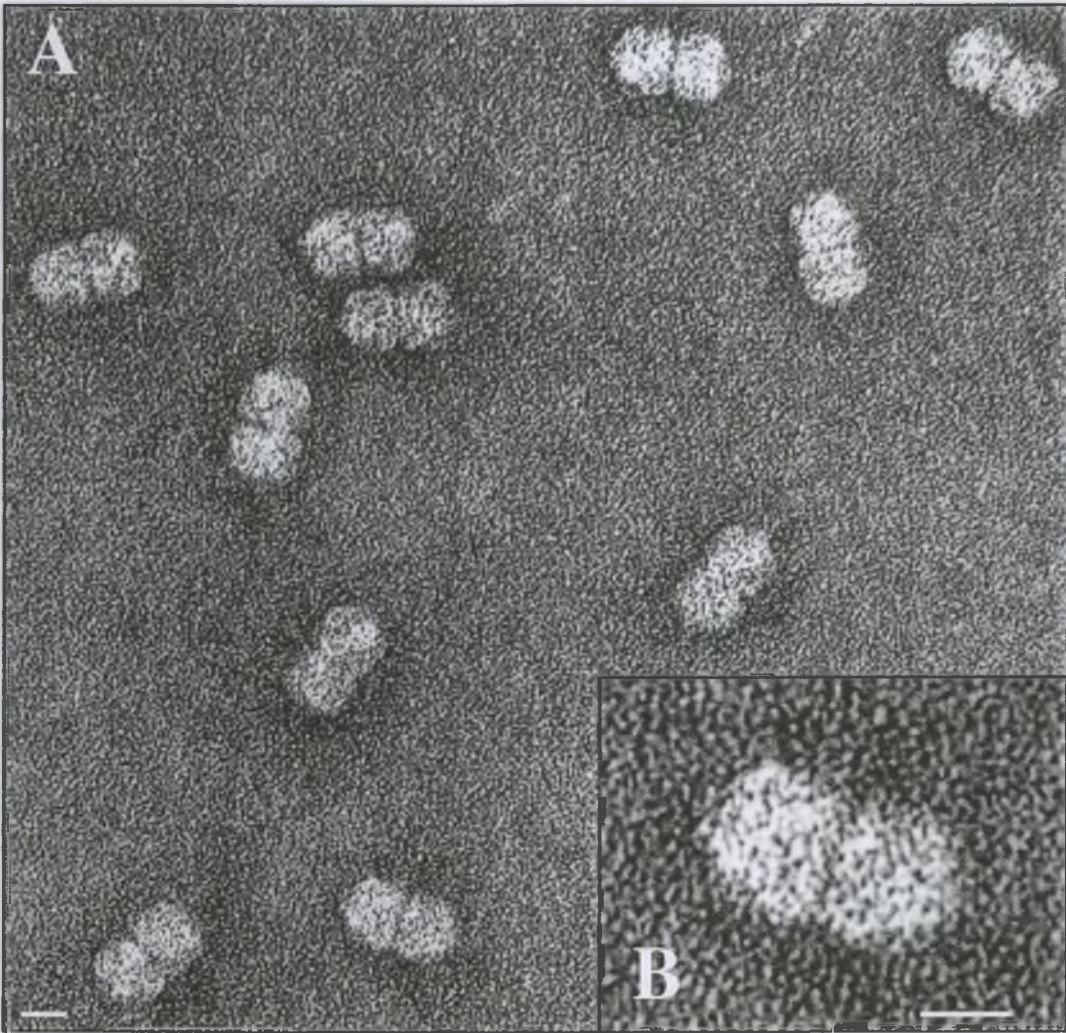


Figure 4. Ultrastructure des particules de *Maize streak virus*. (A) Purification réalisée avec l'isolat R2 de la Réunion sur maïs. (B) agrandissement de A. Barres = 10 nm.

2. Les gémiovirus et leurs insectes vecteurs

2.1. Importance économique : des maladies émergentes

Cette dernière décennie a vu se développer de graves épidémies mondiales à gémiovirus sur des cultures essentielles comme les cultures maraîchères dans le bassin méditerranéen et les Amériques, le maïs et le manioc en Afrique et le cotonnier en Asie. Ainsi, en 1990-91, 100% des cultures de tomate en Floride sont touchées par des maladies à gémiovirus provoquant des pertes de récolte évaluées à 140 millions de dollars (Moffat, 1999) ; en 1992, la vallée de Comayaga au Honduras subit une perte dans la production de tomate estimée à 4,6 millions de dollars (Polston & Anderson, 1997) ; en 1997, on estime à 1,3-2,3 milliards de dollars le coût de la mosaïque du manioc en Afrique, avec un impact humain particulièrement important et la mise en place de coûteux programmes de réhabilitation de la culture (Otim-Nape & Thresh, 1998). Il ne fait aucun doute que ces épidémies ont été favorisées par l'intensification des cultures, par l'homogénéisation génétique des variétés cultivées et par les échanges de matériel biologique entre régions et continents. A ces facteurs, il faut ajouter la prolifération de certains vecteurs, l'apparition de biotypes plus polyphages et l'arrivée de nouvelles souches virales. On constate que les gémiovirus présentent une extraordinaire diversité. Plus de 70 espèces de gémiovirus ont été recensées, auxquelles il faut rajouter de nombreuses souches distinctes pour chaque espèce, et la liste ne cesse de s'allonger.

2.2. Les Geminiviridae : des virus à ADN

Les gémiovirus sont des virus à ADN simple brin circulaire, composés d'un ou de deux composants génomiques de 2,5 à 3 kb. L'une des propriétés les plus caractéristiques des gémiovirus est la morphologie des particules virales. Elles sont formées de l'association de deux icosaèdres incomplets, à l'origine de leur nom, avec un fossé central perpendiculaire à l'axe de la longueur (Figure 4). Le virion de 20x30 nm est constitué de 22 capsomères contenant chacun cinq molécules de protéine de capsid de 28 à 34 kDa (Harrison, 1985). Dans la nature, ces virus sont exclusivement transmis par voie végétative ou par des insectes homoptères. Au laboratoire, il est possible de les transmettre dans certains cas par voie mécanique (Louie, 1995) et dans le cas de génome cloné par l'intermédiaire de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* (Isnard *et al.*, 1998).

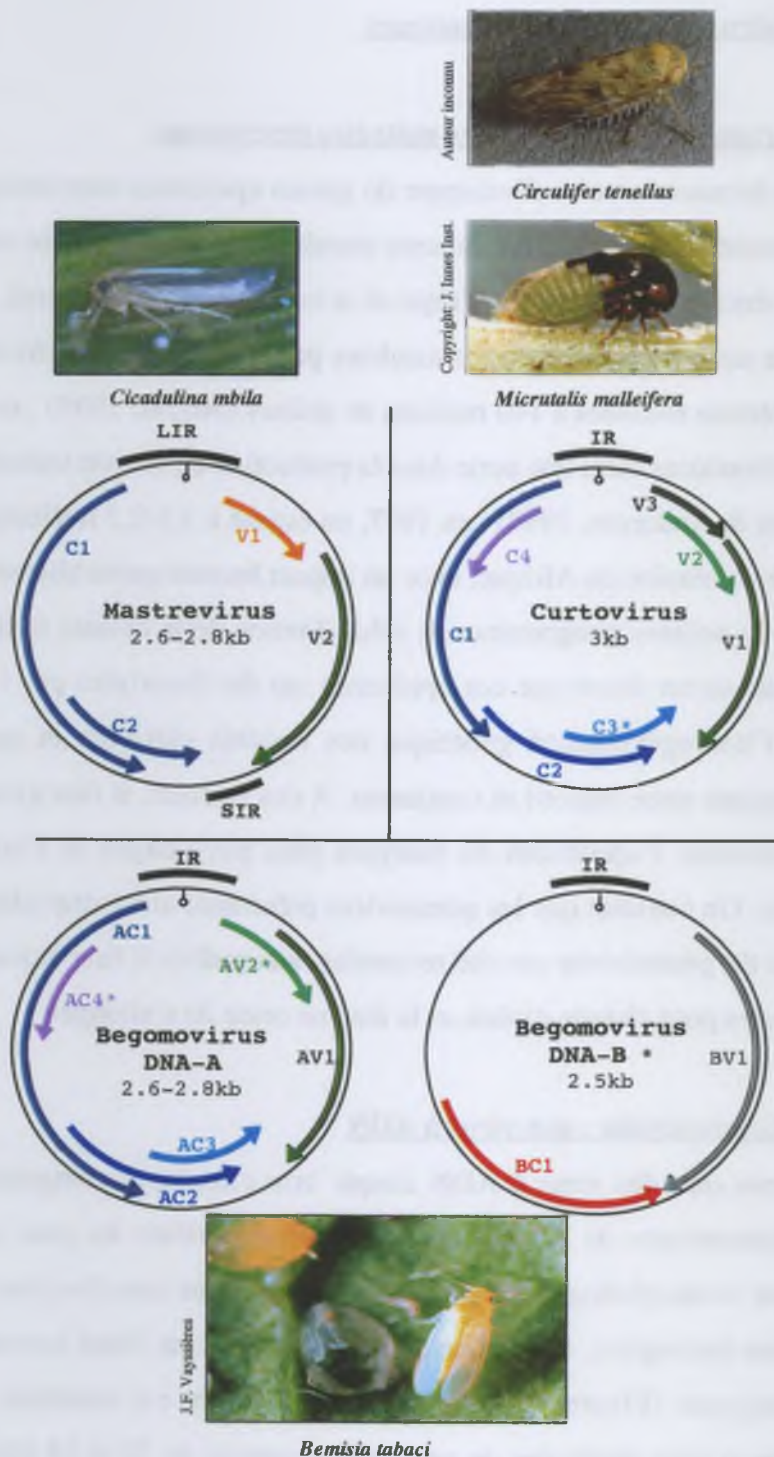


Figure 5. Classification des géminivirus en trois genres selon l'organisation de leur génome et leurs insectes vecteurs (d'après Bigarré, 1999). Chaque espèce est composée d'une (ou deux) molécule d'ADN simple-brin codant pour deux séries de cadres de lecture ouverts (ORF) séparées par une région intergénique (IR, LIR et SIR) incluant une structure en tige-boucle hautement conservée (voir texte). Les mastrevirus sont transmissibles par cicadelles uniquement (ex. *C. mbila* vecteur du *Maize streak mastrevirus*) tandis que les curtovirus sont transmis par des cicadelles (ex. *C. tenellus* vecteur du *Beet curly top curtovirus*) ou des membracides (ex. *M. malleifera* vecteur du *Tomato pseudo curly top curtovirus*) selon l'espèce. Les bégomovirus sont transmis exclusivement par des aleurodes du genre *Bemisia* (ex. *B. tabaci*). L'astérisque désigne un composant génétique présent chez certaines espèces virales seulement.

La capacité de codage des géminivirus est relativement grande par rapport à la taille de leur génome, grâce au chevauchement des ORFs et à la présence d'un promoteur bidirectionnel. Celui-ci est capable de contrôler l'expression des gènes portés par le brin viral Vx et le brin complémentaire Cx, en orientation inverse (Figure 5). Les deux séries de gènes sont séparées par une région intergénique (IR) qui contient le promoteur et toutes les séquences nécessaires à la réplication. A ce jour, trois genres de géminivirus sont distingués par des critères biologiques et génétiques, les mastrévirus, les curtovirus et les bégomovirus (ICTV ; Pringle, 1999).

Le genre *Mastrevirus* (membre type, *Maize streak virus* (MSV)).

Les mastrévirus ont un génome monopartite, sont transmis par des cicadelles et sont principalement trouvés sur des plantes monocotylédones. Cependant, deux virus décrits sur des plantes dicotylédones, le *Bean yellow dwarf virus* (BeYDV) et le *Tobacco yellow dwarf virus* (TYDV) ont été inclus dans ce groupe (Liu *et al.*, 1998). Le génome des mastrévirus comprend quatre ORFs, V1 et V2 codés par le brin viral et, C1 et C2, des ORFs chevauchants, portés par le brin complémentaire (Figure 5). Les ORFs V1 et V2 codent respectivement pour la protéine de mouvement de cellule à cellule (MP) et pour la protéine de capsid (CP). Le transcrit qui porte les ORFs C1 et C2 code, après épissage, pour une protéine impliquée dans la réplication. Deux régions intergéniques (IR) séparent les deux paires d'ORFs, une grande appelée LIR qui porte l'origine de réplication et le promoteur bidirectionnel et une petite appelée SIR qui contient les signaux de terminaison des transcrits.

Le genre *Curtovirus* (membre type, *Beet curly top virus* (BCTV)).

Comme les mastrévirus, les curtovirus sont monopartites. Ils sont transmis par cicadelles ou par membracides. Les curtovirus infectent uniquement des dicotylédones et ont une organisation génétique similaire mais distincte de celle des mastrévirus (Figure 5). On retrouve une organisation basée sur deux groupes de gènes orientés de façon opposée, mais avec au moins deux ORFs additionnels comparativement aux mastrévirus, l'un sur le brin viral (V3) et l'autre sur le brin complémentaire (C4). Certains membres ont en plus un ORF C3 (Figure 5). Il est à noter que l'ORF C2 n'est pas homologue avec l'ORF C2 des mastrévirus (Klute *et al.*, 1996). Une seule région intergénique est présente.

Le genre *Begomovirus* (membre type, *Bean golden mosaic virus* (BGMV)).

C'est dans ce genre que le plus d'espèces de géminivirus ont été caractérisées jusqu'à présent. Ces virus sont transmis exclusivement par des aleurodes du genre *Bemisia*, *B. tabaci* et *B. argentifolii* (ou biotype B de *B. tabaci*), et n'affectent que les dicotylédones. La plupart des begomovirus sont bipartites et possèdent un composant A (DNA-A) et un composant B (DNA-B) (Figure 5). Cependant, pour plusieurs membres, dont le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) et la souche australienne du *Tomato leaf curl virus* (ToLCV-Au) et l'*Ageratum yellow vein virus* (AYVV), aucun DNA-B n'a été trouvé malgré des recherches approfondies (Navot *et al.*, 1991 ; Dry *et al.*, 1997 ; Stanley *et al.*, 1997). Chez les espèces bipartites, les deux composants génomiques A et B d'un virus portent une IR très semblable mais les ORFs de chaque ADN (nommées ACx, AVx, BCx et BVx) sont très différents en structure et en fonction. Le DNA-A code pour des protéines impliquées dans la réplication (AC1 et AC3), la régulation de la transcription (AC2) et l'encapsidation (AV1), alors que les fonctions de mouvement sont assurées par les protéines BV1 et BC1, codées par le DNA-B (Figure 5 ; Lazarowitz & Beachy, 1999). La protéine BV1 assure le passage de l'ADN viral du noyau vers le cytoplasme. Une fois le complexe ADN/BV1 transloqué dans le cytoplasme, la protéine BC1 se lie au complexe et le dirige vers les plasmodesmes. La coopération entre les trois molécules assurerait le transport du complexe nucléo-protéique vers une autre cellule. Le composant génomique B semble également impliqué dans la sévérité des symptômes des viroses (von Arnim *et al.*, 1993).

2.3. Cycle d'infection de la plante et localisation nucléaire

Les étapes de colonisation d'une plante par un géminivirus.

Il est généralement admis que les géminivirus et les phytovirus transmis selon le mode circulant (Voir Article N°1) sont injectés directement dans le phloème, par salivation de l'insecte au cours d'une alimentation dans les tubes criblés. Il n'est pas encore clairement établi si les géminivirus migrent d'abord dans d'autres tissus avant de se multiplier ou si les premières cellules compagnes des tubes criblés inoculés peuvent servir de sites primaires de multiplication, avant une colonisation systémique de la plante. Pour le MSV, les résultats suggèrent que la migration se fait sans réplication car l'ablation du site d'inoculation du virus une heure après son inoculation, n'empêche pas l'infection systémique de la plante (Storey,

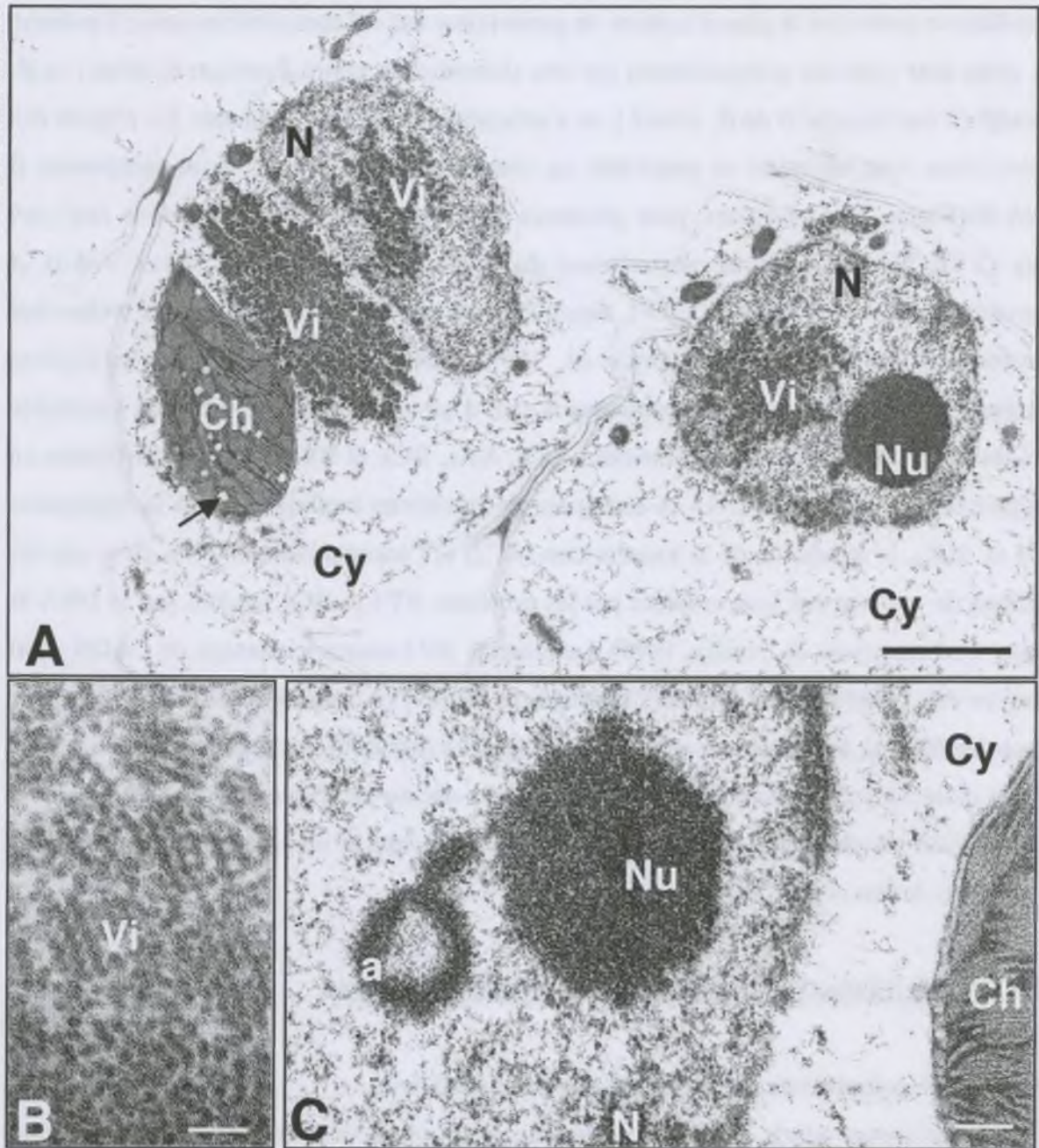


Figure 6. Exemples de modifications cellulaires typiquement associées à l'infection par un géminivirus (ici le *Maize streak virus* sur maïs)(d'après Bigarré, 1999). (A) Présence d'inclusions virales (Vi) dans le noyau (N) et dans le cytoplasme (Cy) de cellules du mésophylle, vraisemblablement suite à la rupture de la membrane nucléaire. Noter l'aspect dense et volumineux du nucléole (Nu), signe d'une intense activité transcriptionnelle, et la faible densité en grains d'amidon (flèche) des chloroplastes (Ch). (B) Agrandissement de A montrant les virions aggrégés en structures para-cristallines. (C) Présence dans le noyau de structures en anneaux circulaires (a) probablement composées d'ADN. Barres: A = 1,7 μ m; B = 100 nm; C = 250 nm.

1928). De plus, les feuilles de maïs inoculées par insectes virulifères ne présentent pas de symptômes et le virus n'y est pas détecté par ELISA (Peterschmitt *et al.*, 1992). En revanche, lors d'inoculations artificielles du *Bean dwarf mosaic begomovirus* (BDMV), par bombardement d'ADN recombinant contenant le gène rapporteur codant pour la 'green fluorescent protein' (GFP), il a été observé que la réplication avait lieu dans les cellules épidermiques atteintes par les particules (Sudarshana *et al.*, 1998), et que la migration vers les cellules du phloème se faisait après 2 à 4 jours. Ces résultats suggèrent que si le virus est injecté par l'insecte dans des cellules non vasculaires, celui-ci est théoriquement capable de migrer vers les faisceaux vasculaires. Après l'entrée dans le phloème, il est vraisemblable que le flux de photoassimilats soit à ce moment un facteur essentiel dans la migration du virus des zones inoculées, qui sont des 'sources', vers les racines et les zones foliaires les plus jeunes, qui représentent des 'puits'. Ceci explique en partie, pourquoi les géminivirus se retrouvent dans les racines et surtout dans l'apex de la tige qui semble être une zone cruciale pour le processus d'infection (Gilbertson & Lucas, 1996 ; Sudarshana *et al.*, 1998). En effet, le MSV et le BDMV sont détectés dans les cellules du protophloème, par hybridation *in situ* (MSV) ou par visualisation de l'activité GFP exprimée par un virus recombinant (BDMV-gfp)(Sudarshana *et al.*, 1998 ; Bigarré, 1999). L'infection de ce site implique que les cellules en cours de différenciations seront très précocement infectées, et que l'infection systémique sera assurée par la croissance de la plante. Inversement, les tissus déjà formés, qui ne sont plus des puits lors de l'inoculation, échappent souvent à l'infection (Peterschmitt *et al.*, 1992). Ce phénomène est connu par ailleurs sous le nom de 'résistance développementale' (Leisner *et al.*, 1993). A partir du système vasculaire, le virus colonise de manière radiale les tissus environnants, tels que les cellules du parenchyme vasculaire, du mésophylle et de l'épiderme (Pinner *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1996a). Cette dernière étape n'est pas complètement vérifiée pour tous les géminivirus dont certains sont considérés comme phloème stricte (Horns & Jeske, 1991).

La multiplication des géminivirus.

Les géminivirus répliquent et accumulent leurs composants génomiques dans le noyau des cellules végétales (Figure 6). En effet, seul ce compartiment cellulaire contient les facteurs nécessaires à la réplication de l'ADN. L'existence d'interactions multiples entre les protéines des géminivirus et des facteurs hôtes contrôlant le cycle cellulaire suggère que les géminivirus

sont capables d'induire chez la cellule quiescente la production de protéines de réplication et/ou l'entrée en phase S du cycle cellulaire (Xie *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999b ; Roulston *et al.*, 1999 ; Bass *et al.*, 2000). Par ailleurs, la réplication virale dans le noyau d'une cellule hôte implique une étape supplémentaire dans le cycle viral, comparativement aux virus à ARN, à savoir l'entrée et la sortie du génome du noyau.

Comme mentionné précédemment, les événements moléculaires précoces qui accompagnent l'introduction de particules virales dans les tubes criblés par les stylets de l'insecte, restent encore peu connus. Après l'entrée du virus dans la cellule cible, l'ADN simple brin (ADNss) serait décapsidé, puis importé dans le noyau suivant des mécanismes encore peu connus. La protéine de capsid pourrait jouer un rôle dans ce transport grâce à sa double capacité à lier l'ADN et à se diriger vers le noyau grâce à son motif de localisation nucléaire situé en N-terminal (Kunik *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1999c). L'étape suivante est la production d'un ADN double brin (ADNds) qui va servir d'une part, de matrice à la transcription des gènes viraux et, d'autre part, à la production de copies d'ADNss. Dans le cas de certains mastrévirus, il a été trouvé que l'ADNds est synthétisé à partir d'une amorce d'environ 80 pb, porté par le génome viral (ADN+)(Donson *et al.*, 1984). La machinerie cellulaire réalise cette synthèse sans intervention de protéines virales. Par contre, on ne sait pas comment est produit l'ADNds chez les géminivirus pour lesquels cette amorce n'a pas été identifié.

Une fois sous forme d'ADNds, la transcription des gènes viraux est initiée probablement en deux phases. Tout d'abord les gènes du brin complémentaire, car ils sont nécessaires à la réplication des formes virales, puis les gènes du brin viral dont la protéine de capsid. L'expression du gène codant pour la protéine Rep est une étape clé dans le cycle viral puisque cette protéine catalyse la production de formes simple brins (ADN+) à partir de la forme double brins, suivant un mécanisme en cercle roulant (Villarreal, 1999 ; Missich *et al.*, 2000). La première phase est le clivage d'un des deux brins d'ADN, très exactement entre les nucléotides 7 et 8 du nonanucléotide hautement conservé chez tous les géminivirus, TAATATT⁷⁻⁸AC (Stanley, 1995). L'ADN ainsi coupé sur un brin est libéré de ses contraintes de torsion et adopte une conformation dite 'circulaire ouverte'. A ce stade, la protéine Rep aurait une activité hélicase capable de séparer le brin (+) du brin (-) et de permettre au complexe de réplication de procéder à l'élongation du brin (+). Dans une troisième étape, après synthèse complète d'un nouveau brin, la protéine Rep libère l'extrémité 5' du brin déplacé et la lie avec l'extrémité 3', libérant la molécule complète simple brin.

Tableau 1. Récapitulatif non exhaustif des *Geminiviridae* pour lesquels les insectes vecteurs ont été identifiés (d'après ICTV).

Distribution	Espèce virale (Acronyme)	Vecteur : Genre espèce	Famille
Genre Mastrevirus			
Afrique, Inde, Madagascar	<i>Maize streak virus</i> (MSV)(Membre type)	<i>Cicadulina</i> spp. (8/22)	<i>Cicadellidae</i>
Australie	<i>Chloris striate mosaic virus</i> (CSMV)	<i>Nesoclutha pallida</i>	<i>Cicadellidae</i>
Vanuatu	<i>Digitaria streak virus</i> (DSV)	<i>Nesoclutha declivata</i>	<i>Cicadellidae</i>
Australie	<i>Digitaria striate mosaic virus</i> (DiSMV)	<i>Nesoclutha pallida</i>	<i>Cicadellidae</i>
Afrique	<i>Panicum streak virus</i> (PanSV)	<i>Cicadulina mbila</i>	<i>Cicadellidae</i>
Australie	<i>Paspalum striate mosaic virus</i> (PSMV)	<i>Nesoclutha pallida</i>	<i>Cicadellidae</i>
Afrique, Moyen Orient	<i>Sugarcane streak virus</i> (SSV)	<i>Cicadulina mbila</i> , <i>C. bipunctata</i>	<i>Cicadellidae</i>
Australie	<i>Tobacco yellow dwarf virus</i> (TYDV)	<i>Orosius argentatus</i>	<i>Cicadellidae</i>
Europe de l'est	<i>Wheat dwarf virus</i> (WDV)	<i>Psammotettix alienus</i>	<i>Cicadellidae</i>
<u>Espèce non assignée</u>			
Inde	Chickpea chlorotic dwarf virus (CpCDV)	<i>Orosius orientalis</i>	<i>Cicadellidae</i>
Genre Curtovirus			
Amériques Nord et Sud,	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)(Membre type)	<i>Circulifer tenellus</i>	<i>Cicadellidae</i>
Bassin Méditerranéen	" "	<i>Circulifer opacipennis</i>	<i>Cicadellidae</i>
États-Unis (Florides)	<i>Tomato pseudo curly top virus</i> (TPCTV)	<i>Micrutalis malleifera</i>	<i>Membracidae</i>
Genre Begomovirus	Virus transmis par Aleurodes du genre <i>Bemisia</i>		
Amérique du Sud, Caraïbes	<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)(Membre type)	<i>Bemisia tabaci</i> (Biotype A et B) (Biotype B = <i>B. argentifolii</i>)	<i>Aleyrodidae</i>

Chiffres entre parenthèses : Nombre d'espèces vectrices par rapport au nombre total d'espèces du genre

L'encapsidation des formes virales ADNss se fait vraisemblablement dans le noyau comme en témoigne l'accumulation nucléaire des virions sous formes de volumineuses structures paracrystallines (Figure 6 ; Dollet *et al.*, 1986 ; Pinner *et al.*, 1993 ; Bigarré, 1999). Les mécanismes de mouvement du virus de cellule à cellule ne sont pas complètement éclaircies. Il n'est pas encore établi si les géminivirus se déplacent de cellule à cellule sous forme de complexe nucléoprotéique (ADNss ou ADNds) ou bien sous forme de virion, et s'ils utilisent des structures particulières telles que les tubules pour traverser les plasmodesmes (Gilbertson & Lucas, 1996). De même, l'acquisition des particules de géminivirus, principalement cloisonnées dans le noyau des cellules, par des insectes piqueur suceurs n'est pas encore très bien élucidé. Les résultats décrits dans le chapitre I de cette thèse propose une réponse pour les mastrevirus transmis par cicadelle.

2.4. La transmission des géminivirus par des homoptères

Cet aspect a été développé dans l'Article N°1. Aussi, je ne donnerai ci-dessous que des informations qui n'ont pas été précisés dans l'article et rappellerai les points les plus pertinents par rapport à la problématique de la thèse.

Aucun géminivirus n'est connu pour être transmis à la descendance par graine. De même, aucune transmission par contact entre une plante infectée et une plante saine n'a été décrite, même si certains géminivirus sont transmissibles mécaniquement au laboratoire (Louie, 1995). La transmission du virus au champ est donc entièrement dépendante d'arthropodes vecteurs de type piqueur suceur : des homoptères. La transmission est de type circulant, vraisemblablement non multipliant (voir Article N°1). Les géminivirus ne sont transmis que par quelques espèces au sein d'un même genre ou même par une seule espèce, preuve d'une spécificité importante entre le virus et le vecteur.

Les mastrevirus sont des virus transmis par plusieurs genres de cicadelles (*Auchenorrhyncha*, *Cicadellidae*) (Tableau 1). Ils peuvent être qualifiés de 'Leafhopper transmitted geminiviruses' (LTG). Les curtovirus sont transmis par des cicadelles et des membracides (*Auchenorrhyncha*, *Membracidae*). Les bégomovirus sont transmis par une ou deux espèces du genre *Bemisia* (*Sternorrhyncha*, *Aleyrodidae*) selon que l'on considère que le biotype de *B. tabaci*, récemment décrit, est une nouvelle espèce appelée *B. argentifolii*, ou simplement un nouveau biotype appelé biotype B. Les bégomovirus sont communément appelés 'Whiteflies transmitted geminiviruses' (WTG).



Figure 7. Cinquième stade larvaire (puparium) du biotype B de *Bemisia tabaci* (d'après Bedford *et al.*, 1994). (A) Puparium sans épines dorsales lorsque la population d'aleurodes est élevée sur des feuilles glabres de manioc *Manihot esculenta*. (B) Puparium avec épines dorsales lorsque la population d'aleurodes est élevée sur des feuilles hirsutes de malvacée *Abutilon pictum*. Barres : 0,2 mm.

L'importance mondiale et croissante des problèmes liés à *B. tabaci*, sur les cultures maraîchères et cotonnières, est responsable d'une littérature plus abondante chez les WTG que chez les LTG. Elle concerne à la fois les dégâts directs sur les cultures et également les dégâts indirects comme la transmission des bégomovirus et l'excrétion de miellat (Brown & Bird, 1992). Pour cette raison, il nous a semblé opportun d'exposer l'état actuel des données sur *B. tabaci*, décrit comme vecteur de plus de 50 bégomovirus (Bedford *et al.*, 1994a).

La transmission des bégomovirus par le complexe de biotypes de *B. tabaci*

B. tabaci appartient à la sous famille des *Aleyrodinae* comprenant environ 1000 espèces décrites. La détermination des différents genres et espèces est fondée sur des caractéristiques morphologiques du quatrième et dernier stade larvaire, aussi appelé puparium (Figure 7). Cependant, l'aspect phénotypique du puparium semble considérablement varier selon la plante hôte sur laquelle elle se développe. Dans le cas d'espèces polyphages comme *B. tabaci* (Figure 7), 300 espèces de plantes hôtes appartenant à 66 familles différentes ont été recensées (Mound & Halsey, 1978). Par ailleurs, l'identification des espèces à l'intérieur du genre *Bemisia* a toujours présenté des problèmes pour les taxonomistes, tout particulièrement pour l'espèce *B. tabaci* (Gill, 1990 d'après Bedford *et al.*, 1994a). La séparation entre une espèce et un biotype à l'intérieur d'une espèce n'est pas clairement délimitée. Le concept d'un complexe de biotypes de *B. tabaci* a été suggéré et revu dernièrement (Brown *et al.*, 1995b ; Frohlich *et al.*, 1999). L'analyse génétique de plusieurs populations de *B. tabaci* prélevées à travers le monde a permis de distinguer trois groupes (Brown *et al.*, 2000). Le premier groupe comprend deux variants de *B. tabaci* originaire de l'hémisphère ouest, correspondant au biotype A identifié aux Etats-Unis en Californie et au Mexique dans la région du Culiacan. Le deuxième groupe englobe cinq collections précédemment identifiées comme le biotype B de *B. tabaci*, alors que le troisième groupe ne contient qu'une population unique originaire du Bénin en Afrique. Ces deux derniers groupes se détachent nettement des populations du Nouveau Monde et semblent avoir une origine récente dans l'hémisphère est (Brown *et al.*, 2000). D'autres ont proposé que les aleurodes actuellement nommés *B. tabaci* constituent un groupe d'espèces intimement corrélé à l'espèce *tabaci* (Bellows *et al.*, 1994). Un de ces variants, provisoirement intitulé type B de *B. tabaci*, a été décrit comme une espèce distincte, *Bemisia argentifolii* Bellows et Perring (Bellows *et al.*, 1994). Cependant, la classification n'est pas encore définitive et la communauté internationale préfère conserver le nom de *B.*

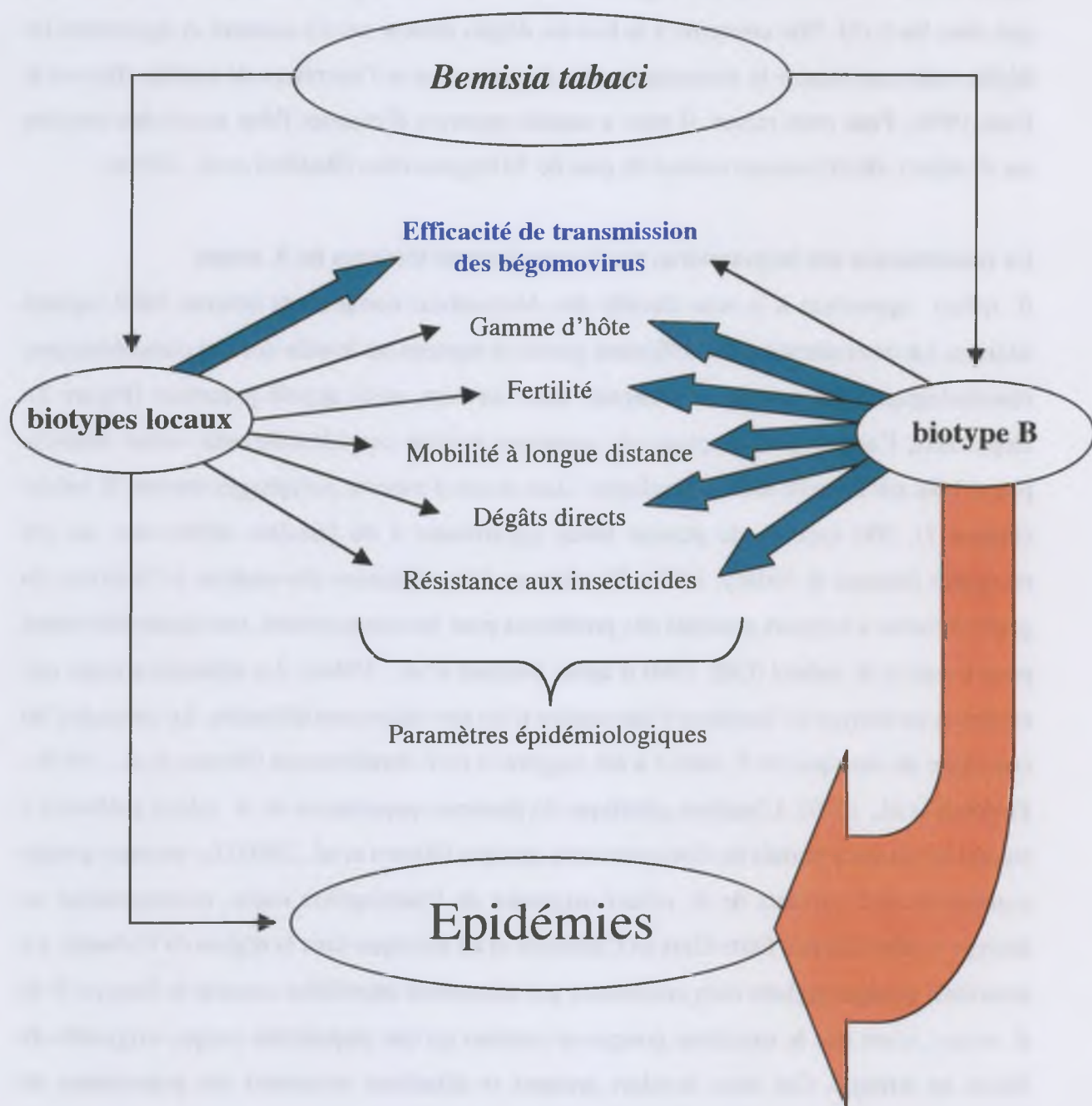


Figure 8. Représentation schématique de la situation épidémiologique des bégomovirus transmis par le complexe de biotypes de *Bemisia tabaci*.

tabaci, en la considérant comme une espèce polytypique (Cahill *et al.*, 1996) et en attendant une meilleure caractérisation taxonomique.

Le biotype B, dont l'origine n'a pas encore été clairement élucidée, a été observé dans les cultures maraîchères et cotonnières des Etats-Unis et des Caraïbes vers les années 1986 (Costa & Brown, 1991). Il se serait rapidement propagé aux dépens des autres biotypes locaux (Brown & Bird, 1992). Aujourd'hui, le biotype B présente une distribution mondiale, à la fois en serre et en plein champ (Bedford *et al.*, 1994a). La comparaison avec le biotype A du sud des Etats-Unis, a montré que le biotype B présente un certain nombre de caractéristiques biologiques essentielles, dont certaines ont des impacts majeurs sur son rôle dans la transmission des bégomovirus (Figure 8). (1) Le biotype B induit des dégâts phytotoxiques typiques sur les plantes hôtes, comprenant les argentures foliaires et les maturations inégales des fruits (Costa & Brown, 1990). (2) Il présente un taux de fertilité accru (Bethke *et al.*, 1991), (3) une mobilité qui lui permet de se déplacer sur de longues distances (Blackmer *et al.*, 1995), (4) une gamme de plantes hôtes plus importante comme la vigne, l'arachide, les *Citrus* et certaines plantes ornementales (Brown *et al.*, 1995b), et (5) une résistance à certains insecticides (Brown *et al.*, 1995b).

Les travaux de Bedford *et al.* (1994b) montrent que la majorité des biotypes de *B. tabaci* a la capacité de transmettre les 12 bégomovirus testés. Ces données suggèrent que la capacité de transmission des bégomovirus est un caractère largement conservé chez tous les biotypes de *B. tabaci* présents dans le monde. Cependant, l'efficacité de la transmission varie considérablement entre les virus. Certains virus des cultures maraîchères sont transmis efficacement par un ou cinq individus par plante. D'autres virus comme l'*African cassava mosaic virus* (ACMV) nécessitent 200 à 1000 fois plus d'insectes pour atteindre les mêmes taux de transmission (Markham *et al.*, 1995). Les données actuelles ne permettent pas de savoir si ces divergences sont liées selon le virus à une différence dans la charge virale injectée dans la plante par individu vecteur, dans le taux minimal de particules pour infecter une plante ou dans la proportion d'insectes vecteurs.

L'acquisition et la transmission d'un virus par un insecte vecteur impliquent des interactions entre le virus, la plante et le vecteur potentiel. Le comportement alimentaire du vecteur va déterminer la gamme d'hôtes potentiels du virus. Les spécificités d'alimentation de l'insecte (mésophyllophage, xylémophage, phloémophage ou polyphage) et de répartition tissulaire et cellulaire du virus dans la plante (phloème strict ou non) vont définir la compatibilité entre le

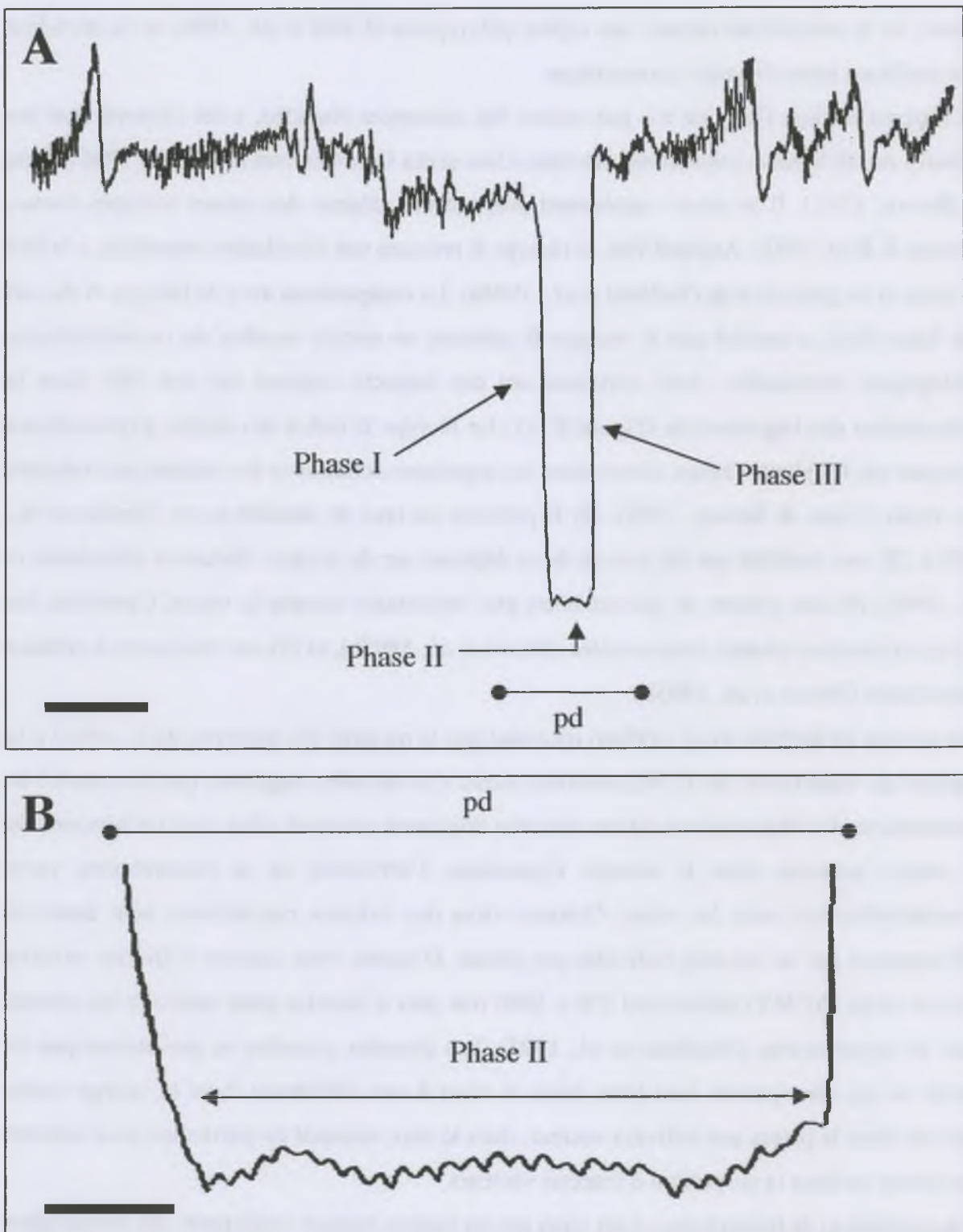


Figure 9. Chute de potentiel (pd) enregistrée par électropénéthrographie (EPG-DC) avec le biotype B de *Bemisia tabaci*, sur haricot rouge (*Phaseolus lunatus* cv. 'Bush Bean'), sur brocoli (*Brassica oleracea* cv. 'Green Goliath') et sur coton (*Gossypium hirsutum* cv. 'Delta Pine')(d'après Johnson et Walker, 1999). (A) L'enregistrement temporel présente une pd divisée en trois phases (I, II et III). (B) Agrandissement de la phase II de A, qui ne présente pas de sous-phases. Barres : A = 10 s et B = 0,5 s.

virus et le vecteur, et les caractéristiques de la transmission (AAP et IAP minimales). Les tests de transmission montrent que l'acquisition des bégomovirus par *B. tabaci* nécessite une période d'alimentation minimale de 30 minutes et en moyenne de 60 minutes, alors que l'inoculation est réalisée en générale entre 10 et 30 minutes (Markham *et al.*, 1995). La transmission non circulante non persistante par puceron a été abondamment étudiée par la technique EPG-DC, pour identifier les spécificités du comportement alimentaire des insectes piqueur suceurs en relation avec la transmission virale (Voir 1.1. La transmission non circulante). Cette technique a notamment permis de montrer que certaines sous-phases des chutes de potentiels (pds) enregistrées chez les pucerons sont corrélées avec l'inoculation et l'acquisition des virus de plantes. Les premiers travaux effectués sur l'aleurode *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) montrent (1) que la progression des stylets dans le limbe foliaire, avant d'atteindre le phloème, est totalement intercellulaire (Janssen *et al.*, 1989), (2) que les ponctions cellulaires pendant le trajet des stylets sont très rares, au contraire des pucerons (Janssen *et al.*, 1989) et (3) que la sélection des plantes hôtes s'effectue vraisemblablement par les liquides extracellulaires et non par des ponctions cellulaires comme les pucerons (Lei *et al.*, 1998). La comparaison des pds entre des femelles adultes du biotype B de *B. tabaci* et des pucerons montre que les pds sont constituées de trois phases (I, II et III), dans les deux cas (Figures 2 et 9 ; Martin *et al.*, 1997 ; Johnson & Walker, 1999). Cependant, chez *B. tabaci* et *T. vaporariorum* les pds ne sont pas fréquentes, n'apparaissent pas pendant les premiers temps de la progression des stylets dans le limbe foliaire et sont absentes durant les piqûres qui durent moins d'une minute, au contraire des pucerons (Janssen *et al.*, 1989 ; Johnson & Walker, 1999). Ces différences entre aphides et aleurodes argumentent l'hypothèse que les pucerons utilisent les piqûres intracellulaires pour la sélection de l'hôte, alors que les mouches blanches les utilisent uniquement pour localiser les tissus vasculaires. De plus, les pds des aleurodes diffèrent fortement de celles des pucerons pour les sous-phases de la phase II (Figure 9 ; Johnson & Walker, 1999). En effet, lors des ponctions cellulaires, les aleurodes ne semblent pas présenter de sous-phases associées à une salivation ou à une ingestion active. La plupart des virus non circulants non persistants (208 sur 211) et semi-persistants (25 sur 43) sont transmis par des pucerons (Nault, 1997). Seuls, trois virus non persistants et cinq virus semi-persistants sont transmis par aleurode (Nault, 1997). Le faible nombre de virus non circulants transmis par aleurode pourrait être lié à la rareté des ponctions intracellulaires précoces, à l'absence de ponctions intracellulaires pendant les essais brefs de piqûres et aux

divergences de comportement observées dans les sous-phases de la phase II (Figure 9 ; Johnson & Walker, 1999).

L'ensemble des données actuelles sur les épidémies concernant le couple *B. tabaci*/bégomovirus, suggère que ces nouvelles maladies sont causées par des virus indigènes, qui ont brutalement été transmis par un nouveau vecteur qui diffère de l'aleurode indigène (Brown *et al.*, 1995b). La gamme d'hôtes plus large du biotype B permet la rencontre entre des virus indigènes et de nouvelles plantes réservoirs et hôtes cultivées. Les études de diversité génétique montrent que les différentes populations ou biotypes de *B. tabaci* présentent une forte variabilité. Les spécificités pour la gamme de plantes hôtes, pour l'efficacité de la transmission des bégomovirus et pour le niveau de fertilité, déterminent l'épidémiologie des bégomovirus (Brown *et al.*, 1995b).

3. La transmission du MSV par le genre *Cicadulina* spp. sur maïs

La transmission de la maladie de la striure chez le maïs a été étudiée pour la première fois en 1925 par Storey (1925).

3.1. Le maïs : céréale d'importance mondiale

Le maïs (*Zea mays* ssp. *mays*) appartient à la classe des Monocotylédones, famille des *Poaceae*. Il figure actuellement au troisième rang des céréales cultivées dans le monde, après le blé et le riz, avec une surface proche des 139 millions d'hectares, soit environ 20% de la surface céréalière mondiale (FAO, 1999). La décennie 1980 est marquée par la progression rapide de la production de maïs dans les pays en voie de développement comme l'Inde, l'Asie et l'Afrique de l'Ouest.

3.2. La maladie de la striure

Conséquences agronomiques et dégâts.

La striure est sans conteste la virose du maïs la plus importante en Afrique. Des épidémies imprévisibles, pouvant causer jusqu'à 100% de pertes de récoltes de maïs ont été signalées (Mesfin *et al.*, 1991). Chez les génotypes sensibles, les plantes touchées présentent une diminution de la longueur des feuilles, un nanisme prononcé et des épis de tailles réduites voir

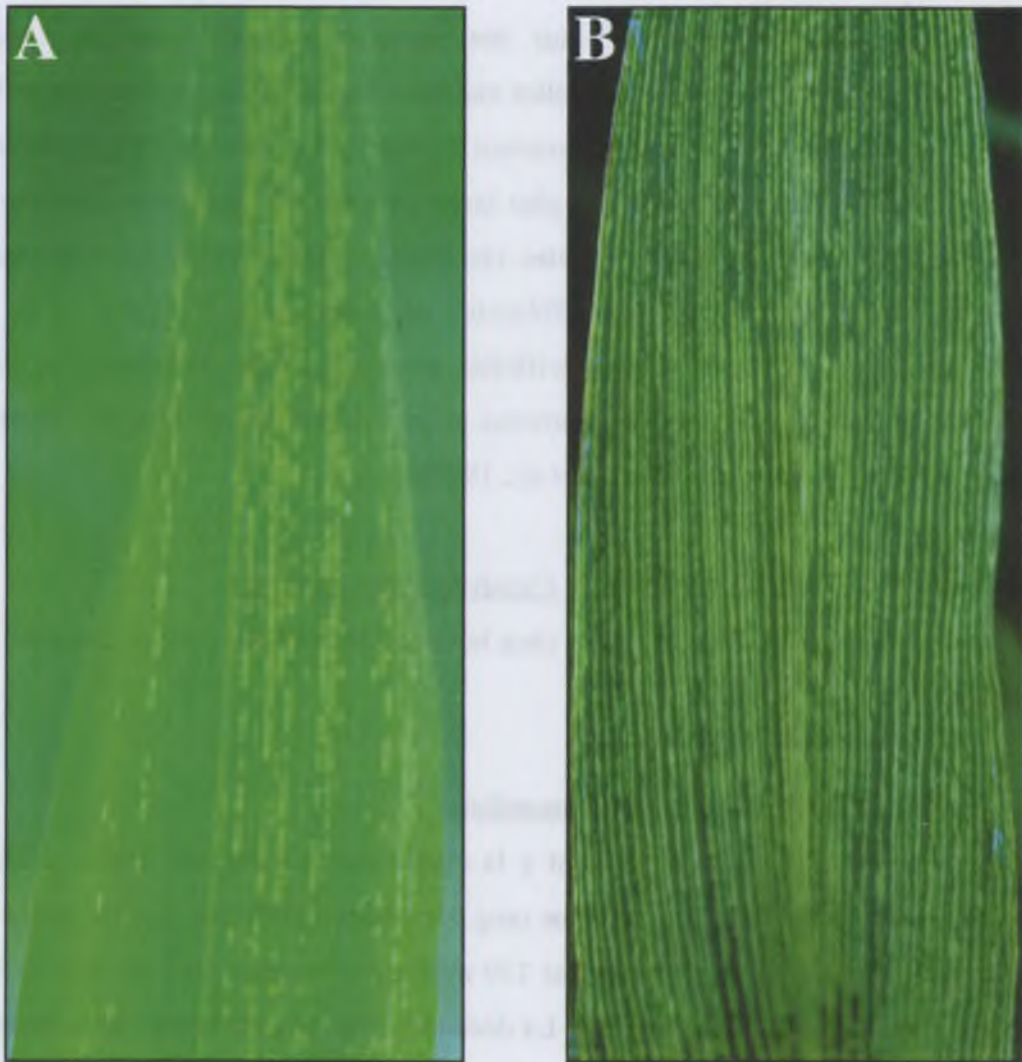


Figure 10. Symptômes chlorotiques de la maladie de la striure sur variété sensible de maïs. (A) Premiers symptômes de la maladie sur jeune feuille : petites taches chlorotiques circulaires formant des stries. (B) Symptômes avancés de la maladie formant des lignes chlorotiques le long des nervures.

absents. Les jeunes plantes sont les plus vulnérables, car la virose s'exprime sur tous les tissus néoformés après l'infection (Peterschmitt *et al.*, 1992).

Les premiers symptômes de la maladie de la striure apparaissent sur les feuilles produites après l'infection. Ce sont de petites taches chlorotiques circulaires, de 0,5 à 2 mm de diamètre, dispersées le long de la feuille (Figure 10). Au cours de la croissance de la plante, la fréquence des taches augmente progressivement touchant toutes les nouvelles feuilles formées. Seules les feuilles déjà déroulées au moment de l'infection restent indemnes de symptômes. Avec le développement de la maladie, des taches de plus en plus allongées apparaissent sur les jeunes feuilles, dans le sens de la longueur, formant des stries caractéristiques dont est issu le nom de la maladie.

Dans les cellules végétales, les particules virales se présentent le plus souvent sous forme d'arrangements cristallins (Figure 6 ; Pinner *et al.*, 1993 ; Bigarré, 1999). Les virions sont principalement observés dans le noyau des cellules infectées. Leur présence dans le cytoplasme est vraisemblablement liée à la rupture de la membrane nucléaire. La structure des chloroplastes est très affectée par l'infection.

Epidémiologie de la maladie.

Tous les mastrévirus provoquent des maladies à striures dont les symptômes sont équivalents. La gamme d'hôtes naturels du MSV est difficile à définir avec exactitude car la majorité des observations se sont faites avant le développement de techniques précises de diagnostics comme la sérologie ou l'outil moléculaire. En testant la transmission d'un isolat de MSV provenant du Nigeria, Damsteegt (1983) montre que 60% des *Poaceae* pérennes et annuelles testées développent la maladie de la striure. La gamme d'hôtes du MSV semble donc très large au sein des *Poaceae* sauvages et cultivées. Plusieurs de ces graminées, hôtes du MSV et des cicadelles, peuvent être considérées comme des réservoirs de la maladie de la striure car elles sont trouvées au voisinage des cultures de maïs infectés (Mesfin *et al.*, 1992).

La modélisation de la dynamique spatiale d'une épidémie de MSV sur maïs montre que la courbe logistique est un bon descripteur de la progression de la maladie (Smith *et al.*, 2000). La dispersion de la maladie semble être corrélée à la capacité de vol à longue distance des cicadelles du genre *Cicadulina*. En utilisant les courants ascendants et les vents en général, la capacité de dispersion maximale est estimée à une centaine de kms pour *C. mbila*, qui semble être plus élevée que celles de *C. parazeae* et de *C. storeyi* (Rose, 1978). La progression

spatiale de l'épidémie est également influencée par la différence de comportement entre les insectes mâles et femelles, dans la recherche du partenaire sexuel (Downham *et al.*, 1997). En effet, les mâles se déplacent sur de longues distances, ce qui semble influencer l'expansion de la maladie (Smith *et al.*, 2000). Les femelles restent le plus souvent sur la même plante, réalisent plus d'ingestion dans le phloème et de ce fait semblent jouer un rôle plus important dans la transmission virale.

La lutte contre la maladie de la striure.

Pour réduire l'incidence de la maladie, les premières stratégies de lutte ont porté sur la limitation de la population d'insectes vecteurs par des techniques culturales et l'utilisation d'insecticides. Outre le danger pour l'environnement, la lutte chimique demande des moyens financiers qui ne peuvent pas être supportés par l'agriculture vivrière du maïs en Afrique. C'est pourquoi, l'utilisation de variétés résistantes ou tolérantes au MSV s'est imposée comme le moyen le plus adapté pour lutter contre cette virose.

La recherche de résistances naturelles et la création de variétés résistantes ont été initiées par plusieurs équipes de recherches en Afrique, avec comme critère de sélection la densité de stries sur les feuilles (Efron *et al.*, 1989 ; Kim *et al.*, 1989 ; Barrow, 1992 ; Rodier *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1999 ; Pernet *et al.*, 1999a, 1999b). Des résistances partielles et complètes ont été sélectionnées dans des ressources génétiques d'Afrique et d'Amérique centrale et sont actuellement utilisées avec succès.

Dans l'ensemble, les essais portant sur la création de plantes transgéniques résistantes aux géminivirus, dont les séquences d'insertion utilisées présentent une homologie avec le virus cible, ont donné peu de résultats (Bigarré, 1999). Par conséquent, malgré la lourdeur des programmes de sélections, les résistances naturelles aux géminivirus et à leurs vecteurs apparaissent à ce jour comme un moyen efficace de réduire significativement les pertes de rendement.

3.3. Le Maize streak mastrevirus (MSV)

Membre type du genre *Mastrevirus*.

Le MSV a un génome composé d'ADN circulaire simple brin, comme tous les géminivirus. Contrairement à certains bégomovirus, le genre des mastrevirus est constitué d'un seul

Tableau 2. Les espèces du genre *Cicadulina* vectrices et non vectrices du *Maize streak virus* (MSV)(d'après Webb, 1987).

Vecteur du MSV	Distribution géographique
<i>C. arachidis</i>	Afrique de l'Ouest
<i>C. bipunctata</i>	Afrique Nord et Est, Australie, Pacifique, Asie et Inde
<i>C. ghaurii</i>	Niger, Cameroun, Ethiopie
<i>C. latens</i>	Kenya, Nigeria
<i>C. mbila</i>	Afrique, Inde, Asie du Sud-Ouest
<i>C. parazeae</i>	Afrique du Sud, du Centre et de l'Est
<i>C. similis</i>	Afrique de l'Ouest
<i>C. storeyi</i>	Afrique
Non vecteur du MSV	Distribution géographique
<i>C. anestae</i>	Afrique du Sud, Mozambique
<i>C. bimaculata</i>	Australie et Pacifique
<i>C. chinaï</i>	Inde, Egypte, Soudan, Kenya
<i>C. dabrowskii</i>	Nigeria, Cameroun, Tchad, Soudan
<i>C. gerhardi</i>	Afrique Centrale et du Sud
<i>C. hartmansi</i>	Nigeria, Côte d'Ivoire
<i>C. hastula</i>	Zambie
<i>C. immaculata</i>	Zaïre
<i>C. fijiensis</i>	Pacifique et Népal
<i>C. niger</i>	Soudan, Ethiopie, Kenya, Tanzanie
<i>C. pastusae</i>	Amérique du Sud
<i>C. theroni</i>	Tanzanie, Zaïre, Afrique du Sud
<i>C. tortilla</i>	Amériques du Sud et Centrale
<i>C. vescula</i>	Zaïre, Zambie, Zimbabwe

composant qui dans le cas du MSV a une taille de 2685 pb (Figure 5 ; figure 1 de l'article N°3).

Distribution géographique.

Le MSV a été identifié sur le continent africain dans toute la zone sub-saharienne, dans les îles du Cap Vert, à Madagascar et dans les îles des Mascareignes (Thottappilly *et al.*, 1993). Le MSV est avant tout un virus africain. Des symptômes typiques de striures ont été décrits en Inde (Seth *et al.*, 1972), mais le virus n'y a jamais été identifié. Etant donné que les espèces du genre *Cicadulina* ne sont pas limitées à l'Afrique, il existe une possibilité réelle de propagation de la maladie vers l'Asie du Sud-Est et l'Australie (Rose, 1978).

3.4. Les cicadelles du genre *Cicadulina*

Classification et distribution géographique.

Le genre *Cicadulina* est classé selon la classification traditionnelle dans le super-ordre des Hémiptéroïdes, l'ordre des *Homoptera*, le sous-ordre des *Auchenorrhyncha*, la famille des *Cicadellidae* et la sous-famille des *Deltocephalinae*. La première revue et la première clé de détermination, basées sur les *genitalia* mâles, ont été publiées par Ruppel (1965). Plus récemment, le genre a été revu par Webb (1987) et comprend 22 espèces (Tableau 2). Quatorze sont endémiques à l'Afrique, quatre sont communes à l'Afrique et à l'Asie (jusqu'au nord de l'Australie), une est présente dans le Nord-Est de l'Australie et dans le Pacifique, une autre dans le Pacifique et au Népal et deux dans le Nouveau Monde. Le nombre important d'espèces recensées, surtout dans la région éthiopienne suggère une origine africaine du genre *Cicadulina*.

Biologie et description morphologique.

Les cicadelles du genre *Cicadulina* se nourrissent et se reproduisent sur une large gamme d'espèces de *Poaceae* comprenant des graminées sauvages et des graminées cultivées. Ce genre est très homogène pour la structure du corps, de la tête et des ailes ainsi que pour de nombreux caractères de l'appareil reproducteur mâle, mais se distingue généralement par des variations de la coloration de la robe (Figure 11 ; Webb, 1987). De l'œuf à l'adulte, cinq stades larvaires ont été décrits. Les adultes, d'environ 3 mm de long, ont majoritairement une tête jaune ornée de points noirs caractéristiques du genre (Figure 11).

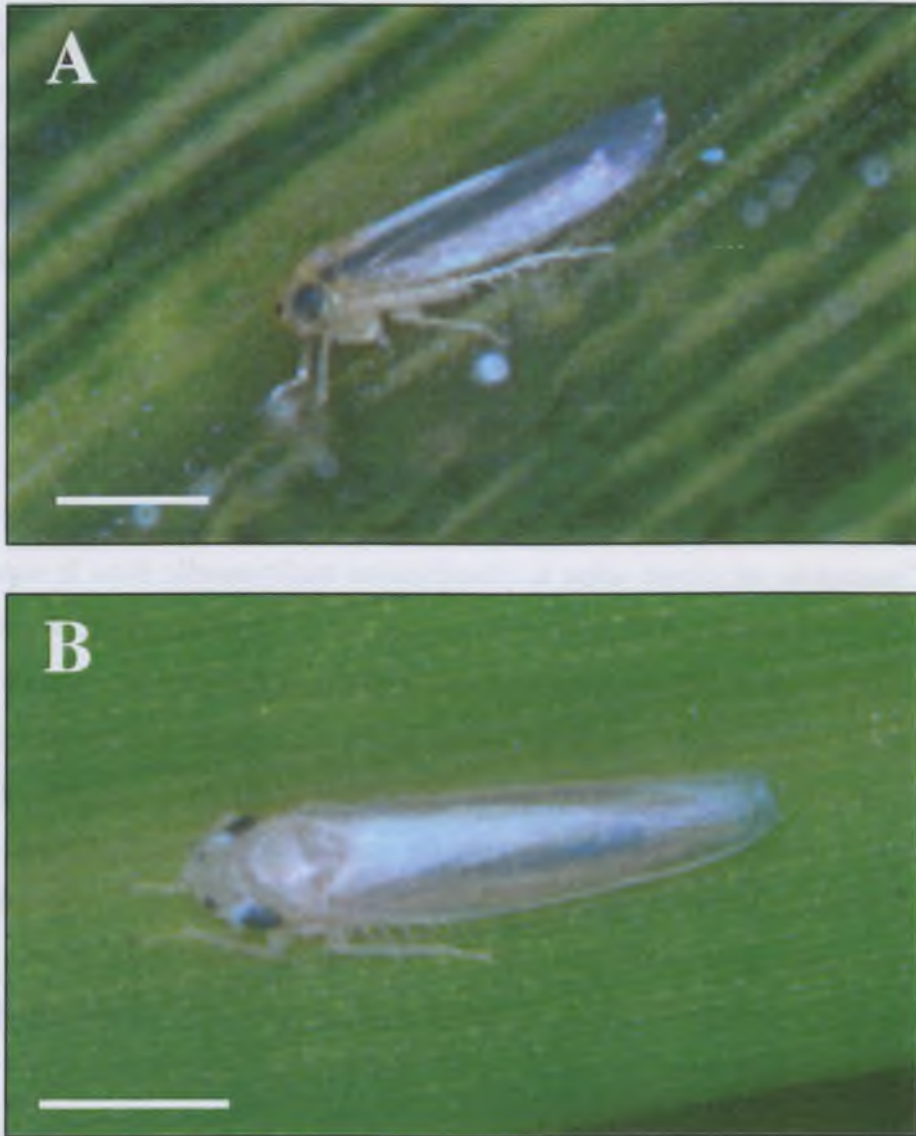


Figure 11. Insectes adultes du genre *Cicadulina*. (A) *C. mbila* sur une feuille de maïs présentant des symptômes de striures. (B) *C. chinai* sur une feuille de mil. Noter la présence des deux taches noires caractéristiques du genre sur le devant de la tête et la robe plus claire de *C. chinai*. Barres = 1 mm.

Espèces vectrices du MSV.

En conditions naturelles, la transmission du MSV au maïs s'effectue exclusivement par son insecte vecteur. Huit espèces du genre *Cicadulina* ont été décrites comme vectrices du MSV (Tableau 2 ; Webb, 1987). Elles sont principalement réparties sur le continent Africain.

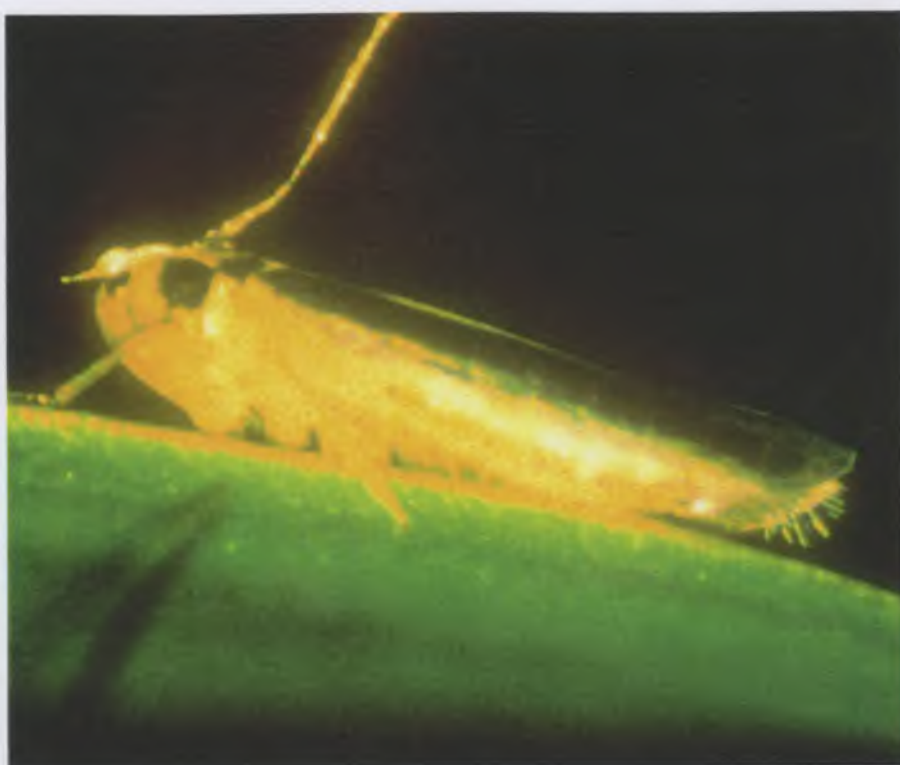
A la Réunion comme en Afrique, *C. mbila* Naudé (1924) est le principal et le plus efficace vecteur du MSV (Markham *et al.*, 1984 ; Reynaud, 1988). Dans les populations naturelles de *C. mbila*, Storey (1932) a montré l'existence d'insectes actifs, capables de transmettre le MSV, et inactifs, inaptes à la transmission du MSV. L'aptitude à transmettre le virus est un caractère d'héritabilité et contrôlée génétiquement par un gène majeur dominant, lié au chromosome sexuel X (Storey, 1932 ; Reynaud, 1988). Les taux de transmission des populations naturelles semblent assez variables : 30% au Nigeria (Okoth *et al.*, 1987), plus de 50% à la Réunion (Delpuech, 1985 ; Reynaud, 1988), 60% en Afrique du Sud (Graham, 1979), 70 à 96% en Ethiopie (Mesfin *et al.*, 1991). Ce pourcentage de transmission est variable selon l'utilisation d'insectes femelles ou mâles ; les femelles de *C. mbila* semblent être de meilleurs vecteurs que les mâles. L'obtention de lignées de *C. mbila*, dans lesquelles 100% des individus sont capables de transmettre le MSV, est possible par un schéma de sélection simple impliquant des croisements frère-sœurs contrôlés (Reynaud, 1988).

Le mode de transmission et le cycle du MSV dans *C. mbila* a été étudié par Storey entre 1920 et 1940. Dans des études très détaillées, il observe que *C. mbila* est capable d'acquérir le virus après une alimentation de quelques secondes dans une zone chlorotique du mésophylle d'une feuille virosée (Storey, 1938). Il montre que l'inoculation du virus dans une nouvelle plante nécessite une période alimentaire plus longue, d'une dizaine de minutes. De plus, il déduit par des observations histologiques des gaines sétales que l'inoculation requiert une pénétration dans le phloème (Storey, 1938, 1939). Lors d'une alimentation infectieuse, la cicadelle n'est apte à transmettre le virus qu'après une période de latence (16 à 20 heures), qui augmente quand la température baisse (Storey, 1938). Par la suite, la capacité de transmission du MSV persiste pendant toute la durée de vie de l'insecte (30 à 40 jours), mais n'est pas transmise à la génération suivante. Tous les stades larvaires ont la capacité d'acquérir et de transmettre le MSV, qui est gardé pendant les mues. L'infection d'individus non virulifères par insertion dans la cavité abdominale d'organes ou de tissus d'individus virulifères permet à Storey (1938) de montrer que le virus est le plus abondant dans le tractus intestinal et qu'il ne semble

présent qu'en faible quantité dans les glandes salivaires des insectes virulifères. La persistance du MSV pendant toute la durée de vie de *C. mbila*, suite à une acquisition de quelques secondes, lui suggère que le MSV doit se multiplier dans son vecteur, même si la période de latence est très courte comparativement aux autres virus multipliants. Par l'intermédiaire de piqûres réalisées sur le tractus intestinal, il transforme des individus inactifs en individus actifs et par la même démontre l'existence d'une barrière intestinale (Storey, 1932).

Depuis les travaux pionniers de Storey, très peu de nouvelles données sont disponibles pour éclaircir la nature de la spécificité de la transmission du MSV par *C. mbila*. L'absence de multiplication du virus dans son vecteur a été suggéré et le virus est considéré comme un virus circulant non multipliant (Boulton & Markham, 1986 ; Reynaud & Peterschmitt, 1992).

Chapitre I



Cicadelle en alimentation sur une feuille de maïs et branchée par l'intermédiaire d'un fil d'or au système d'électropénétrographie.

Chapitre I.

Comportement alimentaire de *Cicadulina mbila* sur maïs analysé par électropénétrographie (EPG) et par microscopie électronique (MET), et conséquences sur l'efficacité de la transmission des géminivirus.

I.1. Introduction et Objectifs

La transmission des phytovirus par des insectes phytophages a fait l'objet de nombreuses études qui visaient à mieux comprendre l'influence du comportement des vecteurs sur la propagation des viroses. Ces travaux ont permis de déterminer un certain nombre de paramètres descriptifs du vecteur impliqué dans l'épidémiologie des viroses. Premièrement, des paramètres éthologiques des vecteurs, tels que les distances de vol, les préférences d'hôtes et les périodes de pullulation. Deuxièmement, des paramètres biologiques du cycle de transmission dont les temps minimums d'AAP et d'IAP du virus, le temps de latence et la persistance de la capacité de transmission (Voir Article N°1). En revanche, les chercheurs se sentaient relativement désarmés pour comprendre ce qui détermine les paramètres du cycle de transmission et pour analyser la phase cachée du cycle de transmission virale, correspondant aux activités des stylets de l'insecte dans les tissus de la plante.

Les premières connaissances sur le cheminement *in situ* des stylets des insectes ont été formulées à partir de l'observation des gaines salivaires des pucerons en microscopie optique. Cependant, les observations réalisées par la suite en microscopie électronique sur l'ultrastructure des tissus traversés par les stylets ont montré les limites des observations réalisées en microscopie optique (Tjallingii & Hogen-Esch, 1993).

Ces dernières années, les études du comportement alimentaire des insectes piqueur suceurs ont été facilitées par le développement de systèmes d'électrophysiologie nommés électropénétrographie (EPG). Le premier système opérationnel était basé sur l'utilisation d'un courant alternatif (EPG-AC)(McLean & Kinsey, 1967). Cette technique consiste à intégrer l'insecte et la plante dans un circuit électrique, dans lequel on peut suivre les variations de potentiel au cours de la pénétration des stylets de l'insecte dans les tissus du végétal (Figure 12). Certains signaux électriques, principalement liés aux fluctuations de la résistance du système insecte/plante (R ; Reese *et al.*, 2000), ont pu être corrélés avec différentes phases de

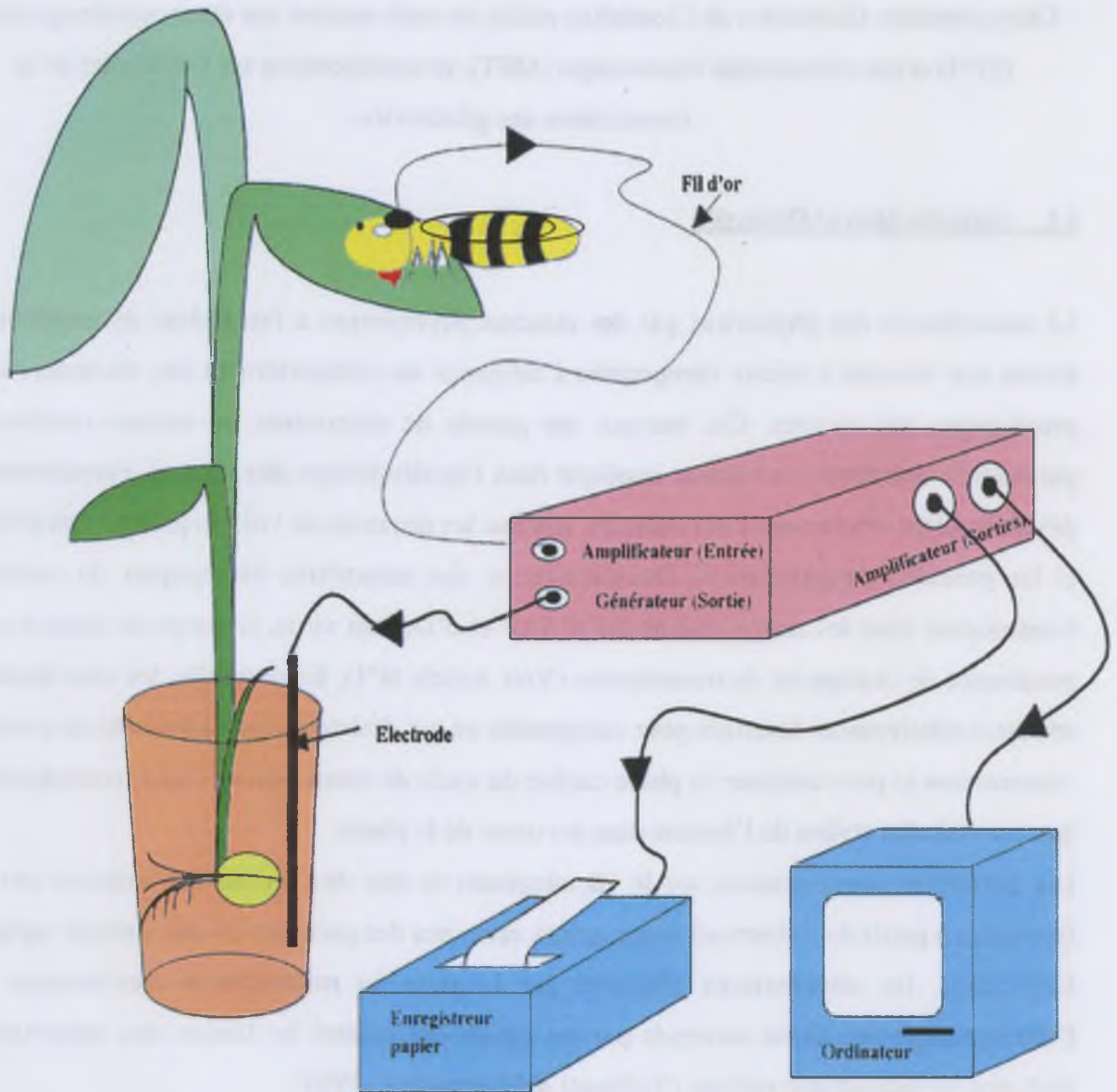


Figure 12. Représentation schématique du montage électrique utilisé en électropénétrographie (EPG). Le système EPG permet d'étudier le comportement alimentaire d'un insecte piqueur suceur. Un fil d'or est fixé sur le prothorax de l'insecte par l'intermédiaire d'une colle conductrice à l'argent. L'insecte est connecté à un amplificateur et relié à un enregistreur papier et à un ordinateur. L'enregistrement papier permet un suivi temporel de l'activité de l'insecte. L'ordinateur converti les signaux analogiques amplifiés et enregistre les données en valeurs numériques.

l'alimentation des pucerons grâce à la microscopie photonique (McLean & Kinsey, 1967). Par la suite, la technique fut améliorée par l'utilisation d'un courant continu (EPG-DC) et d'un amplificateur à haute impédance d'entrée (Tjallingii, 1978). Les signaux recueillis ont pour origine les variations R, ainsi que celles des activités électriques endogènes comme les forces électromotrices (emf) générées par l'insecte et les potentiels membranaires de la plante (Tjallingii, 1988, 2000). La sensibilité du système DC aux deux composantes, R et emf, lui confère un pouvoir de résolution supérieur au système initial en AC.

Le dispositif utilisé dans notre étude est conforme à celui employé par Tjallingii (1985a ; figure 12). L'insecte est relié à l'amplificateur par l'intermédiaire d'un fil d'or collé sur le prothorax de l'insecte, avec une colle conductrice à l'argent. L'amplificateur est connecté à un enregistreur papier, qui permet de suivre l'activité de l'insecte en temps réel, et à un ordinateur, qui convertit les signaux analogiques amplifiés en valeurs numériques et les enregistre. Les données numériques offrent la possibilité de distinguer statistiquement et graphiquement les signaux, et de les décomposer en fréquences élémentaires et en amplitudes relatives.

L'outil EPG-DC développé et amélioré principalement par des études réalisées sur les pucerons permet de caractériser huit signaux différents (Tableau 3 ; Tjallingii, 1978, 1988 ; Reese *et al.*, 2000). Basés sur des observations visuelles de la sécrétion de la gaine sétale, des marquages radioactifs, des observations ultrastructurales et de transmission virale (Kimmins & Tjallingii, 1985 ; Spiller *et al.*, 1990a ; Tjallingii & Hogen-Esch, 1993 ; Prado & Tjallingii, 1994 ; Kimmins & Bosque-Perez, 1996), ces différents signaux ont été corrélés avec des activités de pénétrations dans les tissus végétaux, des localisations tissulaires de l'extrémité des stylets et des activités musculaires de l'insecte (Tableau 3).

Pour les cicadelles, la plupart des études EPG ont été réalisées avec le système AC (Voir Article N°2). Les signaux ainsi obtenus ont été interprétés par extrapolation des signaux obtenus chez les pucerons et n'ont pas été corrélés avec des observations ultrastructurales. Ces études antérieures n'ont pas réussi à mettre en évidence des spécificités du comportement alimentaire des cicadelles par rapport aux pucerons. Or, on sait que contrairement aux pucerons, les cicadelles ne sont pas strictement phloémophages. Selon leur appartenance à des sous-familles, les différentes espèces de cicadelles de la famille *Cicadellidae*, sont considérées comme mésophyllophages (sous-famille *Typhlocybinae*), xylémophages (sous-famille *Cicadellinae*) ou polyphages (la plupart des sous-familles, dont les

Tableau 3. Signaux caractéristiques enregistrés en électropénétrographie (EPG système DC) chez le puceron lors d'une alimentation sur plante et corrélations avec les activités biologiques de l'insecte (d'après Reese *et al.* , 2000).

Types de signaux EPG	Corrélations biologiques	
	Localisation tissulaire	Activité de l'insecte
np	Aucun tissu	Non piquê
A	Epiderme	Contact stylets / plante
B	Epiderme + mésophylle	Salivation gaine sétale
C	Tous les tissus	Activités de pénétration des stylets autres que A, B et pd
F	Tous les tissus	Activités mécaniques des stylets
pd	Toute cellule vivante	Ponction intracellulaire brève (Powell <i>et al.</i> , 1995) Acquisition / inoculation virus non circulant non persistant (Martin <i>et al.</i> , 1997)
G	Xylème	Ingestion active (Spiller <i>et al.</i> , 1990)
E1	Phloème	Salivation corrélée à l'inoculation des virus circulants non multipliants : BYDV (Prado et Tjallingii, 1994) et MSV (Kimmins et Bosque-Perez, 1996)
E2	Phloème	Ingestion passive + salivation acqueuse corrélées à l'acquisition des virus circulants non multipliants : <i>Barley yellow dwarf luteovirus</i> (BYDV)(Prado et Tjallingii, 1994)

Deltocephalinae)(Nielson, 1968). De plus, comme cela a été montré pour *C. mbila* (*Cicadellidae* : *Deltocephalinae*), le ou les types tissulaires dans lesquels sont réalisés les alimentations sont variables selon l'espèce végétale hôte (Mesfin *et al.*, 1995). Sachant, que la plupart des cicadelles de la sous-famille des *Deltocephalinae* sont des vecteurs de phytovirus, il était suggéré que la polyphagie des cicadelles représentait un facteur déterminant dans la transmission des virus.

L'objectif de cette étude était donc d'analyser le comportement alimentaire d'une cicadelle vectrice de virus, en utilisant l'EPG-DC et la MET, dans le but de corréler les signaux EPG aux activités alimentaires et à la localisation cellulaire des stylets. Nos travaux ont porté sur le modèle de transmission circulante non multipliante du MSV par *C. mbila*. Des études préliminaires en EPG-DC sur une autre espèce vectrice du MSV, *C. storeyi*, ont permis de corréler la transmission du MSV à un signal de type E1 des pucerons (Kimmins & Bosque-Perez, 1996). Cependant, ces travaux ne fournissaient aucune analyse détaillée des signaux EPG et aucune corrélation entre les différents signaux et la localisation tissulaire et cellulaire de l'activité alimentaire.

Nos résultats en EPG et en MET sur le comportement alimentaire de *C. mbila* sont présentés sous la forme d'un article soumis à la revue *Entomologia Experimentalis et Applicata*. Ils sont discutées en relation avec la capacité des cicadelles à acquérir et à transmettre des géminivirus, comparativement à d'autres vecteurs de virus circulants non multipliant les aleurodes et les pucerons. Une discussion en français rappellera les grandes lignes de celle de l'article et la complètera par quelques éléments plus spéculatifs sur l'implication du comportement alimentaire dans la transmission des virus.

I.2. Article N°2 soumis à la revue *Entomologia Experimentalis et Applicata*

Electrical penetration graphs from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathways and consequences for virus transmission efficiency

Jean-Michel Lett¹, Martine Granier¹, Martial Grondin², Patrick Turpin², Frederic Chiroleu², Michel Peterschmitt¹ & Bernard Reynaud^{2§}

CIRAD-AMIS, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, ¹Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes, TA 40/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France, ²Pôle de Protection des Plantes, Station Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France (Fax : 0262 35 76 41; E-mail : reynaud@cirad.fr)

§ : to whom the proofs have to be sent

Key words : leafhopper, *Zea mays*, virus vector, electrical penetration graph, microcautery, electron microscopy

Abstract

Five distinct electrical penetration graph (EPG) waveforms characterizing the feeding behaviour of the leafhopper *Cicadulina mbila* Naudé (*Homoptera* : *Cicadellidae*) on maize (*Zea mays* L.) were obtained by a DC based system. The waveforms were distinguished by statistical analysis of their medians and their durations and by their spectral features. By changing the polarity of the system voltage and the level of the input resistor it was shown that the waveforms are mainly determined by the electromotive forces (emf) component. Based on the correlation between waveforms and the fine structure of the stylet pathways using transmission electron microscopy (TEM), feeding activities were associated with each of the five waveforms: stylet pathway (waveform 1), active ingestion (waveform 2), stylet work (waveform 3), salivation (waveform 4) and passive ingestion (waveform 5). Like waveform E1 and E2 of aphids, waveforms 4 and 5 of *C. mbila* correspond to feeding activities in phloem tubes. However, unlike aphids which only briefly probe in non vascular cells, waveform 2 correspond to active ingestion in non vascular cells, which are partially emptied of their cell content and are severely affected in their organelles integrity. It is suggested that this specific feeding feature typical of leafhoppers is determinant of their efficiency to acquire nucleus located geminivirus virions.

Introduction

The study of the feeding behaviour of phytophagous insects provides information on the close interactions between host plants and insects. This information is useful to develop control methods against insect pests particularly through plant breeding (Kennedy, 1976; Monttlor & Tjallingii, 1989; Caillaud *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Klingler *et al.*, 1998). Moreover, if insects are vector of viruses, feeding behaviour is determinant of virus transmission efficiency and consequently of the epidemiology of the virus.

During the last decades, feeding behaviour studies of piercing-sucking insects were progressively facilitated due to the development of electronic monitoring systems also called electrical penetration graph (EPG). The first successful attempt was based on an AC electronic system (McLean & Kinsey, 1967). This system has been changed and improved over the years while simultaneously a DC based system has been developed (Tjallingii, 1978). Seven waveforms have been recorded using a DC system (Tjallingii, 1978; Spiller, 1990). Based on visual observation of saliva sheath secretion, ³²P labelling, ultrastructural observations and virus transmission (Kimmins & Tjallingii, 1985; Spiller, 1990; Tjallingii & Hogen-Esch, 1993; Prado & Tjallingii, 1994), these waveforms were correlated with penetration activities and stylet tip positions. Waveforms A, B, and C correspond to salivation and pathway activities, pd (potential drops) to intracellular punctures during C, E1 to salivary secretion into the sieve element, E2 to phloem sap ingestion, F to putative mechanical stylet work and G to xylem ingestion. A recent comparison between AC and DC systems (Reese *et al.*, 2000) showed that, apart of X waveform, each waveform recorded with the AC system correspond to several feeding activities correlated with DC system waveforms. Finally, in spite of previous speculations, no definite feeding activity could be correlated with the X waveform recorded with the AC system, although a similar waveform was recently recorded with the DC system. Histological studies preferably transmission electron microscopy (TEM) will be required to correlate the X waveforms to feeding activities.

In the case of leafhoppers, most of the EPG studies were carried out with the AC systems: *Hordnia circellata* Baker (Crane, 1970), *Macrosteles fascifrons* Stal (Kawabe & Mac Lean, 1978), *Nephotettix cincticeps* Uhler (Kawabe & Mac Lean, 1980; Kawabe *et al.*, 1981). The waveforms obtained with leafhoppers were generally interpreted in comparison with those obtained with aphids. The uncharacterized X waveform was also recorded and was correlated in the case of *Graminella nigrifrons* Forbes with *Maize chlorotic dwarf virus* transmission to

maize (Wayadande & Nault, 1993). The AC system was also used (i) to characterize the resistance of rice cultivars to *Nephotettix virescens* Distant (Rapusas & Heinrichs, 1990), (ii) to obtain evidence that the potato leafhopper, *Empoasca fabae* Harris was not strictly ingesting from phloem (Hunter & Backus, 1989), and (iii) to compare the feeding behaviour of *Cicadulina mbila* on different host plants (Mesfin *et al.*, 1995).

These EPG studies, using non optimal AC systems, relying on aphid based interpretations and without any correlation of the waveforms to ultrastructural studies of penetration activities and stylet tip positions, were not able to characterize the polyphagous feeding activity of leafhoppers. Depending on their sub-families, the leafhopper species belonging to the *Cicadellidae* family are either mesophyll feeders, particularly members of the tribe *Erythroneurini* which are exclusively mesophyll feeders (sub-family *Typhlocybinae*), xylem feeders (sub-family *Cicadellinae*) or polyphagous feeders relying on different tissues for their feeding (most of the *Cicadellidae* sub-families, particularly *Deltocephalinae*)(Nielson, 1968). Moreover, as shown for *C. mbila* (Mesfin *et al.*, 1995), a species of the sub-family *Deltocephalinae*, their feeding behaviour can be shifted to different tissues according to the host species. This polyphagous feeding behaviour in the *Deltocephalinae* sub-family may explain why, most of the leafhoppers which are vector of viruses, belong to this sub-family.

The aim of this study was to further analyse the feeding specificity of leafhoppers, but based on a DC system and on transmission electron microscopy to correlate the waveforms to feeding activities and stylet positions. The test animal is *Cicadulina mbila*, a leafhopper which is vector of geminiviruses in a circulative non propagative manner (Reynaud & Peterschmitt, 1992). This leafhopper is economically important as vector of the most damaging virus disease of maize in Africa, which is caused by the *Maize streak geminivirus* (MSV). Preliminary DC EPG studies are available on a species belonging to the same genera, *Cicadulina storeyi* China (Kimmins & Bosque-Perez, 1996). However, although they showed a correlation between MSV transmission and an E1-like waveform, they did not provide a detailed analysis of the EPG signals and did not correlate the significant waveforms with the fine structure of the stylet route in the plant tissue using histological studies.

The EPG results obtained with *C. mbila* are discussed in relation to the efficiency of leafhoppers to transmit geminiviruses and are compared to the EPG studies of another vector

of geminiviruses, the whiteflies from the *Bemisia* genus (Lei *et al.*, 1998; Johnson & Walker, 1999) .

Materials and methods

Insect and plant material

The leafhoppers used in this study were young females (1 to 5 days after imaginal moult) obtained from a *Cicadulina mbila* line in which 100% of the insects were able to transmit MSV (Reynaud, 1988). This population was maintained on millet plants (*Pennisetum typhoides*) under climatic chamber at 25°C and L16:D8 photoperiod. All the experiments were carried out on 2 to 3 leaf stage plants of the temperate maize hybride Sabrina (Pioneer), highly susceptible to MSV.

EPG experiment and data acquisition

The set-up was identical to that used by Tjallingii (1985). The EPG equipment was housed in a climatised room (25 +/- 2 °C) insulated from electrical noise by a Faraday cage. The DC amplifier used was an EPG Giga 4 model (Wageningen Agricultural University, The Netherlands). It was linked to a paper recorder (WR 7400, Graphtec) and an AT Pentium 120 microcomputer running Viewdac (Keithley) software for acquiring and processing data. A DAS-16 card (Keithley Metrabyte Corporation) was used for converting the signals of the four channels into digital data. The data were acquired at 100 Hz sample frequencies and stored on the hard disk and displayed on screen every 10 s time interval. The digital data were analysed with the software Matlab version 5.1 (Scientific Software).

Since *C. mbila* is a very active flying insect, the young females had to be handled for wiring with a vacuum needle under a stereo microscope (Olympus, Tokyo, Japan). A gold wire of 17.5 µm in diameter was attached to the prothorax of the leafhopper with a conductive silver glue (type L2027, Demetron, France).

Electronic parameter adjustment

Twenty two recordings, of six hours each, were carried out to characterise the different waveform classes. The same amplifier settings were used for all the recordings ; the gain and additional plant supply were adjusted to obtain a positive voltage for the first probe, so that the

median of the first class 2 waveform (characterized in this study) was around 1 volt and the amplitude around 2 volts. For each waveform, a large number of temporal traces of different durations referred to as periods, were observed. For spectral analysis, the Fast Fourier transform (FFT) algorithm function was used to trace the spectrum of a given digitised waveform slice.

To determine the electrical origin of each waveform, the system voltage was adjusted successively negatively and positively, by changing the zero volt level (baseline), as already described for aphids to emphasize the emf (electromotive forces) components (Tjallingii, 2000). Moreover, to better determine this emf component, one amplifier with variable input resistor from 10^9 ohm (normal or EPG mode) to 10^{15} ohm (emf mode) was used (Tjallingii, 2000). A calibration pulse of 50 mV was done at each adjustment of plant voltage supply or each switching of input resistor. The comparison between EPG and emf modes was done for a minimum of 4 different recordings of each waveform.

Data analysis

Nine recordings were selected for waveform analysis since they contained periods of each of the five waveforms. The analysed variables were the median and the duration of the periods of each waveform class. The means of each variable were calculated for each waveform, based on the nine recordings. The qualitative effect taken into consideration is the waveform class. Since the variances were not homogenous (PROC GLM, SAS 6.12, SAS Institute), the non-parametric rank test of Wilcoxon-Mann-Whitney has been performed to compare the sample means by waveform class, two by two (PROC NPAR1WAY, SAS 6.12, SAS Institute).

Stylet amputation and its localisation in leaf tissue

The probing sites corresponding to characteristic EPG waveforms were analysed by TEM. Stylet amputations were carried out during some of these waveforms with high frequency (HF) microcautery (Syntech ; CA-50). About 0.1 cm^2 of the leaf tissue containing the stylet stump was then cut out and fixed for 2 hours in a 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.1) containing 2 % glutaraldehyde at room temperature and post fixed in 1 % osmium tetroxide for 1 hour at room temperature. The samples were dehydrated up to 100 % ethanol and embedded in an Epon resin. Stylet pathways were first located by optical microscopy with semi-thin 500 nm sections. As soon as the salivary sheath is observed, the thickness of the sections is reduced to

80 nm to follow the stylet pathway using TEM. They were collected on 50 mesh copper grids covered with a 2 % collodion film, and double stained with uranyl acetate and lead citrate. Sections were studied and micrographs were taken with a JEOL 100CXII electron microscope. Image analysis was processed with the software Adobe Photoshop.

Results

Electrical penetration graphs

The EPG recordings of *C. mbila* females on maize exhibited five distinct waveforms (Figure 1A to 1F). They were numbered from 1 to 5 according to the rank in which they generally appear during the recordings. No changes were observed in any of the five waveforms when the volt level was successively adjusted negatively or positively (results not shown).

The comparison between the waveforms recorded with normal or emf modes showed differences on the median of the waveforms but not on the other major parameters of the signal (frequencies, amplitude, peak or wave traces). The median of the waveforms was higher in normal mode than in emf mode, with a voltage difference of about 0.5 V for waveforms 2, 4 and 5 (Figure 2) and around 1 V for waveforms 1 and 3 (results not shown).

Statistical analysis of the medians as well as the durations of the periods of each waveform class showed no homogeneity of the variances for any of the two variables (p-value < 0.0001 with Brown-Forsythe test). Regarding the medians, the graphical analysis showed that this non homogeneity is due to a general shift of the medians of all the waveforms according to polarity or an increase of the recorded amplitude due to the amplification (results not shown). The rank test of Wilcoxon-Mann-Whitney showed that for both variables, all the waveform classes are significantly different at the level of 0.05, except waveforms 4 and 5 (Table 1). However, it should be noticed that the differences between waveforms 1 and 2, and between 2 and 3 are not significant for the durations at the level of 0.01 (p-value, respectively 0.02 and 0.04).

Probing always started with waveform 1. Waveform 1 periods were very frequent and in average of short duration (Table 1). The amplitude (minimum peak voltage to maximum peak voltage) of waveform 1 was highly variable and its trend moved rapidly either up or down (Figure 1A). Nevertheless the median was generally positive and significantly lower than the median of waveforms 2 and 3, and higher than the median of waveforms 4 and 5 (Table 1).

After a non probing phase (NP), waveform 1 starts by a short phase of about 1 to 5 s consisting of one or two peaks of high positive amplitude (1 to 2.5 volt) (Figure 1A). It is a complex waveform, which presents some sequence of characteristic pattern (results not shown). The FFT of waveform 1 showed generally a spectral band of low frequencies between 0 and 10 Hz. Predominant frequencies are observed between 0.05 and 0.2 Hz or between 1 and 6 Hz (Figure 1G).

Waveform 2 was generally recorded between waveform 1 periods. Waveform 2 periods occurred frequently. Their durations were variable but short in average (Table 1). Waveform 2 amplitude ranges between 1 to 3 V (Figure 1B). The median was always positive and significantly higher than the median of the other waveforms (Table 1). Waveform 2 exhibit quasi-square wave feature but generally the duration of the upper phase being about three time longer than that of the lower phase (Figure 1B). Along the high and the low plateau there are always small peaks (often two) and sometimes, one of this monophasic peak is well developed. The homogenous shape of waveform 2 is characteristic of a periodical signal. Its frequency calculated through FFT ranges between 5 and 7 Hz, with harmonic frequencies characteristic of a sinusoid wave (Figure 1H).

Waveform 3 appeared within waveform 2. Waveform 3 periods were two times less frequent than waveform 2 periods, and their average duration was near to the average duration of waveforms 1 and 2 but significantly different (Table 1). The median of waveform 3 was always positive and significantly different of waveforms 1 and 2 medians (Table 1). Waveform 3 is characterised by sequences of pointed peaks with negative deflection of high amplitude (0.5 à 1 V)(Figure 1C). Between each pointed peak the amplitude is very low (under 0.05 V) and the trend was positive : the signal increases asymptotically until recovering its original voltage level before the previous negative peak. The FFT calculations revealed a major frequency around 0.02 Hz which correspond to the pointed peaks and a spectral band around 7 Hz of much lower magnitude which probably correspond to the frequency of the low amplitude waves between the peaks (Figure 1I).

Waveform 4 appeared belatedly and always after a waveform 1 period. Waveform 4 periods did not occur frequently but their durations were long. The average duration of waveform 4

was around 33 min and significantly longer than average durations of waveforms 1, 2 and 3 (Table 1). The durations of waveform 4 periods were very homogenous, as shown by the corresponding standard deviation which was inferior to the average duration only for this waveform (Table 1). Waveform 4 median was always negative and significantly different from the median of waveforms 1, 2 and 3, with a maximum difference of 1 volt with waveform 2 (Table 1). Waveform 4 consist of a repetitive pattern composed successively by a monophasic positive peak, a negative wave and a second monophasic positive peak of higher amplitude (Figure 1D). Each pattern is separated regularly by a low amplitude signal with constant trend. The amplitude of waveform 4 ranged from 0.2 to 0.4 V but around every 10 min a peak of greater amplitude was observed (results not shown). The FFT calculation revealed a spectral band of low frequencies between 0 and 4 Hz and a second spectral band of low magnitude between 15 and 25 Hz (Figure 1J). The major frequency is observed between 0.3 and 0.8 Hz and more frequently around 0.4 Hz, which correspond to the characteristic peak of the waveform. Like all the other waveforms, waveform 4 includes a low frequency wave around 0.05 Hz. According to its relative importance with respect to the characteristic peak of 0.4 Hz, the temporal features of the waveform may be changed.

Waveform 5 was always preceded by at least one waveform 4 period of about 10 to 40 min. Waveform 5 periods were the least frequent but their average duration was significantly higher than the average durations of waveforms 1, 2 and 3, but not of waveform 4. This waveform could last for hours. The medians of waveforms 4 and 5 were not significantly different (Table 1). The amplitude of waveform 5 ranges between 0.05 and 0.2 V (Figure 2). Two patterns could be distinguished in waveform 5 : waveform 5a which is always recorded at the beginning of a waveform 5 phase and waveform 5b which progressively replaces waveform 5a when the duration of waveform 5 phase is long enough. Thereafter, the sequence of 5a followed by 5b is eventually repeated several times but separated by short waveform 4 periods (below 1 min)(Figure 2A, B and C). Waveform 5a exhibit a sequence of peaks of similar shape and apparently occurring at the same intervals as those of waveform 2 but with a much lower amplitude (Figures 1F and B). The duration of the upper phase is three time longer than the lower one and along the upper phase there are always small peaks. The FFT calculation showed a fundamental peak between 5 to 7 Hz, and one or several harmonic frequencies with low magnitude as well as the constant peak of very low frequency (0.05 Hz)(Figure 1K). On

temporal trace, the peaks observed in waveform 5b are exactly symmetrical, about an horizontal line, with those of waveform 5a (Figures 1E and 1F). In waveform 5b, the duration of the lower phase is three time longer than the upper one and along the lower phase there are always small peaks. The median of the primary peaks varied because of a secondary wave with a much longer period. At the tops of this secondary wave, the primary peaks have a higher amplitude when compared to their amplitude at the bottoms of the secondary wave (Figure 2B and C). The FFT calculation revealed also a major frequency around 5 to 7 Hz which correspond to the primary small peaks and a lower frequency of about 0.05 Hz which correspond to the secondary waves (Figure 1L). This low 0.05 Hz frequency, also detected by FFT in all other waveforms, could in certain low amplitude 5b waveforms reach a magnitude which was three times higher than the magnitude of the 5 to 7 Hz frequency.

Relationship between EPG signals and the position of the stylets in the leaf tissues at the moment of microcautery

Microscopic observations revealed that the stylets were never seen in feeding position. They were either absent from the plant tissue, as in sample correlated with waveform 4, or their tips only were visible on the level of the epidermis, at the point of stylet penetration into the leaf lamina as in samples correlated with waveforms 2 and 5. Based on these observations, it was possible to estimate the diameters of the salivary canal (sc)(0.5 to 0.9 μm), the food canal (fc)(1.3 to 1.9 μm), and those of the maxillary stylets (mx)(4.0 to 7.0 μm)(Figure 3A). Observation of successive sections of the extremity of stylets showed that the salivary and alimentary canals merged to form a single canal (Figures 3B and C). Image analysis of the micrograph 3B confirmed the interlocking of two maxillary stylets mx and one mandibular stylet (md), probably dislocated by the disturbance created by the HF microcautery (Figure 3C).

However, although HF microcautery was not sudden enough to prevent stylet withdrawal from the feeding position, it was always possible to determine where the stylet tip was located before the withdrawal because of the salivary sheath. In the case of ramified salivary sheath as in the sample correlated to waveform 2 it was observed that one ramification showed a lumen supposed to be the impression left by the stylets in the salivary sheaths visited last, whereas the others had an uniform appearance (Figures 4A, B et C).

Sample correlated with waveform 2

Starting from a single stylet entry point into the lamina, the salivary sheath ramifies in at least three branches. The first ramification (SS1) presents an uniform appearance under TEM (data not shown), and ends against a vascular bundle sheath cell (VS1) of a secondary vascular bundle, partially emptied of its contents (Figure 4A). Note the scattered starch granules indicating chloroplast disruption. The two other ramifications of the salivary sheath (SS2 and SS3)(Figures 4A, B and C), pass through a mesophyll cell (MC1)(Figure 4A), alongside the secondary vascular bundle sheath. The salivary sheath SS2 presents an uniform appearance. It runs alongside a second cell of the vascular bundle sheath (VS2), which is contiguous with vascular bundle sheath cell VS1, and partially emptied of its cellular contents (Figure 4A). Salivary sheath SS3 which has a wide internal lumen (Lu) is sticking to a perforation of the cell wall and plasma membrane of the mesophyll cell MC1, which opens towards a lacuna (La)(Figure 4A). A salivary continuity is seen between the lumen Lu of salivary sheath SS3 and the lacuna La (Figure 4C). The wall and the plasma membrane which line the opposite face of the lacuna La are perforated towards a second mesophyll cell (MC2)(data not shown). The presence of a continuity of material between the two mesophyll cells, MC1 and MC2, through the intermediary of the lacuna La suggests that feeding took place in mesophyll cell MC2 via the lacuna La. The mesophyll cell MC2 has indeed the same appearance as the two vascular bundle sheath cells, VS1 and VS2, which were sucked by the insect. This appearance with saliva material and/or degradation products contrasts with apparently intact cell as vascular bundle sheath cell three (VS3)(Figure 4A).

The salivary sheath SS3 exhibits an internal lumen (Figures 4B and 4C) indicating that it is the last visited salivary sheath ramification. This lumen has the same diameter as that of the maxillary stylets (Figures 3A) confirming that the lumen correspond to the impression left behind by the insect stylets after their violent withdrawal at the moment of microcauterisation.

Sample correlated with waveform 4

The leaf sample in which waveform 4 was recorded, contains an unbranched salivary sheath. It was observed in a perpendicular orientation to the lamina surface at the level of the epidermal cells. Then it describes a fairly sharp curve which caused it to pass parallel with the secondary vascular bundles. The salivary sheath was observed within an air space and further in a vascular bundle sheath cell (VS1)(results not shown), of an intervascular canal connecting two

secondary vessels (Figure 5A). The vascular bundle sheath cell VS1 is filled with electron dense material. It should be noted that it was not clear from our observations if the vascular bundle sheath cell VS1 above and below the canal are distinct cells or a single one. If they are distinct cells it is supposed that the two vascular bundle sheath cells were damaged by the stylets.

The longitudinal section of this canal shows one xylem vessel (Xy) and one phloem tube (Ph). The salivary sheath (SS) was observed within the xylem vessel Xy (Figure 5B). The cross section of the salivary sheath SS shows that it is located in a perpendicular orientation to the xylem vessel Xy and in contact with the cell wall (cw) that borders the phloem tube Ph (Figure 5A). The internal lumen (Lu) of the salivary sheath SS is connected with the phloem tube Ph through the interruption of the cell walls cw and the phloem cell membrane (cm)(Figures 5B and C).

These observations indicate that at the moment of cauterisation during the waveform 4, stylet tips present in the xylem vessel, were in contact with a phloem tube cell. Moreover, it is interesting to note that the width of the break in the walls and of the lumen Lu of the salivary sheath SS (Figure 5C) is the same as the estimated diameter of the alimentary canal (1.3 to 1.6 μm)(Figure 3A).

Sample correlated with waveform 5

The stylets could be observed in the salivary sheath SS but only at the level of the epidermis indicating that they were amputated before being entirely withdrawn from the foliar tissue (Figure 6A). Beyond that, the stylets are replaced by a wide internal lumen (Lu)(Figure 6B). Unlike for the waveform 4, the salivary sheath SS is orientated obliquely in relation to the leaf lamina surface. It sinks into the mesophyll tissue in a parallel direction with the vascular bundles, either within airspaces or by breaking through mesophyll cells. The main salivary sheath (SS) ramifies in at least two branches (SS1 and SS2). The salivary sheath SS1 which presents an uniform appearance, ends his route within a perivascular bundle sheath cell (VS1), filled with electron dense material (Figure 6C). The salivary sheath SS2, exhibiting a large internal lumen, ends in a xylem cell (Xy1) of an intervacular canal (Figures 6C and D), where it is inserted within a fracture of the xylem wall in contact with a phloem tube cell (Ph1)(Figure 6D). The vascular bundle sheath cell (VS2), contiguous with the vascular bundle sheath cell VS1, contains light electron dense material which is darker towards the side of the

cell in contact with salivary sheath SS2. This type of material is also observed in the left part of xylem cell Xy1 (Figure 6C). The phloem cell wall of Ph1 is deformed supposedly under the pressure previously exerted by the stylets (Figure 6D). The presence of electron-dense material in the phloem tube cell Ph1, suggest that the cell wall and the membrane of phloem tube cell Ph1 are disrupted. Two types of electron dense material are visible in phloem tube cell Ph1, a blob of dark electron dense material (Bs1), contiguous to the salivary sheath and a lighter material which is apparently filling phloem tube cell Ph1 and an adjacent phloem tube cell, Ph2. However this electron dense material was not observed in phloem tube cells three and four (Ph3 and Ph4), two other neighbouring phloem cells. Callose plugs are observed in holes of a sieve plate separating phloem tube cells Ph3 and Ph4. A blob of electron-dense material (Bs2) was also observed in the xylem vessel two (Xy2), adjacent to xylem cell Xy1, but Xy2 is not filled with electron dense material as phloem tube cells Ph1 and Ph2. Microcauterisation done at the moment of a class 4 signal coincides with the presence of the stylets in a xylem vessel connected to a phloem tube.

Discussion

EPG Waveforms analysis

Thanks to the scanning of EPG waveforms and its analysis, it was possible to achieve an exact temporal description of the waveforms and to deduce discriminating physical parameters. Based on a large number of waveform periods, it was shown that despite variations between recordings, the median is a reliable discriminating parameter. The spectral analysis of the waveforms revealed major frequencies, 5 to 7 Hz for waveforms 2 and 5, 0.02 Hz for waveform 3 and 0.4 Hz for waveform 4. These quantitative parameters may be useful to work out an automatic analysis of waveforms which is a prerequisite for a larger application of EPG, knowing that one of the major limiting factor of the technique is the time consuming manual analysis of the rough data.

The lack of major modifications of the waveforms following changes of input resistance (emf and normal mode) or polarity, shows that the emf represented the major component. This means that the EPG waveforms obtained in this study reflect insect activity rather than the position of the stylets tips. This was also shown for thrips (Harrewijn *et al.*, 1996).

The number of waveforms characterized in this study is identical to the number of waveforms obtained with the same DC system for *C. storeyi* (Kimmins & Bosque-Perez, 1996). However a lower number of waveforms were distinguished with an AC system for the same species (Mesfin *et al.*, 1995) or for other *Deltocephalinae* (Wayadande & Nault, 1993).

Relationship between EPG recording, the feeding zone and the biological activity of the insect

Waveform 1. In spite of the absence of the stylet tips in feeding position and the occurrence of ramified salivary sheaths, the distinction between a sealed and an open salivary sheath enables to identify the salivary sheath in which stylets were present last before the microcauterisation. The same observation was made for another *Auchenorrhyncha* the planthopper *Perkinsiella saccharicida* Kirkaldy (Chang, 1978), and is consistent with the results of McLean and Kinsey (1967), who showed that when aphids withdraw their stylets voluntarily from plants, the end of the stylet sheath is sealed and the central canal filled up with secretion. The three leaf samples analysed by TEM corresponded to feeding activities that all started by a non probing phase followed by a waveform 1 period (Table 2). The observation of salivary sheaths in all the three samples showed that this leafhopper species produces and uses a salivary sheath to move its stylets through the plant tissue before reaching a phloem tube. However, the salivary sheath was never detected within the cell used for feeding. This is also true for aphids (Kimmins & Tjallingii, 1985), but apparently not for the planthopper *Nilaparvata lugens* Stal for which it was shown that sheath saliva penetrate into phloem sieve element (Spiller, 1990). The piercing and the production of viscous saliva are most likely the major activity of this pathway waveform. Therefore waveform 1 could be named stylet pathway phase as suggested by Reese *et al.* (2000). This denomination being preferred over other terminologies because it does not specify any tissue localisation.

Waveform 2. The number of salivary sheath ramification, at least three, is consistent with the recording of a sequence of three phases of non probing-probing activities. Each phase consisted of waveform 1 periods during which the several ramifications are supposed to be produced and waveform 2 periods which lasted respectively for each phase, a total of 148 s, 224 s and 96 s, the last waveform 2 period being interrupted by cauterisation (Table 2). The fact that the tip of the salivary sheaths were located in mesophyll cells adjacent to partially

emptied mesophyll and perivascular bundle sheath cells suggest that waveform 2 correspond to active ingestion of cell content. This is consistent with the feeding behavior of the potato leafhopper *Empoasca fabae*, shown by AC electronic monitoring to include an active ingestion of mesophyll intracellular content (Hunter & Backus, 1989). It is however in contrast with EPG recordings on aphids, showing that non vascular cells are not actively ingested (Tjallingii & Hogen-Esch, 1993).

The severe damages observed in the partially emptied cells during class 2 signal suggest that it is the result of an intensive sucking. The high amplitude of the waveform 2, the magnitude of the 5 Hz frequency, the regular trace whatever the recording conditions (emf or epg mode, negative and positive median) suggest the importance of emf components due to the strong activity of the cibarial pump. Small waves on the top of the pointed peaks could be explained by the relaxation and contraction of dilator muscles whereas the closing and opening of the cibarial valve cause respectively a negative deflection (increased resistance and negative electrical potential) and a positive deflection (decreased resistance). The volumes of nutrients ingested by leafhoppers are most likely much higher than those of aphids (up to 10 times more), as suggested by the assessed diameter of the food canal of *C. mbila* (1.5 to 1.8 μm) compared to the one of *Aphis fabae* Scopoli (0.5 μm), and the size of the cibarial pump of other leafhoppers as *Empoasca vitis* Goethe and *Zyginidia pullula* Boheman (Tavella & Arzone, 1993).

However, waveform 2 does not allow a differentiation between ingestion from a mesophyll cell or from a vascular bundle sheath cell. The EPG recordings for the samples correlated with the waveforms 4 and 5 showed that these signals were not immediately preceded by a waveform 2. The fact that the stylets were shown to pass through a xylem vessel before their connection with a sieve tube and that the negative osmotic pressure in xylem required an active ingestion (Mittler, 1957 ; Wright & Fisher, 1980), suggest that no ingestion occurred from xylem. However, this apparent absence of xylem ingestion by *C. mbila* on maize will need confirmation, particularly as all the active ingestion waveforms recorded with several *Deltocephalinae* were always associated to xylem feeding (Rapusas & Heinrichs, 1990 ; Wayadande & Nault, 1993).

This waveform is similar to the G waveform of EPG recordings on aphids (Tjallingii, 1988), regarding the active ingestion activity associated to these waveforms but not for tissue localisation. Therefore, based on our data, the proposed name for waveform 2 of *C. mbila* is

“active ingestion”. This term describes a specific activity. This was preferred to a term describing a stylet tip position like “non phloemic phase” which is too general or “xylem ingestion” which is too restrictive.

The severe damages seen in the cells which were emptied by the leafhopper suggest that the nuclear membrane was disrupted and that potential geminivirus virions, known to be accumulated in the nucleus, would be ingested. Although the feeding of *C. mbila* in non vascular cells is relatively short compared to the duration of feeding from phloem tubes, it is apparently long enough to allow an efficient virus acquisition, because *C. mbila* is able to become infectious after an acquisition period of less than one minute (Storey, 1938; Reynaud, 1988). Previous results on the stylet routes of aphids showed that aphids also ingest cell contents from non phloem cells (Kimmins & Tjallingii, 1985; Tjallingii & Hogen-Esch, 1993). However the quantity of ingested material is tremendously lower for aphids, since the visited cells remain apparently intact. The short probes in the cytosol observed for aphids would not be strong enough to allow the acquisition of nucleus located virions. EPG results of the feeding behavior of the whiteflies *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Janssen *et al.*, 1989), *Bemisia tabaci* Gennadius (Lei *et al.*, 1998) and *B. argentifolii* Bellows & Perring (Johnson & Walker, 1999) suggested that it is similar to aphid feeding behavior. The absence of non phloemic intracellular content ingestion by *B. tabaci* (Janssen *et al.*, 1989) and the non frequent non phloemic intracellular punctures by *B. argentifolii* (Johnson & Walker, 1999) may explain their lower efficiency to transmit geminiviruses (Bedford *et al.*, 1994), compared to *C. mbila*. The fact that geminiviruses cannot be acquired by whiteflies quite as rapidly as leafhoppers, about four hours and 15 minutes respectively (Harrison, 1985), is probably related to different feeding behavior detected between whiteflies and leafhoppers. However this will need other research to be confirmed. Conversely, the fact that *C. mbila* do not briefly probe as aphids, but destroy the non phloem cells that are sucked or crossed by its stylets, may explain why leafhoppers were never described, as vector of non circulative non persistent viruses and were shown to be vector of non circulative semi persistent viruses in only three cases (Nault, 1997).

Waveform 3. Many characteristics of waveform 3 periods – median, duration and its occurrence in the stylet pathway –, indeed significantly different, are similar to those of waveform 2, comparing to the three others especially waveforms 4 and 5. This suggests that

the corresponding activities are located in the same tissue. All attempts of stylectomy carried out during waveform 3 were unsuccessful because the insects were able to withdraw their stylets and jump before stylectomy.

Similar waveforms were observed using EPG system with rice leafhoppers : *Nephotettix virescens* (Rapusas & Heinrichs, 1990) and *Nephotettix cincticeps* (Young & Goodman, 1990), and the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal (Kimmins, 1989), and using AC system with the *Typhocibinae Empoasca fabae* (Hunter & Backus, 1989). In the case of *N. virescens* and *N. cincticeps*, salivary sheaths were observed in airspace of mesophyll lacuna by light microscopy observation of leaf cross sections. This observation of a lacuna localisation of the salivary sheaths is consistent with the fact that stylets are apparently easily withdrawn from the tissue.

The position of the stylet tips within the lacuna has probably no meaning with respect to feeding. However precise positionning of the maxillary apex occurs more easily in spongy tissue than dense tissue (Pollard, 1969). So, positionning in mesophyll lacuna could help *C. mbila* in directionnal control of their stylets. Moreover, the cumulated duration of this waveform is significantly higher for rice cultivars resistant to insects than for susceptible cultivars (Kimmins, 1989; Rapusas & Heinrichs, 1990). The position of the stylet tips during waveform 3 need however to be confirmed, especially as it does not have any equivalent with aphid waveforms. The f waveform defined by Tjallingii (1988) is similar regarding median and amplitude parameters. However, the characteristic high amplitude peaks are absent. They may correspond to labial rotations for the directional control of the stylets as suggested for the leafhopper *Zyginidia scutellaris* H.-S. (Marion-Poll *et al.*, 1987). The methods to change the stylets direction in plant tissue could be very different between piercing-sucking insects. The cross sections through stylet tips of *C. mbila* (Figure 3B) showed that they are co-adapted with independent movement and that they may change the stylets direction by bending and by protraction of an incurved mandibular apex along with a single or the paired maxillary stylets and followed by the second mandibular stylet as described by Pollard (1969) for the leafhopper *Oncopeltus fasciatus* Dallas. Therefore the term “stylet work” is suggested for waveform 3.

Waveform 4. The contrasting material observed in the phloem cells of the sample corresponding to waveform 5 (Figure 6C), is likely the result of the salivary activity of the

preceding waveform 4 period (Table 2) and the short waveform 4 periods interrupting the passive ingestion phase (Figure 2) ; indeed the cauterisation was done 47 min after the end of a 30 min waveform 4 period. The absence of contrasting material in the phloem cells of the sample corresponding to waveform 4 suggest that the duration of the salivary activity was too short since cauterisation occurred 13 min after the beginning of waveform 4. The 0.4 –0.6 Hz frequency recorded in waveform 4, is therefore interpreted as the consequence of the salivary pump activity. This 0.4 Hz frequency is similar to the low frequency recorded during the aphid E1 waveform which was also interpreted as the result of the salivary pump activity (Tjallingii, 1988).

The absence of 5-7 Hz frequency recordings during waveform 4 suggest that the cibarial pump and the precibarial valve were not active, which may indicate that the insect was not in the process of alimentary ingestion. This is consistent with the absence of honeydew production during a similar waveform recorded with *C. mbila* (Reynaud *et al.*, 1997) and with *C. storeyi* (Kimmins & Bosque-Perez, 1996). This indicate that waveform 4 correspond only to salivation activity, similarly to pattern E1 of aphids which was shown to exclusively consist of salivation (Tjallingii, 1994; Prado & Tjallingii, 1994; Tjallingii & Hogen-Esch, 1993).

The fact that MSV does apparently not multiply at the feeding point of *C. mbila*, following an inoculation access period on a maize leaf (Peterschmitt *et al.*, 1992), and that the virus is leaving the inoculated leaf in less than two hours (Storey, 1938), suggest that the virus needs to be inoculated directly in the sieve tubes for infection to be possible. Therefore, the feeding activities, occurring during the waveform 4, i.e. salivation into the sieve tubes, appear to be well adapted for virus inoculation of MSV into maize. This confirms the correlation demonstrated by Kimmins & Bosque-Perez (1996) between the passage to waveform 4 as well as its duration and the efficiency of MSV transmission.

Cross sections through the stylets of *C. mbila* showed that the salivary canal is joining the alimentary canal before the tip of the maxillary stylets as already shown for aphids (Forbes, 1969). This suggest that waveform 5 periods does probably not contribute to MSV inoculation although the low frequency salivation signal (0.4 Hz) was detected, because the watery saliva is believed to be mixed to the phloem sap within the alimentary canal and directly ingested without reaching the phloem tube.

The fact that waveform 5 periods are always preceded by a waveform 4 period indicate that waveform 4 salivation into a phloem tube is necessary to allow the sustained waveform 5

ingestion step to start in this tube. Moreover the fact that the duration of waveform 4 periods is homogeneous and relatively long suggests that the preparation of the cell environment required for ingestion, needs a minimum time which may be specific to each insect-plant couple. This is similar to the E2 waveform recorded for aphids which is always preceded by E1 (Prado & Tjallingii, 1994). It was suggested that aphid saliva would have an impact on the redox potential of phloem sap in order to avoid polymerisation and precipitation of macromolecules involved in general defence mechanisms, as callosis and P-proteins (Tjallingii, 1994). In the case of plant resistance to insect, the non passage from E1 to E2 pattern was interpreted as the inability of the insect to overcome the constitutive defence mechanisms occurring in the phloem tubes (Klingler *et al.*, 1998).

Waveform 5. The similar medians of waveforms 4 and 5 suggest that feeding by the insect during these waveforms occurs from the same cell within the phloem tube. The frequency of waveform 5 is identical to the frequency of waveform 2 ; it corresponds to the activity of the cibarial pump (Tjallingii, 1988). However the amplitude of this frequency is on average ten times less than that recorded for a waveform 2 suggesting that the feeding procedure in phloem tube is different from the procedure in other cells. This difference was previously explained for aphids by the positive osmotic pressure of the phloem which allows insect feeding without alimentary pump (Tjallingii, 1994). Given that this pressure is much greater than the ingestion capacity of the insect, the leafhopper is obliged to limit the entry flux of sap by using the precibarial valve (McLean & Kinsey, 1984). This valve shows the same activity frequency as the cibarial pump but is associated with a much smaller muscle. Therefore waveform 5 corresponds, like its E2 equivalent in aphids, to passive feeding from the phloem. The fact that the higher phase of the peaks was longer for waveform 5a compared to 5b suggest that the cibarial valve is closed during a longer time for waveform 5a (Figures 1E and F). Conversely, the longer opening time of the cibarial valve for waveform 5b may be explained by a more difficult phloem sap flow through the alimentary canal during the second phase of waveform 5. The decrease of the sap pressure over time in the phloem tube may result in the increase of the opening time of the cibarial valve in order to maintain the flow of the ingested sap. The occurrence of waveform 4 periods within waveform 5 periods may enable the insect to extend its feeding period from the same tube by fluidifying the phloem sap with aqueous saliva (Figures 2B and C). The increase of the amplitude of the secondary peaks

at the top of the primary waves suggest that the emf and resistance components are of the same polarity and therefore are added up.

Acknowledgements

We thank Drs Franck Molinaro and Daniel Lan Sun Luk (Laboratoire de physique, Université de La Réunion) for valuable comments and Dr Michel Nicole for his help in preparing the illustrations. Research was conducted during the thesis scholarship program of J. M. Lett, supported by le Ministère Français de la Recherche and financed partially by le Conseil Régional de La Réunion.

References

- Bedford, I.D., R.W. Briddon, J.K. Brown, R.C. Rosell & P.G. Markham, 1994. Geminivirus-Transmission and Biological Characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotypes from Different Geographic Regions. *Annals of Applied Biology* 125: 311-325.
- Buduca, C., B. Reynaud, D. Lan Sun Luck & F. Molinaro, 1996. Electrical penetration graphs from *Peregrinus maidis* on a susceptible maize hybrid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79: 131-139.
- Caillaud, C.M., J.P. Dipietro, B. Chaubet & J.S. Pierre, 1995. Application of discriminant analysis to electrical penetration graphs of the aphid *Sitobion avenae* feeding on resistant and susceptible wheat. *Journal of Applied Entomology* 119: 103-106.
- Chang, V.C.S., 1978. Feeding activities of the sugarcane leafhopper : Identification of electronically recorded waveforms. *Annals of the Entomological Society of America* 71: 31-36.
- Chen, J.Q., Y. Rhabé, B. Delobel, N. Sauvion, J. Guillaud & G. Febvay, 1997. Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii* : behavioural analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 85: 33-44.
- Crane, P.S., 1970. The feeding behavior of the blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata* Baker. Ph-D. Thesis, University of California, Davis, 132 pp. .
- Forbes, A.R., 1969. The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera, Aphididae). *Canadian Journal of Entomology* 101: 31-41.
- Harrewijn, P., W.F. Tjallingii & C. Mollema, 1996. Electrical recording of plant penetration by western flower thrips. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 79: 345-353.
- Harrison, B.D., 1985. Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* 23: 55-82.

- Hunter, W.B. & E.A. Backus, 1989. Mesophyll-feeding by the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera : cicadellidae) : Results from electronic monitoring and thin-layer chromatography. Environmental Entomology 18: 465-472.
- Janssen, J.A.M., W.F. Tjallingii & J.C. Van Lenteren, 1989. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. Entomologia Experimentalis et Applicata 52: 69-81.
- Johnson, D.D. & G.P. Walker, 1999. Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. Entomologia Experimentalis et Applicata 92: 257-270.
- Kawabe, S. & D.L. Mac Lean, 1978. The mechanisms of rice resistance to the green rice leafhopper. Analysis of honeydew excreted by the green leafhopper on resistant and susceptible rice. Abstr. 19th Conf. Jap. Soc. Appl. Ent. Zool. 244.
- Kawabe, S. & D.L. Mac Lean, 1980. Electronic measurement of probing activities of the green leafhopper of rice. Entomologia Experimentalis et Applicata 27: 77-82.
- Kawabe, S., D.L. Mac Lean, S. Tatsuki & T. Ouchi, 1981. An improved electronic measurement system for studying ingestion and salivation activities of leafhoppers. Annals of the Entomological Society of America 74: 222-225.
- Kennedy, G.G., 1976. Host plant resistance and spread of plant viruses. Environmental Entomology 5,5: 827-832.
- Kimmins, F.M., 1989. Electrical penetration graphs from *Nilaparvata lugens* on resistant and susceptible rice varieties. Entomologia Experimentalis et Applicata 27: 77-82.
- Kimmins, F.M. & N.A. Bosque-Perez, 1996. Electrical penetration graphs from *Cicadulina* spp. and the inoculation of a persistent virus into maize. Entomologia Experimentalis et Applicata 80: 46-49.
- Kimmins, F.M. & W.F. Tjallingii, 1985. Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. Entomologia Experimentalis et Applicata 39: 135-141.
- Klingler, J., G. Powell, G.A. Thompson & R. Isaacs, 1998. Phloem specific aphid resistance in Cucumis melo line AR 5 : effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. Entomologia Experimentalis et Applicata 86: 79-88.
- Lei, H., W.F. Tjallingii & J.C. Vanlenteren, 1998. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. Entomologia Experimentalis et Applicata 88: 73-80.
- Marion-Poll, F., W. Della Giustina & B. Mauchamp, 1987. Changes of electrical patterns related to feeding in a mesophyll feeding leafhopper *Zyginidia scutellaris*. Entomologia Experimentalis et Applicata 43: 115-124.

- McLean, D.L. & M.G. Kinsey, 1967. Probing behavior of the pea aphid, *Acyphosiphon pisum*. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. *Annals of the Entomological Society of America* 60: 400-406.
- McLean, D.L. & M.G. Kinsey, 1984. The precibarial valve and its role in the feeding behavior of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30: 26-31.
- Mesfin, T., J.D. Hollander & P.G. Markham, 1995. Feeding activities of *Cicadulina mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on host-plants. *Bulletin of Entomological Research* 85: 387-396.
- Mittler, T.E., 1957. Studies on the feeding and the nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin)(Homoptera, Aphididae). I. The uptake of phloem sap. *Journal of Experimental Biology* 34: 334-341.
- Montllor, C.B. & W.F. Tjallingii, 1989. Stylet penetration by two aphid species on susceptible and resistant lettuce. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 52: 103-111.
- Nault, L.R., 1997. Arthropod Transmission of Plant Viruses : A new Synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* 90(5): 521-541.
- Nielson, M.W., 1968. The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae) taxonomy, biology and virus transmission. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* 1382: 1-386.
- Peterschmitt, M., J.B. Quiot, B. Reynaud & P. Baudin, 1992. Detection of maize streak virus antigens over time in different parts of maize plants of a sensitive and a so called tolerant cultivar by ELISA. *Annals of Applied Biology* 121: 641-653.
- Pollard, D.G., 1969. Directional control of the stylets in phytofagous Hemiptera. *Proc. R. ent. Soc. Lond.* 44: 173-185.
- Prado, E. & W.F. Tjallingii, 1994. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72: 157-165.
- Rapusas, H.R. & E.A. Heinrichs, 1990. Feeding behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera : Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. *Environmental Entomology* 19: 594-602.
- Reese, J., W.F. Tjallingii, M. Van Helden & E. Prado, 2000. Waveform comparisons among AC and DC electronic monitoring systems for aphid feeding behavior. In : G. P. Walker and E. A. Backus (eds), *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Hemipteran Feeding Behavior*. Thomas Say Publications in Entomology : Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, USA (in press).
- Reynaud, B., 1988. Transmission des virus de la striure, du stripe et de la mosaïque du maïs par leurs vecteurs, *Cicadulina mbila* (Naude, 1924) et *Peregrinus maidis* (Ashmead,

- 1890)(*Homoptera*). Approches biologique, génétique et épidémiologique de la relation vecteur-virus-plante. Doctorat Thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Reynaud, B. & M. Peterschmitt, 1992. A study of the mode of transmission of MSV by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology* 121: 85-94.
- Reynaud, B., J.M. Lett, M. Granier, F. Molinaro, Y. Mara, M. Grondin, D. Lan Sun Luk & M. Peterschmitt, 1997. Electrical penetration graph from *Cicadulina mbila* on a susceptible maize hybrid and the fine structure of its stylets pathways. 9th International Auchenorrhyncha Congress, February 17-21, Sydney, Australia.
- SAS Institute, 1997. SAS user's guide, version 6.12. SAS Institute, Cary, N.C.
- Spiller, N.J., 1990. An ultrastructural study of the stylet pathway of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54: 191-193.
- Storey, H.H., 1938. Investigation of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors II the part played by puncture in transmission. *Proc. Roy. Soc. B.* 125: 455-477.
- Tavella, L. & A. Arzone, 1993. Comparative morphology of mouth parts of *Zygimidia pullula*, *Empoasca vitis* and *Graphocephala pennatri* (*Homoptera*, *Auchenorrhyncha*). *Bulletin of Zoology* 60: 33-39.
- Tjallingii, W.F., 1978. Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 24: 521-530.
- Tjallingii, W.F., 1985. Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 38: 177-186.
- Tjallingii, W.F., 1988. Electrical recording of stylet penetration activities. In : Minks, A. K., and Harrewijn, P. (eds.), *Aphids : Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam. vol. 2B: pp. 95-108.
- Tjallingii, W.F., 1994. Sieve element acceptance by aphids. *European Journal of Entomology* 91: 47-52.
- Tjallingii, W.F., 2000. Comparison of AC and DC-systems for electrical recordings of stylet penetration activities by aphids. In : G. P. Walker and E. A. Backus (eds), *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Hemipteran Feeding Behavior*. Thomas Say Publications in Entomology : Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, USA (in press).
- Tjallingii, W.F. & T. Hogen-Esch, 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18: 317-328.

- Wayadande, A.C. & L.R. Nault, 1993. Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. *Phytopathology* 83: 522-526.
- Wright, J.P. & D.B. Fisher, 1980. Direct measurement of sieve tube turgor pressure using severed aphid stylets. *Plant Physiology* 65: 1133-1135.
- Young, N.Y. & L.J. Goodman, 1990. Probing and feeding behaviour of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, (Homoptera ; Cicadellidae). 7th *Auchenorrhyncha* Meeting, Wooster, USA.

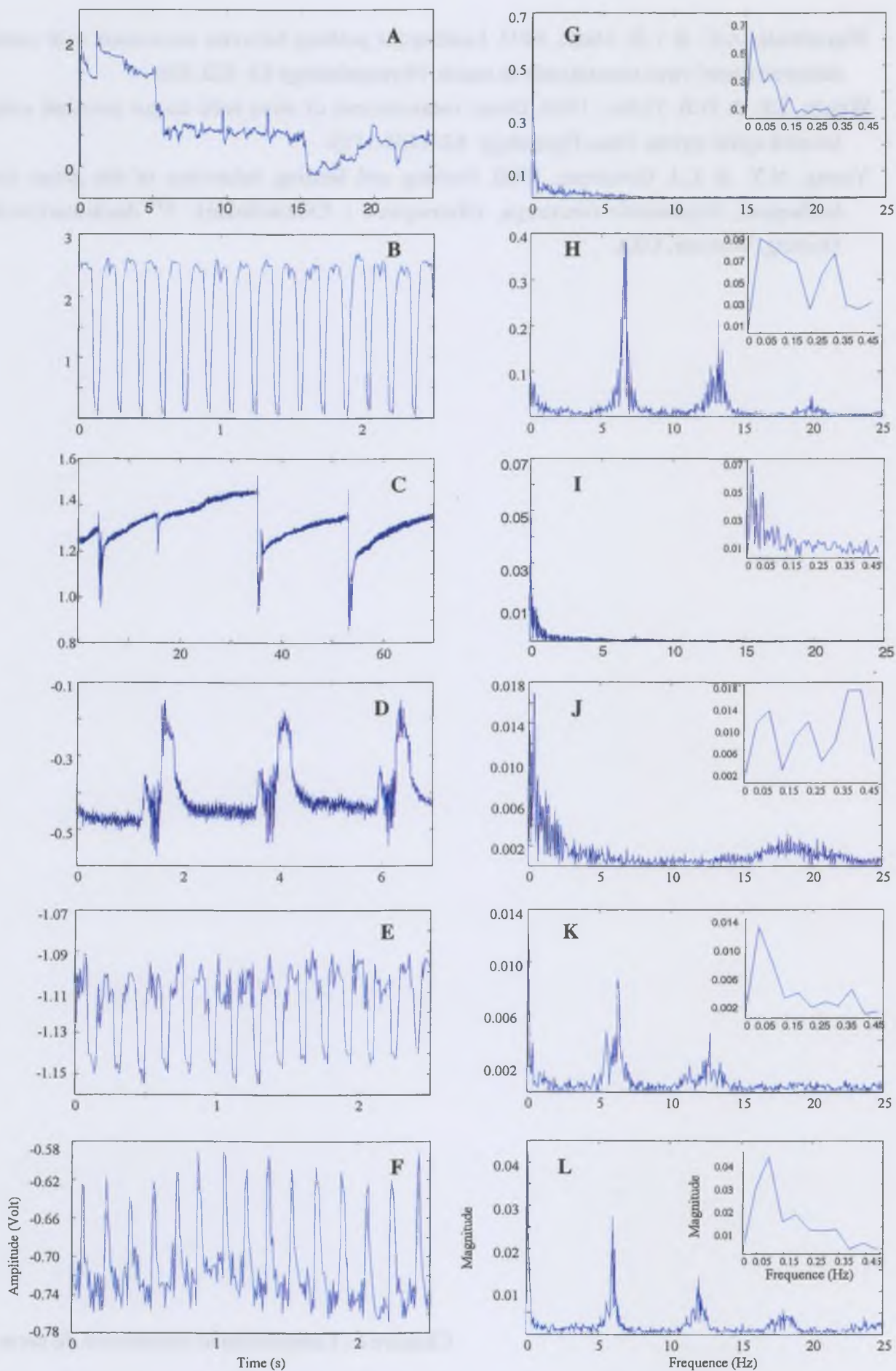


Figure 1. Electrical penetration graph of *Cicadulina mbila* feeding behaviour on maize. Temporal trace and spectral analysis of waveform 1 (A and G), waveform 2 (B and H), waveform 3 (C and I), waveform 4 (D and J), waveform 5a (E and K) and waveform 5b (F and L).



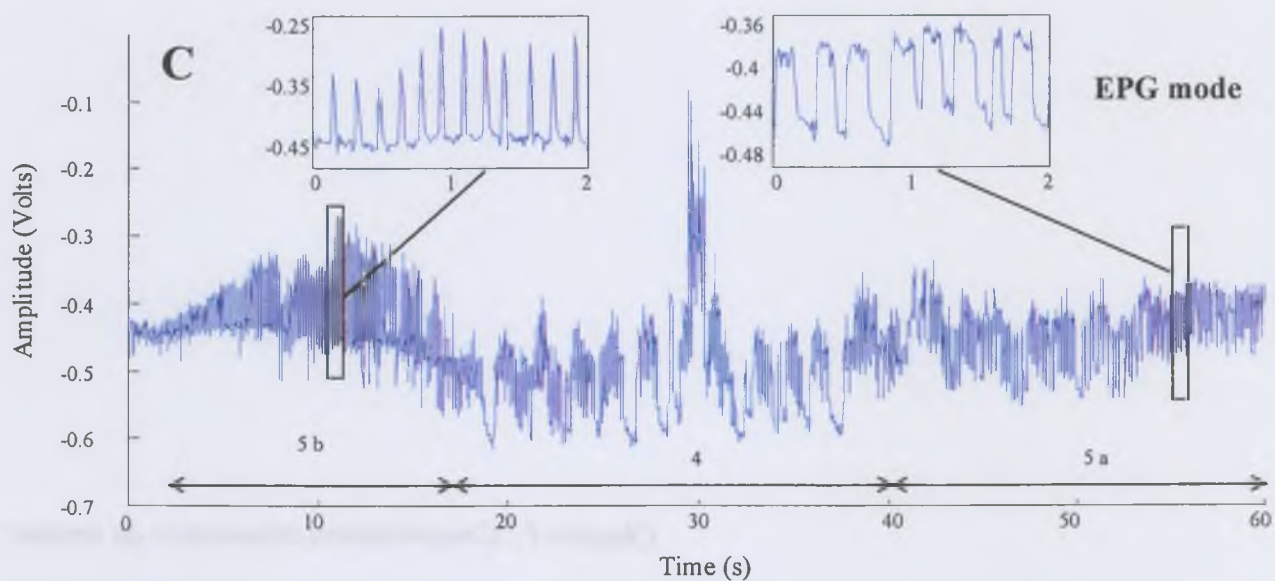
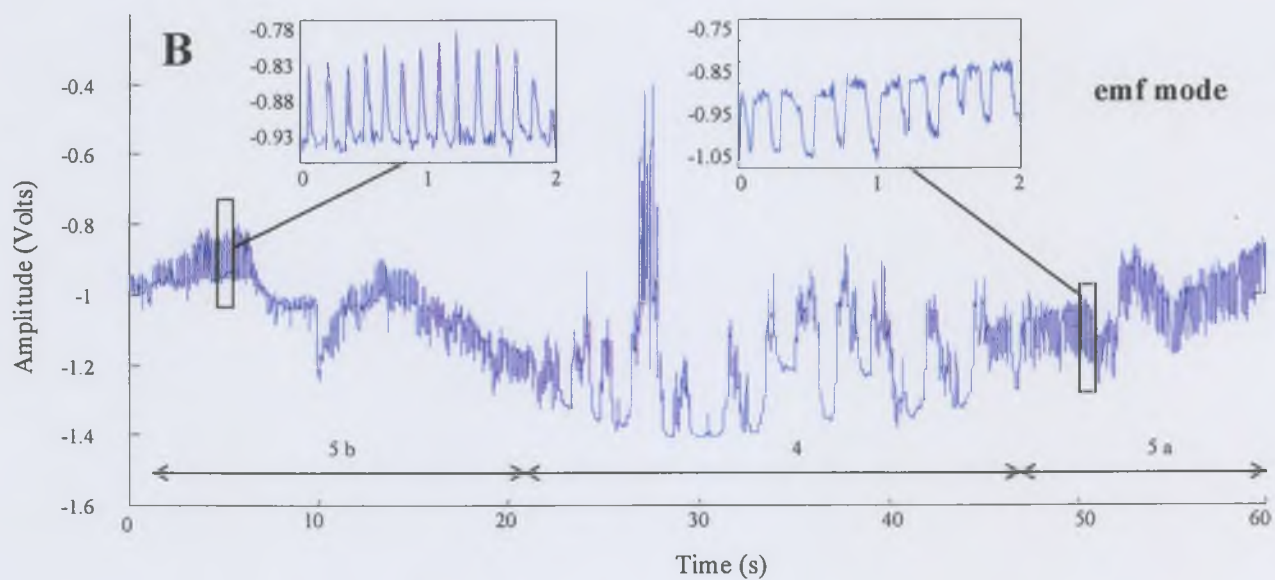
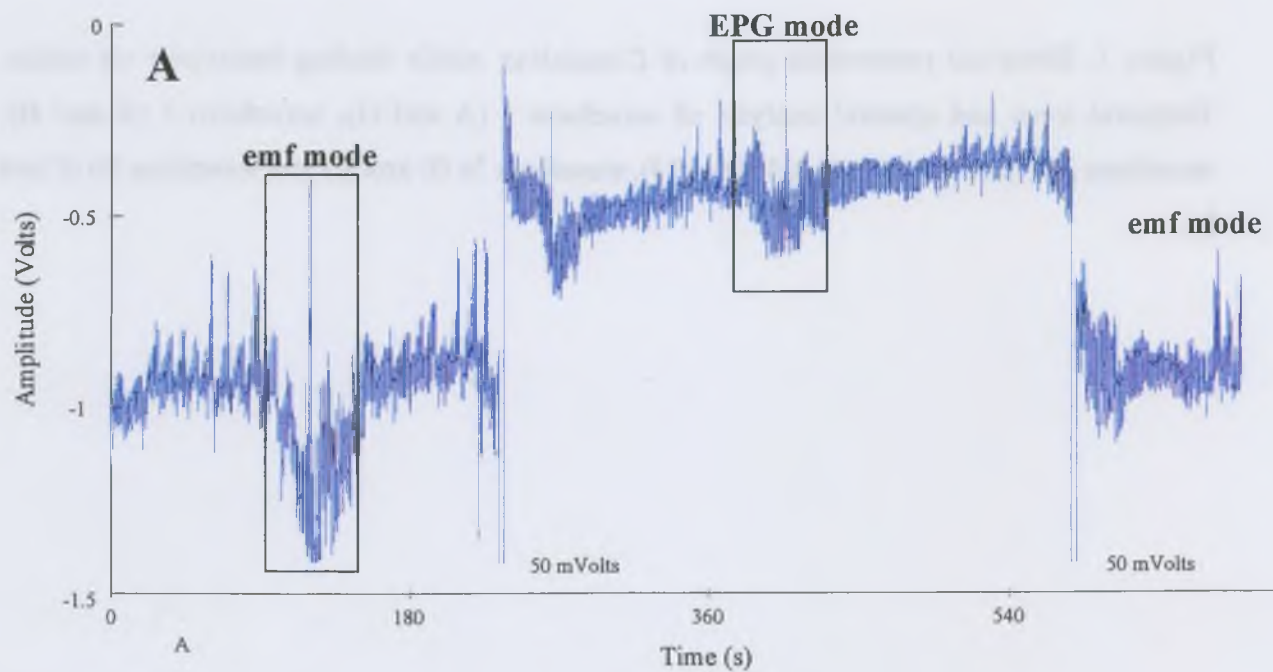


Figure 2. (A) Electrical penetration graph of *Cicadulina mbila* feeding behaviour on maize. Comparison of the EPG traces obtained during the same recording in EPG mode and emf mode (A). Details of the transition between 5b and 4, and between 4 and 5a in emf mode (B) and EPG mode (C).



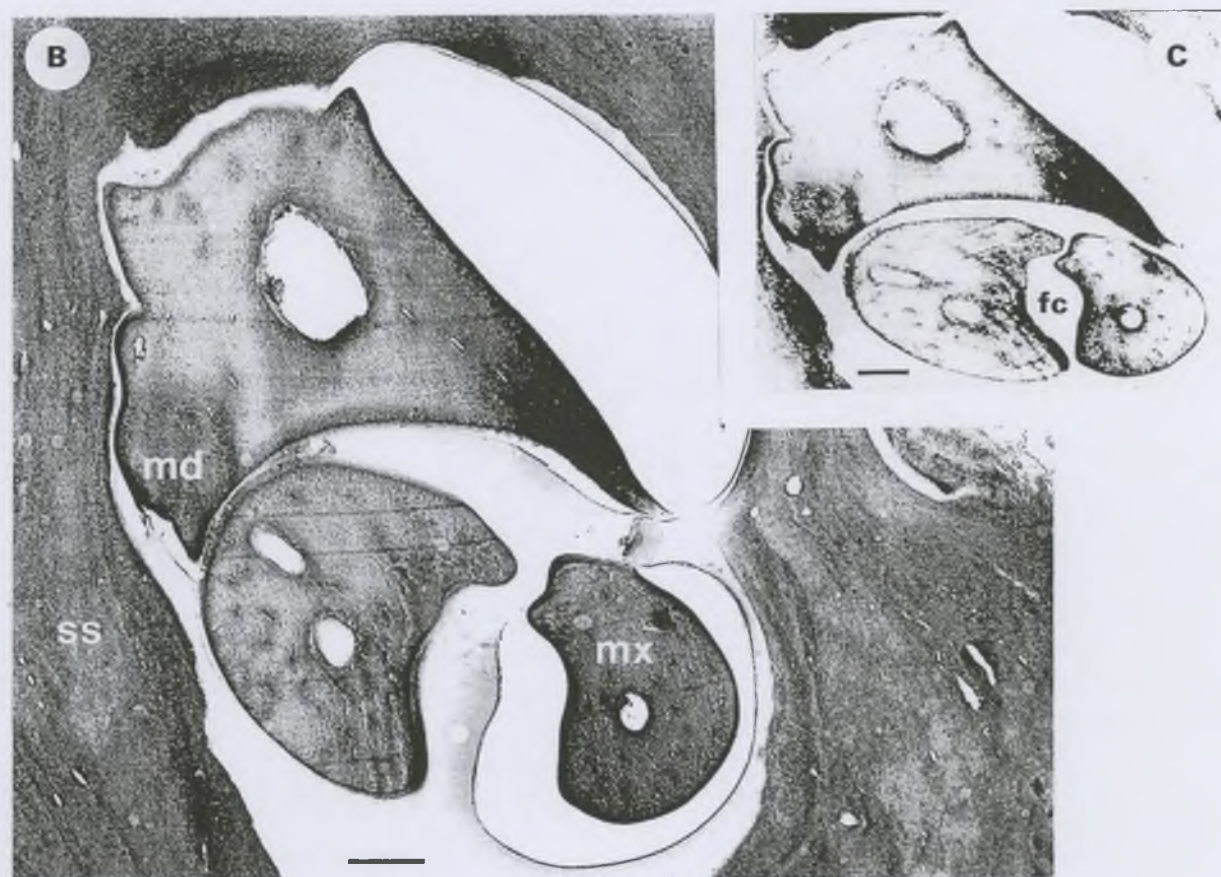
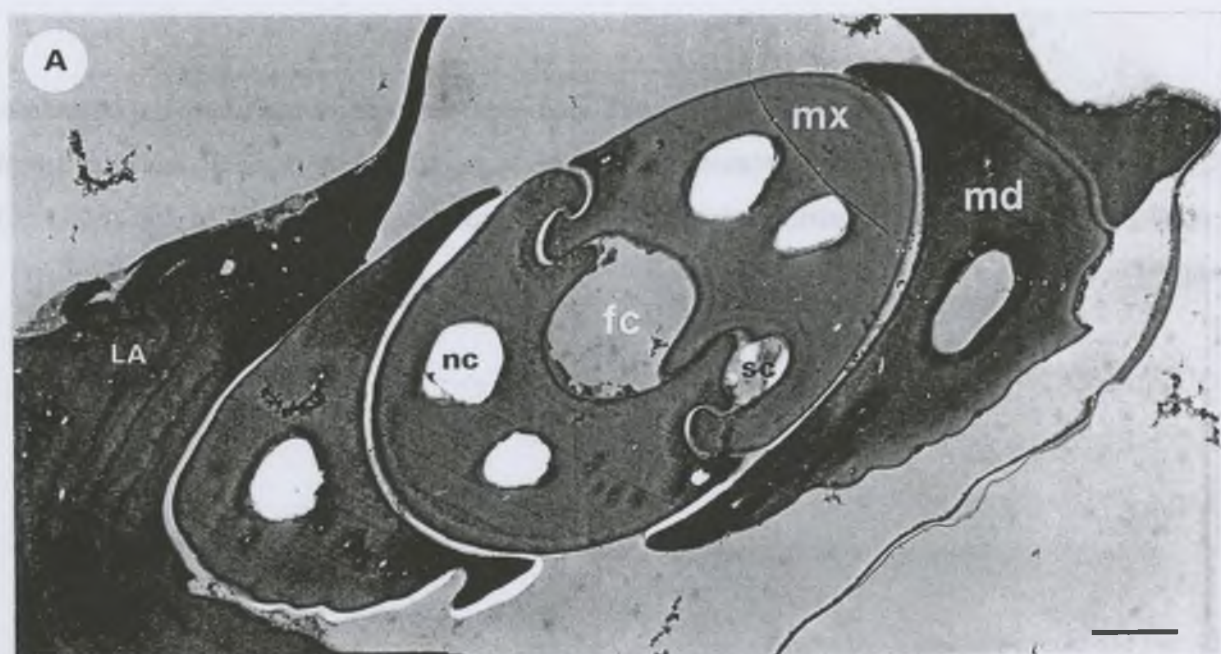


Figure 3. Transverse sections in stylets of *Cicadulina mbila*. (A) Cross section in the four stylets. The maxillary stylets (mx) form the food canal (fc), the salivary canal (sc) and enclose four neuronal canals (nc). One neuronal canal is enclosed in each of the mandibular stylets (md). LA, labium. Bar = 1 μm . (B) Cross section of the stylets close to their tips. Bar = 0.5 μm . SS, salivary sheath. (C) Same as B after processing with image analysis software. The single canal formed by the two maxillary stylets corresponds to the fusion of the food and salivary canals. Bar = 0.5 μm .



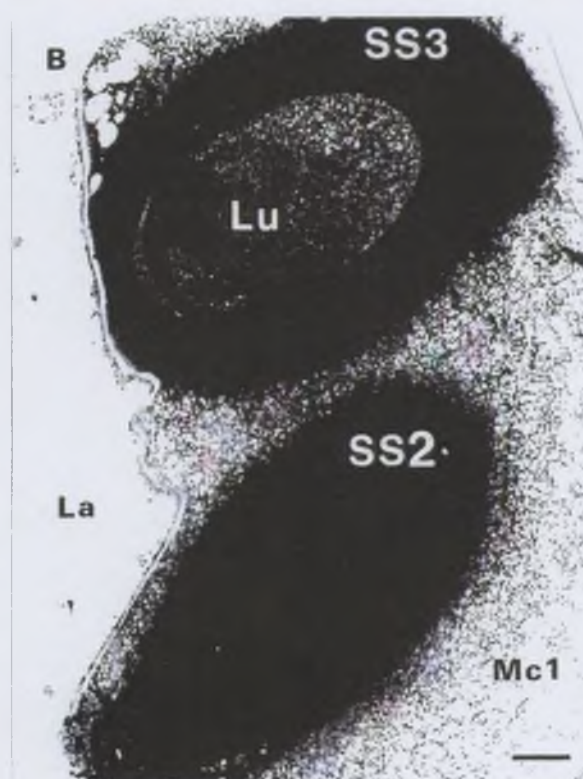
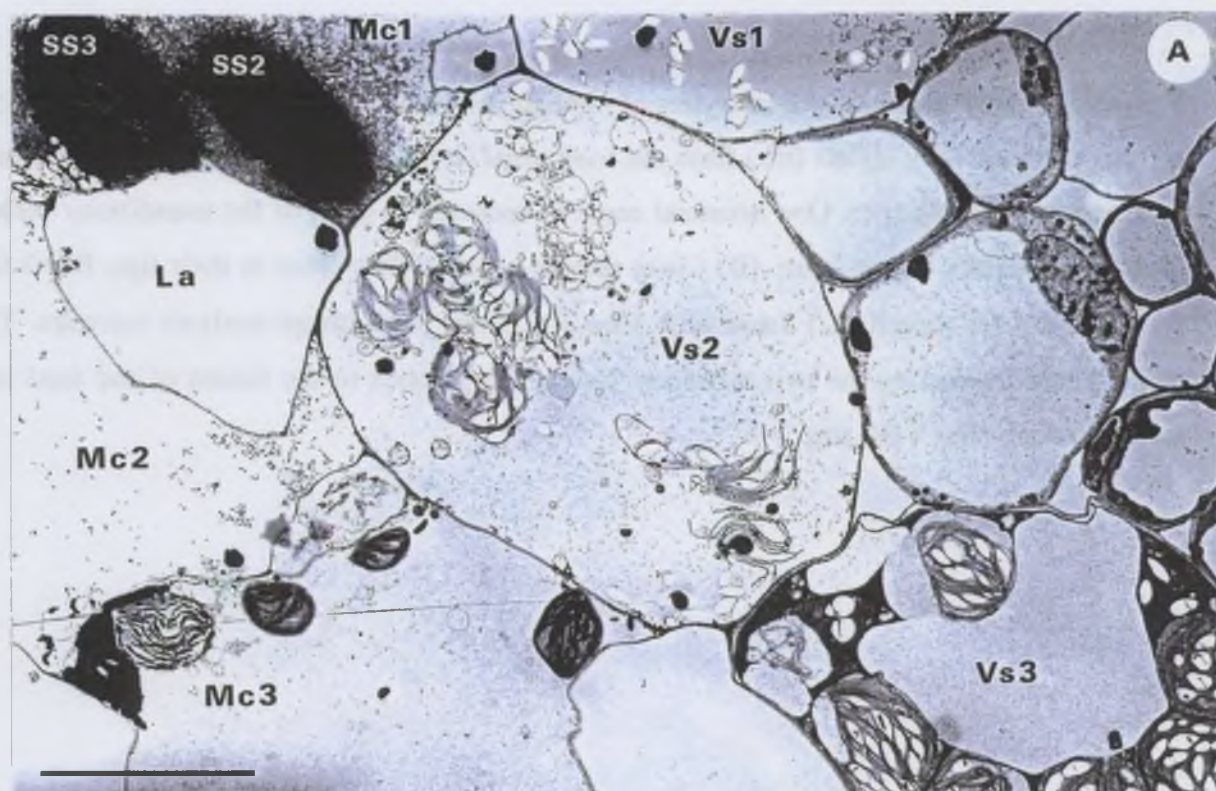


Figure 4. Cross sections in two salivary sheaths within a mesophyll cell, adjacent to a secondary vascular bundle. (A) The vascular bundle sheath cell 1 (Vs1) is emptied. Salivary sheaths SS2 and SS3, are located within a mesophyll cell (Mc1). SS2 is close to the vascular bundle sheath cell 2 (Vs2), which is partially emptied of its cellular content. SS3 is in contact with the plasmalemma of Mc1 adjacent to a lacuna (La). The vascular bundle sheath cell 3 (Vs3) is apparently intact. Note saliva and/or degradation products in Mc1, Mc2, Mc3, Vs1 and Vs2. Bar = 10 μ m. (B) Details of SS2 and SS3; cross section during the penetration. SS3 has a wide internal lumen (Lu), whereas SS2 present a uniform appearance. Bar = 1 μ m. (C) Same as B but closer to the tip of SS3. The Lu of SS3 is open towards a lacuna (La), through a thin perforation of the plasmalemma and the cell wall of Mc1 (arrow). Bar = 1 μ m.



Vascular bundle

Intervascular canal

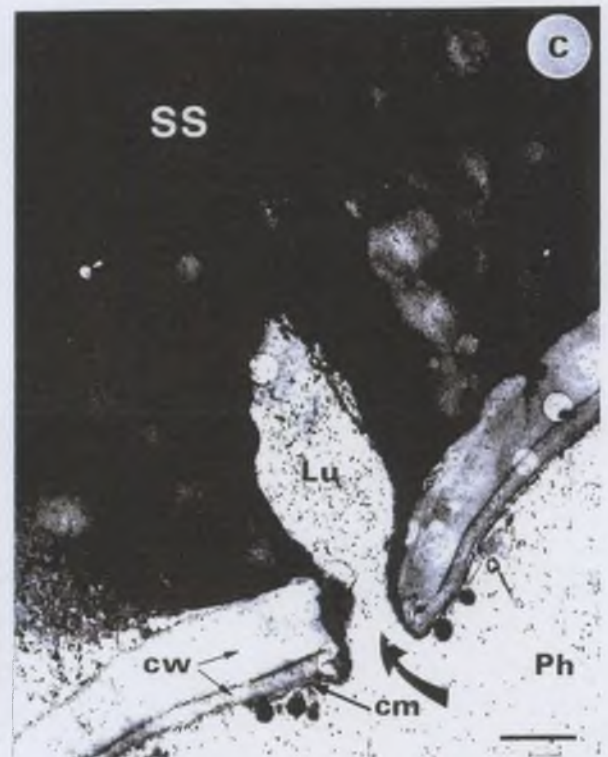
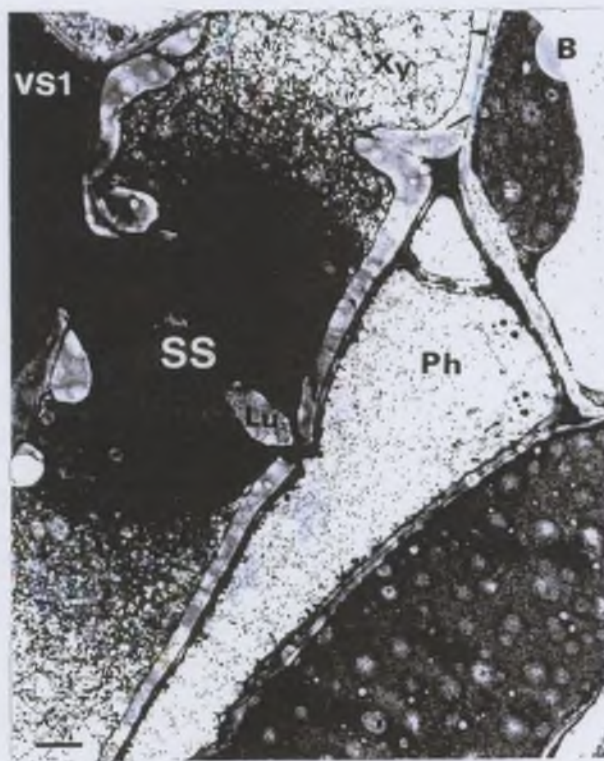
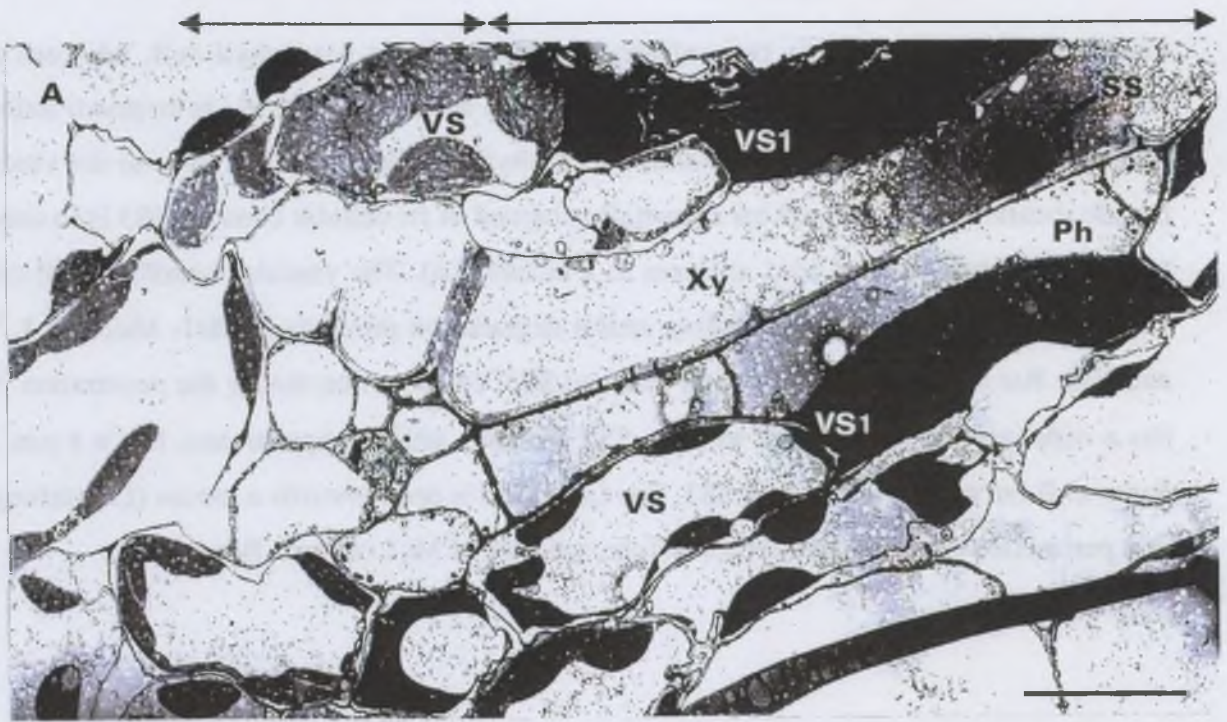


Figure 5. Longitudinal section in a transverse vascular bundle, connecting two secondary vascular bundles with one xylem vessel (Xy) and one sieve tube (Ph). (A) Cross section in a salivary sheath (SS) within a Xy. SS is in contact with an apparently intact cell wall. The vascular bundle sheath cells (VS1 and VS2), close to the SS, are filled with electron-dense material, supposed to be salivary material and/or defense reactions from the plant. VS, vascular bundle sheath cell. Bar = 10 μm . (B) Details of the SS nearer to its tip. The lumen (Lu) is oriented towards a thin perforation of the cell walls and the plasmalemma separating the Xy and the Ph. Note the high contrast of this small perforation with the wide one at the opposite side of the Xy towards VS1 filled with electron-dense material. Bar = 1 μm . (C) Same as B but at a higher magnification and closer to the tip of the SS. The Lu communicates with the xylem vessel through a perforation (arrow) of the cell walls (cw) and the cell membrane (cm). Bars = 0.5 μm .

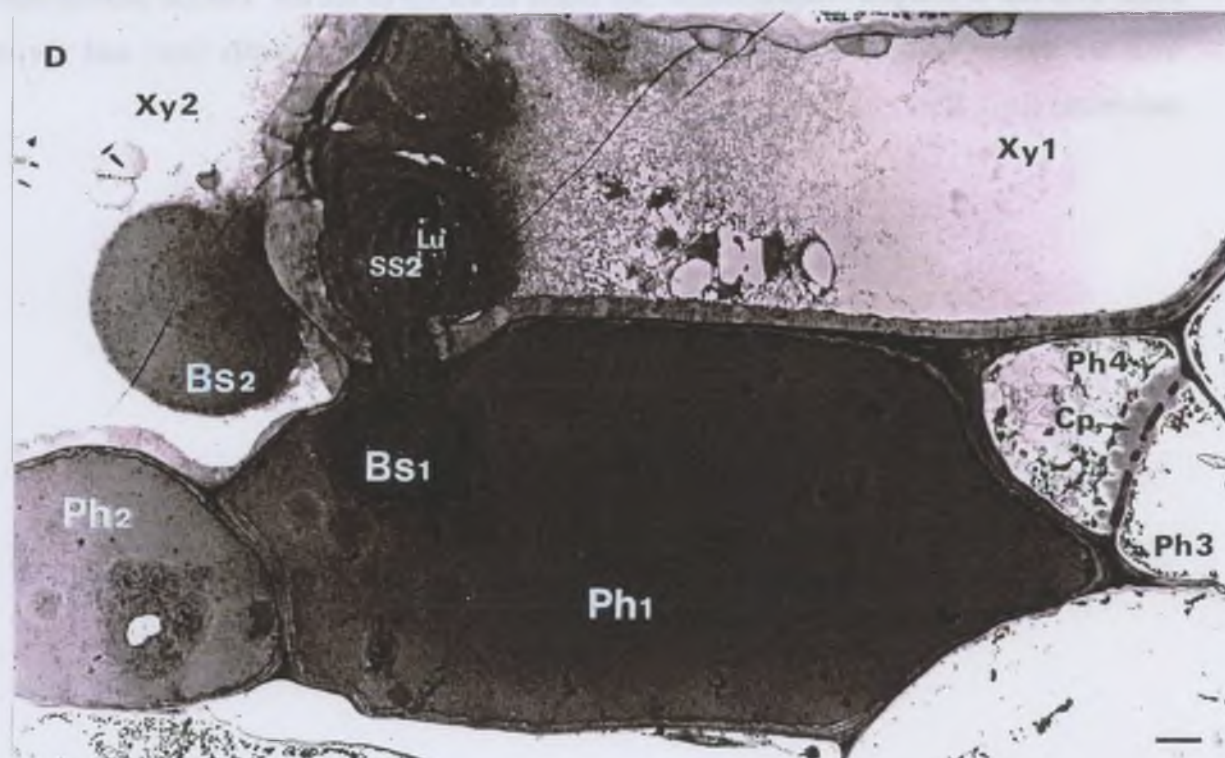
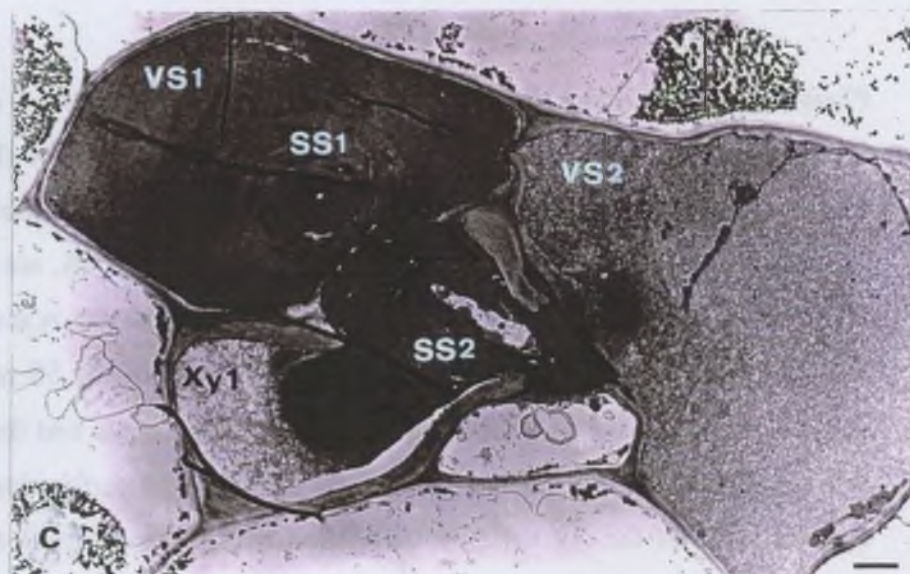


Figure 6. Histological and ultrastructural observations of maize leaf tissues containing a stylet pathway ending in a sieve tube. (A) Light microscope observation of the stylets (St) within the salivary sheath (SS) at the level of the leaf epidermis. Bar = 0.25 mm. (B) same as A, but further in the penetration process as indicated by the empty lumen (Lu), due to the withdrawal of St just before microcautery. Bar = 0.25 mm. (C) Cross section of two ramifications (SS1 and SS2) of the major salivary sheath SS. SS1 is located in a vascular bundle sheath cell (VS1) and SS2 in a xylem cell (Xy1) belonging to an intervascular canal (shown in D). VS2, vascular bundle sheath cell two. Bar = 1 μ m. (D) Longitudinal section in an intervascular canal and cross section in the salivary sheath within Xy1. The SS is pressed against an adjacent xylem cell (Xy2) and partially inserted into a perforation between the Xy1 and a sieve tube cell (Ph1), uniformly filled with electron dense saliva material. A body of electron dense saliva material (Bs) in Xy2 suggests another perforation between Xy1 and Xy2. The saliva material is also present in phloem cell 2 (Ph2), but not in the phloem tube cells 3 and 4 (Ph3 and Ph4). Sieve perforations separating Ph3 and Ph4 are decorated with callose plugs (Cp). Bar = 1 μ m.

Table 1. Median and duration analysis of EPG waveform periods recorded with *C. mbila* on maize.

	Waveforms				
	1	2	3	4	5
Median					
Number of periods	547	289	121	24	22
Mean (volt)	0.2	0.76	0.47	-0.24	-0.25
Standart deviation	0.47	0.56	0.44	0.27	0.42
Rank test *	a	b	c	d	d
Duration					
Number of periods	547	289	121	24	22
Mean (s)	73.15	89.22	79.00	2004.45	2909.00
Standart deviation	128.64	170.89	169.30	1429.51	3502.51
Rank test *	a	b	c	d	d

* Means followed by the same letters in the same line are not significantly different at level 0,05

Table 2. Sequences of EPG waveform periods of three *C. mbila* leafhoppers on maize before stylets amputation. The leaf samples in which probing has occurred were subsequently analysed by TEM.

EPG record ending with a waveform 2 period															
Waveform periods	NP	1	2	1	NP	1	2	NP	1	2	1	2	1	2	
Duration (s)	12	102	148	9.6	6	138	224	54	18	18	34.8	12	13,2	66	
EPG record ending with a waveform 4 period															
Waveform periods	NP	1	2	1	4	1	4								
Duration (s)	7.2	268.8	5	158.4	278.4	16.8	517.2								
EPG record ending with a waveform 5 period															
Waveform periods	NP	1	2	1	4	1	4	5							
Duration (s)	13.2	261.6	5	330	440	42	1338	2856							

NP = Non Probing

I.3. Discussion

La classification des signaux EPG a été faite selon leur ordre d'apparition généralement observé. Leurs numérisations, leurs analyses fréquentielles et leurs traitements statistiques ont permis d'obtenir des descriptions temporelles fines de cinq types de signaux et d'extraire des paramètres physiques discriminants, dont la médiane et les fréquences majeures. Ces paramètres quantitatifs sont indispensables à la reconnaissance automatique des signaux EPG, qui permettra par la suite l'analyse d'un plus grand nombre d'insecte à des fins de sélection variétale de plantes pour la résistance aux vecteurs et à la transmission virale.

L'utilisation d'une résistance d'entrée de l'amplificateur de 10^9 ohms (EPG mode) permet théoriquement d'enregistrer les deux composantes du signal EPG : les emf et les variations de R (Tjallingii, 2000). Avec une impédance de 10^{15} ohms (emf mode), l'amplificateur est uniquement sensible aux emf. La similarité de nos signaux EPG, avec les deux modes d'enregistrement, montre qu'ils reflètent majoritairement les activités motrices de l'insecte plutôt que la position des stylets dans les tissus foliaires (Article N°2 Figure 2).

En se basant sur les résultats obtenus, une description est donné ci-dessous d'un cycle « standard » d'alimentation depuis l'atterrissage de la cicadelle sur une plante jusqu'à l'installation d'une alimentation durable dans le phloème.

Après l'appontage sur une plante de maïs, la cicadelle insère ses stylets dans le limbe foliaire en quelques secondes, et perfore les parois et les membranes cellulaires de l'épiderme et du mésophylle, en construisant sa gaine salivaire par l'intermédiaire de sa salive visqueuse. Ces différentes activités, nommées phase de pénétration des stylets dans le limbe foliaire, sont enregistrées pendant le signal de classe 1. Certaines des cellules rencontrées dans la progression intracellulaire des stylets et de la gaine sétale sont partiellement vidées de leur contenu cellulaire. Cette intense activité de « gobage » cellulaire, qui dure en moyenne une à deux minutes, est décrite pendant le signal de classe 2. Pour faciliter son avancée dans le limbe foliaire l'insecte empreinte volontier les méats du mésophylle, pour y installer une gaine sétale et y faire passer ses stylets. Cette activité est caractérisée par le signal de classe 3. Après dix minutes en moyenne de progression des stylets et de construction de la gaine salivaire, les activités alimentaires vont se poursuivre dans le faisceau vasculaire. Une gaine

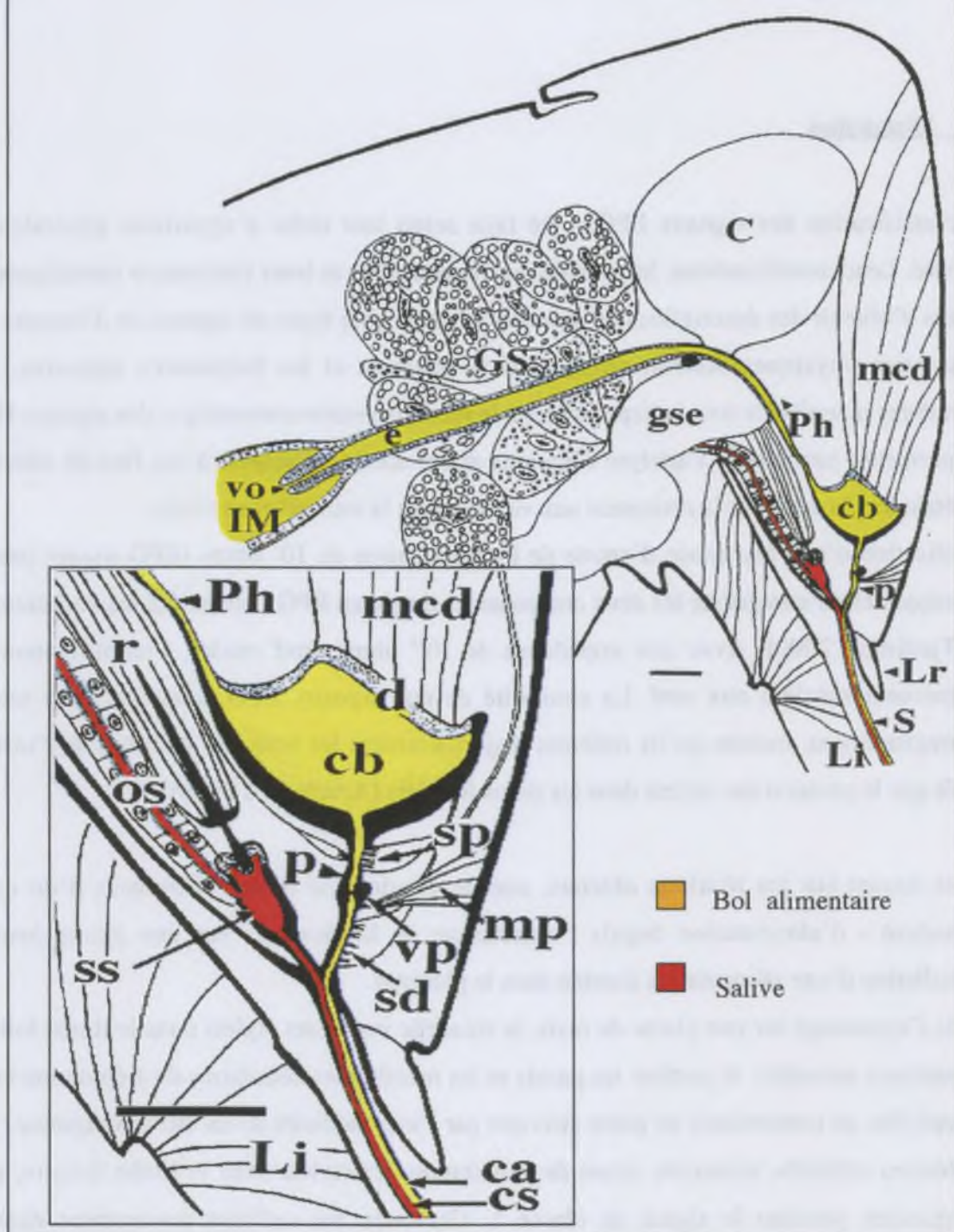


Figure 13. Représentation schématique de la tête et du prothorax d'une cicadelle, avec vue latérale du système digestif antérieur et de l'appareil salivaire (d'après Ammar, 1991). Détails du cibarium, du précibarium et de la seringue salivaire. C : cerveau; ca : canal alimentaire; cb : cibarium (pompe alimentaire); cs : canal salivaire; d : diaphragme cibarial; e : œsophage; GS : glandes salivaires; gse : ganglion suboesophagial; IM : intestin moyen; Li : labium; Lr : labre; mcd : muscle dilateur cibarial; mp : muscle de la valve précibariale; os : conduit salivaire; p : précibarium; Ph : pharynx; r : muscle rétracteur du piston; S : stylets; sd : récepteurs sensoriels du précibarium distale; sp : récepteurs sensoriels du précibarium proximale; ss : seringue salivaire (pompe salivaire); vo : valve oesophagiale ou valve cardiaque; vp : valve précibariale. Barres = 50 µm.

sétale semble le plus souvent installée dans le xylème pour organiser une alimentation durable dans un tube criblé. Une minuscule ouverture est pratiquée dans les parois et la membrane plasmique séparant le faisceau du xylème du tube criblé, où seul pénètre l'extrémité apicale des stylets maxillaires (Article N°2 Figure 5C). L'alimentation dans le tube criblé peut se prolonger pendant plusieurs heures. Cette position tissulaire de l'alimentation est caractérisée par deux signaux successifs mais distincts de part l'activité de l'insecte : le classe 4, qui dure en moyenne 33 minutes, et le classe 5, qui peut durer plusieurs heures.

Après cette description dynamique de l'alimentation d'une cicadelle, les spécificités des activités biologiques de l'insecte pendant ces cinq signaux et leurs conséquences sur la transmission virales sont abordées.

Les cellules non phloémiennes partiellement vidées de leur contenu cellulaire sont minutieusement perforées. Cette intense activité d'ingestion se traduit par une forte activité de la pompe alimentaire et est caractérisée par le signal de classe 2 (Figure 13). Ce signal est similaire au signal EPG de type G enregistré avec des pucerons lors d'ingestions actives dans le xylème (Tjallingii, 1988 ; tableau 3). Contrairement aux pucerons, aucun des résultats obtenus sur cicadelle ne montre une ingestion active dans le xylème. En effet, aucun signal de classe 2 n'a été détecté avant l'enregistrement des signaux de classes 4 et 5, alors que les stylets traversaient un faisceau du xylème à partir duquel les ponctions phloémiennes ont eu lieu. Au contraire, les enregistrements des signaux de classe 4 étaient précédés d'un long signal de classe 1 (Article N°2 Table 2). Cette similarité entre le signal de classe 2 des cicadelles et le signal G des pucerons provient donc d'une activité musculaire similaire, même si celle-ci n'a pas lieu dans les mêmes tissus. La description de ce signal sera donc plutôt une activité, « ingestion active », qu'une position tissulaire des stylets telle que « ingestion non phloémienne », qui serait trop générale, ou « ingestion dans le xylème », qui serait trop restrictive.

Les sévères dommages observés dans les cellules végétales vidées de leur contenu cellulaire par *C. mbila* suggèrent que les membranes nucléaires sont déchirées et que les géminivirus potentiellement présents dans les noyaux des cellules infectées, sous forme de pseudo-cristaux, auraient pu être ingérés. Bien que la phase d'alimentation de *C. mbila* dans les cellules non vasculaires soit relativement courte, comparée à celle dans les tubes criblés, elle semble suffisante pour permettre une acquisition efficace de particules de géminivirus. En

effet, *C. mbila* est capable d'acquérir le MSV suite à une période d'alimentation de quelques secondes sur plantes virosées (Storey, 1938 ; Reynaud, 1988). Des études antérieures montrent que les stylets des pucerons présentent un trajet extracellulaire mais avec des intrusions « intracellulaires » entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique (Kimmins & Tjallingii, 1985 ; Tjallingii & Hogen-Esch, 1993). Au cours de ces phases extracellulaires intramurales, les pucerons réalisent des ponctions cellulaires, qui ne désorganisent pas les cellules et ne provoquent pas leurs morts (Powell *et al.*, 1995). La quantité de matériel prélevée par ces insectes serait vraisemblablement trop faible et pas assez violente pour acquérir des virions présentant une localisation nucléaire.

Les premières études du comportement alimentaire des aleurodes en EPG-DC suggèrent qu'il est similaire à celui des pucerons (Janssen *et al.*, 1989 ; Lei *et al.*, 1998 ; Johnson & Walker, 1999). Le faible nombre d'ingestion de contenus cellulaires non phloémiens (Janssen *et al.*, 1989 ; Johnson & Walker, 1999), pourrait expliquer l'efficacité relativement faible des aleurodes à transmettre les géminivirus (Bedford *et al.*, 1994a), comparativement à *C. mbila*. Le fait que les géminivirus ne sont pas acquis par les aleurodes vecteurs aussi rapidement que par les cicadelles (Harrison, 1985 ; Markham *et al.*, 1995), est très certainement une des conséquences de la différence de comportement alimentaire entre les vecteurs. L'utilisation de l'EPG dans une étude comparative des comportements alimentaires des aleurodes et des cicadelles en relation avec l'efficacité de la transmission des géminivirus permettrait de confirmer ces hypothèses.

La répartition tissulaire différente entre les mastrévirus et les bégomovirus semble également intervenir dans l'efficacité différentielle d'acquisition virale entre les cicadelles et les aleurodes. En effet, les mastrévirus tels que le MSV et le *Chloris striate mosaic mastrevirus* (CSMV ; Pinner *et al.*, 1993 ; Bigarré, 1999) ne sont pas des virus limités aux tissus vasculaires. Cependant, cela ne semble pas être le cas pour le BCTV (curtovirus) (Esau & Magyarosy, 1979 d'après Pinner *et al.*, 1993). Quant aux bégomovirus, malgré quelques exceptions tels que le *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) et le *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) qui ont été détectés dans la plupart des types tissulaires (Rushing *et al.*, 1987 ; Wang *et al.*, 1996a), ils sont majoritairement considérés comme des virus limités au phloème (Horns & Jeske, 1991). Or, le temps minimum d'AAP des bégomovirus (> 30 min ; Markham *et al.*, 1995) est compatible avec le temps moyen nécessaire aux aleurodes pour atteindre le phloème

(15 à 30 min ; Lei *et al.*, 1998). Par conséquent, la localisation cellulaire des bégomovirus semble incompatible avec une AAP courte, comparativement à celle des mastrevirus.

Réciproquement, *C. mbila* ne se contente pas de faire des piqûres d'essai, mais il provoque de graves dégâts aux cellules non phloémiennes en les vidant partiellement de leur contenu cellulaire ou en les traversant avec ses stylets. Ces activités meurtrières pour les cellules ne fournissent pas aux virus, potentiellement inoculables par la salive, un environnement compatible avec leurs survies et leurs multiplications. Ceci pourrait expliquer pourquoi les cicadelles n'ont jamais été décrites comme vecteurs de virus non circulant non persistant et qu'ils sont impliqués dans la transmission non circulante semi-persistante de trois virus seulement sur les 43 décrits (Voir Article N°1 ; Nault, 1997). De manière équivalente, la faible fréquence de pds effectuée par les aleurodes lors du trajet intercellulaire des stylets semble expliquer la maigre proportion de virus non circulants non persistants, trois sur les 211 décrits, et semi-persistants, cinq sur les 43 décrits, transmis (Nault, 1997).

Le trajet des stylets dans le limbe foliaire empreinte souvent des méats, une activité qui est caractérisée par le signal de classe 3. La position des stylets dans des vides extracellulaires ne semble pas liée à l'alimentation en soi. Elle pourrait intervenir à la fois dans le contrôle de leurs trajectoires (Pollard, 1969) et dans le souci d'échapper aux mécanismes de résistance de la plante à l'insecte, en limitant les blessures cellulaires. En effet, les travaux de Pollard (1969) ont montré que le positionnement précis de l'extrémité des stylets maxillaires est dépendant des tissus empruntés auparavant. Dans des tissus denses, sans lacunes extracellulaires, le passage répété des stylets à travers les parois cellulaires va limiter les phénomènes de protraction, de rétraction et de rotation des stylets, qui interviennent dans l'orientation de leurs progressions. Dans des tissus spongieux au contraire, les méats extracellulaires offrent des zones où la flexibilité et les mouvements latéraux des stylets permettront à l'insecte de positionner précisément l'apex des stylets maxillaires. Les travaux sur les pucerons ont montré que le processus alimentaire repose, en règle général, sur une stratégie d'évitement des réactions de défense de la plante, grâce à la prédominance de la progression intercellulaire d'une part et la formation de la gaine sétale d'autre part (Sauge, 1999). Les enzymes salivaires injectées dans la plante seraient susceptibles d'élucider les réactions de défense de la plante aux piqûres d'insectes (Campbell & Dreyer, 1990 d'après Sauge, 1999).

Le chemin suivi par les stylets et la gaine sétale de *C. mbila*, dans la variété de maïs Sabrina, débouche habituellement dans un faisceau vasculaire et plus précisément dans un tube criblé. Le contact entre les stylets de la cicadelle et le phloème va générer deux signaux successifs mais distincts : les signaux de classes 4 et 5.

La présence de matériel fortement contrasté dans les tubes criblés à la fin de la période de classe 4 et d'une fréquence majoritaire de 0,4 à 0,6 Hz, suggère que le signal de classe 4 est le résultat d'une intense activité de la pompe salivaire (Figure 13). Inversement, l'absence à la fois d'une fréquence de 5 à 7 Hz, correspondant à l'activité de la pompe alimentaire et de la valve précibariale, et d'une production de miellat indique que *C. mbila* n'est pas engagé dans un processus d'ingestion alimentaire. L'ensemble de ces données implique que le signal de classe 4 de *C. mbila* correspond à une phase de salivation, sans ingestion, comparable au signal E1 des pucerons.

L'ensemble des données actuelles sur la transmission du MSV par *C. mbila* suggère que le virus est inoculé directement dans les tubes criblés. Par conséquent, les activités de salivation dans le phloème du signal de classe 4 semblent particulièrement bien adaptées à l'inoculation du MSV par les cicadelles vectrices. Ces données confirment la corrélation démontrée par Kimmins et Bosque-Perez (1996), entre le passage au signal de classe 4, ainsi que sa durée, et l'efficacité de la transmission du MSV par *C. storeyi*.

L'ensemble de nos résultats, obtenus par EPG et par MET, montre que le signal de classe 5 correspond à une phase d'ingestion phloémienne. La similarité des médianes des signaux 4 et 5, et le passage systématique de l'un à l'autre, sans chute de potentiel, suggèrent que l'alimentation de l'insecte s'effectue dans la même cellule du tube criblé. La fréquence majeure du signal de classe 5 est équivalente à celle du classe 2, qui correspond à l'activité de la pompe alimentaire (Tjallingii, 1988). Cependant, l'amplitude de la fréquence est en moyenne dix fois plus faible que celle enregistrée pour le signal de classe 2, suggérant que la procédure d'alimentation dans le phloème est différente de celle des autres cellules. Cette différence a été imputée pour les pucerons à la pression positive du phloème, qui permet aux insectes piqueur suceurs de s'alimenter sans l'aide de leur pompe alimentaire (Tjallingii, 1994). Etant donné que cette pression est beaucoup plus importante que la capacité d'ingestion des insectes, la cicadelle est dans l'obligation de limiter l'entrée du flux de sève élaborée par l'intermédiaire de la valve précibariale (Figure 13 ; McLean & Kinsey, 1984).

Cette valve présente la même fréquence d'activité que la pompe alimentaire mais est associée à un muscle beaucoup moins puissant. C'est pour cela, que le signal de classe 5 correspond, comme son homologue E2 chez les pucerons, à une ingestion passive dans le phloème. La séparation du signal de classe 5 en deux sous classes qui se succèdent, serait le reflet de l'augmentation de la difficulté de l'insecte à se nourrir. La diminution de la pression phloémienne, au cours de l'alimentation, entraîne une augmentation de la durée d'ouverture de la valve précibariale dans le but de maintenir un volume de bol alimentaire constant. La présence de signaux de classe 4 d'environ une minute, au sein d'une longue période de classe 5, suggère que l'insecte a la capacité de prolonger son alimentation dans un tube criblé, malgré les mécanismes de résistance qui se manifestent dans le système phloémien. La salive aqueuse, qui est produite pendant ces phases 4 intermittentes, serviraient vraisemblablement à fluidifier la sève élaborée pour faciliter son ingestion pendant les phases 5.

Par MET, nous avons montré que le canal salivaire de *C. mbila* se jette dans le canal alimentaire, avant l'extrémité des stylets maxillaires conformément aux observations faites sur pucerons (Forbes, 1969). De ce fait, lors de l'alimentation caractérisée par le signal de classe 5, la salive aqueuse, potentiellement vectrice des particules virales, est directement mélangée et ingérée avec le flux positif de sève phloémienne à l'intérieur du canal alimentaire, sans atteindre les tubes criblés. Par conséquent, malgré la détection d'une faible activité de salivation (fréquence 0,4 Hz), le signal de classe 5 ne participe vraisemblablement pas à l'inoculation virale.

La phase de salivation dans le tube criblé caractérisée par le signal de classe 4 semble être une étape nécessaire avant le passage à la phase d'ingestion (classe 5). Cette succession, également décrite chez les pucerons, suggère que la salive intervient dans l'inactivation des mécanismes de défense des plantes. La durée du signal de classe 4 et la fréquence de non passage au signal de classe 5 semblent constituer des paramètres quantitatifs efficaces de la résistance des plantes à l'insecte, déjà utilisés sur d'autres insectes tels que les pucerons (Chen *et al.*, 1997 ; Sauge *et al.*, 1998 ; Klingler *et al.*, 1998) et les aleurodes (Lei *et al.*, 1999).

En conclusion, le comportement alimentaire des cicadelles, lors de la progression des stylets à travers les tissus foliaires, est un ensemble d'activités multiples et complexes dont certaines sont intimement liées à la transmission virale. Les différences de comportement alimentaire observées en EPG entre les trois principales familles de vecteurs de virus circulants non

multipliants (pucerons, aleurodes et cicadelles), semblent fortement corrélées à leur spécificité de transmission.

Chapitre II



Alimentation artificielle sur membrane de parafilm®

Chapitre II.

Persistance et dynamique du MSV dans les compartiments de *C. mbila*, impliqués dans la transmission circulante non multipliante, étudiées par PCR.

II.1. Introduction et Objectifs

La classification des stratégies de transmission virale par insectes vecteurs de type piqueur suceur permet de distinguer trois catégories (Voir Article N°1). Premièrement, les virus non circulants qui ne traversent aucune paroi cellulaire et dont la période de rétention par leur vecteur est courte. Deuxièmement, les virus circulants multipliants, qui sont internalisés par les membranes cellulaires et se multiplient dans la plupart des types tissulaires de l'insecte. Pour cette raison, le vecteur reste infectieux à vie. Les virus multipliants sont considérés comme des virus d'insectes phytophages ayant acquis au cours de l'évolution, les fonctions nécessaires à leur réplication et propagation dans les plantes. Enfin, les virus circulants non multipliants, qui ont la capacité de traverser les parois cellulaires de leur vecteur mais sans se répliquer. Malgré cette absence de multiplication, la plupart de ces virus persistent dans leur vecteur pendant plusieurs semaines voir jusqu'à la mort de l'insecte.

Bien que des progrès importants dans la compréhension de la transmission circulante non multipliante du MSV par *C. mbila* ont été réalisés, suites aux travaux de Storey entre 1920 et 1940, le mystère de la persistance virale à vie de l'insecte, suite à une alimentation infectieuse, et de la spécificité de transmission reste intact. Beaucoup d'efforts ont porté sur le cycle des géminivirus dans leurs plantes hôtes et les facteurs viraux impliqués, mais peu de données nouvelles sont disponibles concernant les interactions des géminivirus avec les différents compartiments internes de leurs insectes vecteurs.

Notre deuxième objectif de la thèse a donc été d'élucider l'énigme de la persistance du MSV au sein de son vecteur *C. mbila* et d'identifier les barrières à la transmission et les lieux de préservations des particules virales dans le corps de l'insecte. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de détection et de dosage relatif la plus sensible actuellement : la PCR.

Les résultats de nos travaux concernant la persistance et la dynamique du MSV dans les compartiments impliqués dans la transmission circulante sont présentés sous la forme d'un

article soumis à la revue *Virology*. Ils seront discutées en relation avec la capacité des cicadelles à transmettre des géminivirus, comparativement à d'autres vecteurs de géminivirus les aleurodes et de virus circulants non multipliants les pucerons. Une discussion en français rappellera les faits marquants de l'article et la complètera de façon plus spéculative par un modèle sur les flux de particules entre les compartiments.

II.2. Article N°3 soumis à la revue *Virology*

PCR-based studies of the spatial and temporal distribution of a geminivirus in leafhoppers of the genus *Cicadulina*

Jean-Michel Lett,^{*,†,‡} Martine Granier,^{*} Isabelle Hippolyte,[#] Martial Grondin,[†] Monique Royer,[‡] Stéphane Blanc,[§] Bernard Reynaud,[†] and Michel Peterschmitt^{*,1}

CIRAD-AMIS, Laboratoires de ^{*}Virologie, [‡]IGEPAM et [#]BIOTROP-ALBHADES, TA 40/02, 34398 Montpellier Cedex 5, France, [†]Pôle de Protection des Plantes, Station Ligne Paradis, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France; INRA-CNRS, [§]Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, Station de pathologie comparée, 30380 Saint-Christol les Alès, France

¹: correspondence and reprint requests may be addressed to: Fax: 334 67 61 55 05, E-mail: michel.peterschmitt@cirad.fr

ABSTRACT

Spatial and temporal distribution of maize streak mastrevirus (MSV, *Geminiviridae*) was monitored in the vector species *Cicadulina mbila* and a non vector species *C. chinaï*, using conventional and/or real-time quantitative PCR. Sustained feeding on MSV infected plants, showed that virus accumulation reaches a maximum in *C. chinaï*, but not in *C. mbila*. After a 3-day acquisition access feeding period (AAP), MSV is detected in the gut, the hemolymph, and the salivary glands of *C. mbila*, but only in the gut of *C. chinaï*. Similarly, *Digitaria streak mastrevirus* which is not transmitted by any of the two species, is only detected in the gut. MSV was detected in the hemolymph of *C. mbila* 3 hours after the beginning of the AAP. Although viral DNA is progressively decreasing in the vector and non vector species after a 3-day AAP, MSV DNA remained stable in the salivary glands of *C. mbila*.

Key words: circulative transmission, *Geminiviridae*, *Mastrevirus*, MSV, leafhopper, *Cicadulina*, PCR, real-time quantitative PCR, viral genome quantification, viral kinetics, insect compartments, transmission barrier.

INTRODUCTION

Viruses of the family *Geminiviridae* are categorized as plant viruses transmitted by piercing-sucking insects in a circulative nonpropagative manner (Harrison, 1985). However, the cell membranes crossing that is generally implied by a circulative transmission was never established in cases involving geminiviruses. It is supposed that the receptor-mediated endocytosis mechanisms detected for viruses in the family *Luteoviridae* (Gildow, 1987, 1993) are equally present in the family *Geminiviridae*, since both are classified in the same group of circulative non propagated viruses (Gray and Banerjee, 1999). However, there are numerous differences between viruses belonging to these two families and results obtained for one cannot be directly extrapolated to the other.

Viruses in the family *Luteoviridae* are transmitted by aphids, whereas in the family *Geminiviridae*, viruses of the genus *Mastrevirus* are transmitted by leafhoppers (*Cicadellidae*), those of the genus *Curtovirus* by leafhoppers and treehoppers (*Membracidae*) and those belonging to the *Begomovirus* genus by whiteflies (*Aleyrodidae*). While a virus replication in insect vector has never been suggested for in the family *Luteoviridae*, the situation yet appears to be unclear in geminiviruses. In spite of several studies which did not show an increase of the viral amount in vectors that have fed on plants infected by viruses of the family *Geminiviridae* (Caciagli and Bosco, 1997; Reynaud and Peterschmitt, 1992), a possible replication of two isolates of TYLCV in its vector *Bemisia argentifolii* has been suggested (Morin *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 1994). The mechanism of the transmission of geminiviruses appears to be more complex than that of viruses of the family *Luteoviridae*. This was further established through (1) the transovarial and sexual transmission of an Israeli isolate of *Tomato yellow leaf curl begomovirus* (TYLCV-Is) by *Bemisia tabaci* (Ghanim *et al.*, 1998; Ghanim and Czosnek, 2000), (2) the presence of *Squash leaf curl begomovirus* (SLCV) in different types of whitefly tissues exhibiting cytopathologic changes (Hunter *et al.*, 1998; Pesic-Van Esbroeck *et al.*, 1995), (3) and the negative impact of TYLCV-Is on the biology and reproduction of its *B. tabaci* vectors (Rubinstein and Czosnek, 1997).

This study aims at increasing our knowledge of the circulative nonpropagative transmission of geminiviruses in the case of a virus belonging to the *Mastrevirus* genus, the *Maize streak virus* (MSV) transmitted by 8 out of 22 species of leafhoppers belonging to the genus *Cicadulina* (Webb, 1987). Like in viruses of the family *Luteoviridae* and in begomoviruses, it was shown that there is no increase of the virus amount in the insects after an acquisition

access feeding period (AAP) on infected plants, which indicate a nonpropagative transmission (Boulton and Markham, 1986; Reynaud and Peterschmitt, 1992). Moreover, the transmission of MSV by a non-vector species belonging to the genus *Cicadulina* was made possible by virus injection into the hemolymph, showing that the gut wall acts as a barrier to transmission (Storey, 1938; Markham *et al.*, 1984; Reynaud, 1988). These data represent fragmentary information on the cycle of MSV in *C. mbila* which remain to be completed. In this report, we use a novel procedure based on PCR to investigate the relationship between MSV and its insect vector. We were able to (1) confirm that virus is persistent and able to accumulate in its vector without replication, (2) show that the gut wall acts as a physical barrier to its transmission and (3) identify the parts in the insect used by the virus for transport and/or storage. The quantification of the viral amount through the PCR technique produces the first report on the dynamics of a virus through its vector. It enables us to propose a model explaining the circulation of geminiviruses through their vectors consistent with the circulative nonpropagative transmission.

RESULTS

Transmission specificity tests with different virus / vector combinations

A series of biological tests (Table 1) were carried out with our lines and populations of leafhoppers and our viral isolates in order to confirm previously obtained results (Storey, 1938; Markham *et al.*, 1984; Reynaud, 1988). *C. mbila* became capable of transmitting the MSV after feeding on infected plants, on virus extracts through membranes, or when it was microinjected into the hemolymph with virus extracts. On the other hand *C. chinai* was unable to transmit the virus after feeding on infected plants or through membranes. For *C. chinai* transmission was only possible after injecting the virus in the hemolymph. *Digitaria streak mastrevirus* (DSV) and *Rice yellow mottle sobemovirus* (RYMV) were not transmitted by *C. mbila* or by *C. chinai* under our experimental conditions. The results showed that, as far as transmission was concerned, the biological materials used for this study have similar behavioral traits as those used in earlier tests. Notably, we confirm that a non-vector species belonging to the *Cicadulina* genus is able to transmit the MSV when virus access across the gut wall is bypassed.

MSV accumulation in whole insects maintained on virus infected plants

To test if the difference between *C. mbila* and *C. chinaii*, concerning transmission, could be attributed to unefficient acquisition of the virus by *C. chinaii*, individuals of both species were tested for the presence of MSV during a sustained feeding on infected plants. The MSV was detected by PCR in vector and non-vector insects collected during the whole testing phase (Fig. 1A), showing no difference between the two species regarding MSV acquisition. Further studies, with the same individuals tested with real-time quantitative PCR, showed that the viral amount for *C. mbila* was estimated at 960000 copies of viral DNA on termination of the test, while for *C. chinaii* the estimation did not cross 200000 copies at any stage (Fig. 1B). This indicates a difference of virus accumulation but seemingly not a difference of virus accessibility because during the first six hours of AAP, the viral accumulation rate was similar between the two species. For *C. chinaii* the number of viral DNA copies very quickly attains a plateau of 200000 copies, while in the case of *C. mbila* the figure keeps rising right up to the end of the test. Therefore, it appears that the vector species continued to accumulate the virus with the passage of time, while the non-vector species quickly attained a saturation level.

MSV persistence in whole insects following a 3-day AAP

In order to investigate if this difference between *C. mbila* and *C. chinaii* regarding MSV accumulation rate was related to a difference in the quality of stocking, the fate of the acquired virions were assessed for leafhoppers that were separated from their viral source after a 3-day AAP. The MSV was detected by PCR in *C. mbila* throughout the testing phase with apparently no reduction of the intensity of the band corresponding to the specific amplification product (Fig. 2A). With *C. chinaii* however, the intensity of the band was progressively reduced and was not detected beyond 14 days after termination of AAP (T14). These results demonstrate that the characteristics of viral storage in *C. mbila* and in *C. chinaii* are different. Classic PCR cannot determine if the rates of virus were equivalent for both species at T0 and whether the rate of virus in *C. mbila* was actually stable in time. Therefore, real-time quantitative PCR assays were conducted on the same samples (Fig. 2B). On termination of AAP, the virus amount in *C. mbila* was 26 times greater than that in *C. chinaii*. In a span of five days this initial viral amount reduced by six times in *C. mbila* and by 190 times in *C. chinaii*. Thereafter, the viral amount remained in the vicinity of 30000 copies in the

vector insects, but was below the accuracy threshold of quantitative PCR tests (approximately 10 copies; Rasmussen *et al.*, 1998) in the non vector insects beyond T14. The chronological reduction in the viral amount in vector insects confirms that the MSV transmission is of the nonpropagative type. The difference between the two species regarding the virion rates at time T0 and the slope difference of the downward curves for the viral amount in the insects, confirm that there is a difference in the virus retention characteristics between *C. mbila* and *C. chinaï*.

MSV persistence in the gut, hemolymph and salivary glands

The difference in virus retention was further analysed based on a modification of the previous experiment. The three compartments that play a role in circulative transmission were separately tested (Fig. 3). PCR assays allow to detect the MSV in the gut, in the hemolymph and in the head of *C. mbila*, collected throughout the testing phase. The detection of the virus in the head and in the hemolymph during the entire testing phase is compatible with transmission. It points towards a continuous movement of viral particles through the three compartments and a constant flow of virions towards the hemolymph and the salivary glands. In *C. chinaï*, the intensity of the bands corresponding to the specific PCR products obtained with the gut samples were gradually decreasing from time T0 until T7 and were not detected from T10 onwards. With the exception of T0, the virus was not detected in the hemolymph and the salivary glands of *C. chinaï*. This is compatible with non-transmission. These observations show that the gut wall acts as a specific barrier to the flow of MSV particles. The restriction of the virus to the gut of *C. chinaï* is consistent with its inefficiency in accumulating and retaining the virus (Fig. 1 and 2).

DSV persistence in the gut, hemolymph and salivary glands

To further confirm that the gut is an important barrier in the mastrevirus/leafhopper relationship, the previous experiment was repeated with other incompatible mastrevirus/leafhopper combinations; *Digitaria streak mastrevirus* (DSV) is genetically close to the MSV, but experimentally non-transmissible by *C. mbila* and *C. chinaï* (Fig. 4). DSV was detected in the intestinal tract of both *C. mbila* and *C. chinaï* throughout testing phase. Nevertheless, the concentration of the amplification product reduced chronologically following the termination of the 3-day AAP. This tendency is more striking in *C. chinaï*. DSV

was not detected in the head and hemolymph of *C. mbila* and *C. chinai*, except at T0 where it is detected in the head and hemolymph of *C. mbila*, and at T0 and T1 where it is detected in the hemolymph of *C. chinai*. The restriction of DSV in the guts of the two non-vector species is similar to the restriction of MSV in the gut of the non-vector species *C. chinai*.

MSV flow-rate across the gut wall

According to the four virus-vector combinations studied, the continuous virus flow across the gut wall was only observed in the case of the combination for which transmission was possible. This suggests that it is a specific phenomenon that could be rapidly produced after the vector insect was given access to a viral source. In order to demonstrate the potential flow velocity, the AAP was reduced from three days to three hours and leafhoppers were collected for testing every hour during and after the 3-h AAP (Fig. 5). MSV was detected in the guts of *C. mbila* and *C. chinai*, in all the samples collected after the beginning of the AAP, confirming acquisition of the virus. MSV was not detected in any hemolymph sample of *C. chinai*. On the other hand, the virus was detected in the hemolymph samples of *C. mbila* collected at the end of the 3-hour AAP and afterwards. The intensity of the amplification signal gradually increase from the first detection till the end of the test.

Quantitative PCR-based monitoring of the virus amount in the three compartments of insect vectors

The fact that the virus enters into the insect through the gut and exits through salivary glands implies a viral flow through the insect body. The previous experiment showed that this flow was very rapidly detected by the presence of virus in the hemolymph samples collected three hours after the beginning of the 3-h AAP. To further analyse this flow, a set of vector insect extracts from the three compartments involved in circulative transmission and previously shown to persistently contain virus (Fig. 3), were tested again with real-time quantitative PCR (Fig. 6). Interestingly, the number of MSV DNA copies detected in the gut and in the hemolymph is decreasing of about 90% during the 26 days following the 3-day AAP, whereas the number of copies detected in the salivary glands was stable. The decrease appeared to be higher during the first 10 days than after 15 days. During the whole testing period, the number of copies detected in the gut was shown to be the highest, ranging between 93200 and 6300, whereas the number of copies detected in the hemolymph was the lowest, ranging between

700 and 100. The number of copies detected in the salivary glands was always in between with about 3200 copies.

DISCUSSION

The PCR as a study tool for viral transmission

The PCR procedure has the required accuracy for detecting geminiviruses in an individual insect or in a dissected organ (results not shown; Navot *et al.*, 1992; Rosell *et al.*, 1999). However, groups of 10 insects were tested together to eliminate the inter-individual variability. The comparison of vector and non-vector insects regarding virus occurrence in the three compartments involved in the circulative transmission, provide information on transmission barriers (our results; Atzmon *et al.*, 1998; Rosell *et al.*, 1999). This comparison can be monitored over time to assess the persistence of the virus within the insect. While testing the same samples by normal PCR and by real-time quantitative PCR, it was shown that the intensity of detection signals in the normal PCR is proportional only under the saturation threshold of viral DNA copies (compare Fig. 1 and Fig. 2). On the other hand, the real-time quantitative PCR, which is adding to the accuracy of the PCR procedure, the possibility of quantifying the number of viral DNA copies, enables to estimate the evolution of the viral amount in each compartment, providing data from which viral flow and viral storage may be deduced. The use of real-time quantitative PCR in other vector-virus combinations may further improve the comprehension of the transmission mechanisms and their kinetics in circulative viruses.

The gut wall acting as a physical barrier for geminiviruses

The following three combinations, each formed of a leafhopper and a non-transmitted geminivirus, were analyzed: *C. chinai*-MSV, *C. mbila*-DSV and *C. chinai*-DSV. In all three cases the presence of the virus is restricted at the gut level. This indicates that the gut acts as a physical barrier for the transmission. The occasional detection of virus in the hemolymph of non-vector species is apparently not attributable to experimental contaminations, because it always appears in the first insect sample collected after the end of the AAP. This suggest that the gut wall is not totally impassable. The virus amount in the hemolymph of *C. chinai* However, since the *C. chinai* population on which PCR tests were carried out, was shown to

be non-vector (Table 1), it suggests that the virus amount detected in hemolymph samples does not suffice for attaining the required level for MSV transmission. Such a level is apparently attained by injecting crude extract of virus-infected plants or purified virus in the hemolymph. The requirement of minimal viral doses in some compartments of the insect body for successful transmission needs to be further investigated. Alternatively, the virus detected in hemolymph sample of non vectors may correspond to naked DNA. This would remain consistent with non transmission because the integrity of geminivirus particles is required for successful transmission (Harrison, 1985). The viral detection on the termination of AAP in the head of non-vector species is possibly a phenomenon related to the presence of virions in the alimentary bolus found in the anterior digestive system.

The restriction of MSV and DSV in the gut of non-vector species is coupled with a relatively quick reduction of the viral amount in time. The reduction rate appears to be slower for DSV compared to MSV. This could be the result of a different susceptibility of the particles to the biochemical and physical conditions existing within the gut. In fact, unlike DSV, the integrity of MSV is hardly maintained during the purification process (results not shown; Harrison, 1985). This emphasize that the preservation of MSV in its vector *C. mbila* needs a peculiar mechanism that makes MSV persistence and transmission possible. It could involve an internalization of the virions by receptor-mediated endocytosis, in conformity with what was demonstrated for the *Luteoviridae*/aphid model (Gildow, 1987).

Anyhow, whatever the mechanism is, the MSV crosses the gut wall in less than three hours after the beginning of AAP. A similar crossing speed was obtained with another geminivirus, SLCV, which was detected by PCR in the hemolymph of *B. tabaci* in less than two hours (Rosell *et al.*, 1999). The speed with which the geminiviruses cross the gut wall of vector insects argues for the existence of an active mechanism for trans-membrane flow using a specific receptor.

Presence of a second level barrier

The non-transmission of DSV by *C. mbila* and *C. chinai*, even by bypassing the gut wall, suggests the presence of a second level barrier to the transmission of geminivirus by leafhoppers. This hypothesis was already suggested in the studies of Markham *et al.* (1984), where it was observed that all insects belonging to the *Cicadulina* genus were not capable of transmitting the MSV after being microinjected with virus. This second transmission barrier

seems to be related to the flow across salivary glands. However the ability of the virus to survive in the hemolymph may also be responsible since the persistence and the transmission efficiency of the *Luteoviridae* particles by aphids and of TYLCV by *B. tabaci* seems to be related to the virus interaction with homologues of GroEL (Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997; Filichkin *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1999). GroEL involvement in the circulative transmission of geminiviruses by leafhoppers needs to be tested.

Storage and preservation of viral particles

The gradual increase in the viral amount in *C. mbila*, during sustained feeding on diseased plants, confirmed that the vector insect is capable of accumulating a significant quantity of MSV particles (Fig. 1; Reynaud and Peterschmitt, 1992). This quantity does not seem to restrict towards a limit level in the manner it was suggested in the *B. tabaci* vector insect for TYLCV and SLCV (respectively Zeidan and Czosnek, 1991; Polston *et al.*, 1990). In the case of the non-vector insect *C. chinai*, this quantity is rapidly reaching a saturation level that seems to correspond to an equilibrium of the amount of virus in the intestinal tract, between acquisition of new particles and elimination of particles through the phenomena of nucleoprotein intake, biological digestion and intestinal transit. Our results suggest that the difference observed in the viral amount between *C. mbila* and *C. chinai* (Fig. 1 and 2) seems to account for the part of particles internalized by the former and stored in epithelial cells of the intestinal tract, the salivary glands, and in the hemolymph, like it was suggested for the *Luteoviridae*/aphids model (Gildow, 1987, 1993; Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997). The similar MSV accumulation during the first few hours of AAP for *C. mbila* and for *C. chinai* (Fig. 1), suggests that the feeding behavior does not play a major role in the contrasted virus accumulation differences between vector species and non-vector species belonging to the genus *Cicadulina*. Nevertheless, this hypothesis needs to be reconfirmed with electrical penetration graph. The fact that viral DNA was not detected in *C. chinai*, beyond 14 days after termination of AAP (Fig. 2), suggests that the non stored virus was eliminated within about two weeks. Consequently, it can be assumed that the number of viral DNA copies persisting in *C. mbila* beyond 14 days after AAP (Fig. 2), correspond to the internalized and preserved viral particles. This is consistent with the trend of the curve showing the decrease of the viral DNA copies, with a steeper slope during the first 11 days compared to the slope observed afterwards (Fig. 2).

Dynamic model of circulative nonpropagative transmission of geminivirus through its leafhopper vector

The stability of the MSV concentration detected in the salivary glands of *C. mbila* is consistent with the ability of the vector to transmit the virus during its whole life. To explain this stability it has to be assumed that the virus released by the salivary glands into plants on which viruliferous vectors are feeding is permanently replaced by virus from another compartment, most likely the hemolymph. The fact that it is rather unlikely that the flow of virus release would equal to the entering flow of virus from the hemolymph suggest that the stability is rather due to a limited storing capacity of the salivary glands, corresponding to 3000 copies of viral DNA. Consequently, the unlimited MSV storage capacity of a vector insect is not related to this organ (Fig. 1). The similar decrease of the number of virus DNA copies detected in the gut and the hemolymph, 90% during the 26 days of test, suggest that it is due to a similar phenomenon. This decrease is probably the result of viral degradation and viral flow towards the salivary glands. The relatively low number of DNA copies detected in the hemolymph extracts may indicate that this compartment is a transit compartment which has no storing capacity. Thus, hemolymph appears to be a transit compartment, and the gut the organ which has apparently unlimited storing capacity. This observation is contrary to what was suggested for the circulative transmission of *Luteoviridae* and *Nanovirus* by aphids for which hemolymph was considered as the main storage compartment for viral particles (Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997; Franz *et al.*, 1998). The use of real-time quantitative PCR for the comparison of circulative nonpropagated viruses from different families and genera, should confirm this discrepancy.

MATERIALS AND METHODS

Viruses, leafhoppers and plants

The transmission tests and insect rearing were conducted in an insect proof containment chamber, at a temperature of 26 °C and with a photoperiod of 18/6 h. The leafhoppers are reared on millet plants (*Pennisetum typhoides*) which are non-hosts for MSV and DSV. The MSV was acquired from maize plants (*Zea mays ssp. mays*) agroinoculated with R2 clone from the Reunion Island (Isnard *et al.*, 1998). The DSV isolate was imported from the

Vanuatu archipelago and since then maintained on vegetatively propagated *Digitaria setigera* (Dollet *et al.*, 1986). Phylogenetic analysis showed that DSV is very closely related to MSV (Rybicki, 1994). Cloned DSV was agroinoculated to maize plants according the procedure described for MSV agroinoculation (Isnard *et al.*, 1998). The isolate of *Rice yellow mottle sobemovirus* (RYMV) is from Burkina Faso and was shown to be highly aggressive (NGuessan *et al.*, 2000). The RYMV is transmitted noncirculatively by coleopterous insects (Bakker, 1974). MSV and DSV transmission tests were conducted on maize plants belonging to the Golden Cross Bantam (Pioneer, France) variety. Other transmission tests were conducted with DSV on *D. setigera* plants originating from Vanuatu. The RYMV tests were done on the IR64 rice variety (*Oryza sativa ssp. indica*), which is very susceptible to RYMV and on which *C. mbila* is able to survive. The transmission tests were carried out with ten female insects per plant with an AAP and inoculation access feeding period (IAP) of 3 days each. Transmission was confirmed by characteristic symptom development occurring 8 to 10 days after inoculation. The non-transmission was confirmed by a DAS-ELISA test (Peterschmitt *et al.*, 1991).

The selection of a 100% transmitting population of *C. mbila* was achieved by six generations of brother-sister cross-breeding with leafhoppers originating from the Reunion Island, and tested positive for MSV transmission at each generation (Storey, 1932, 1938; Reynaud, 1988). The transmission efficiency of this population was subsequently monitored at each new generation by individual transmission tests. The *Cicadulina chinai* population used as a negative control for MSV transmission is originating from Egypt. The MSV and DSV particles were purified according to the protocols of Larsen and Duffus (1984) and Julia and Dollet (1989), respectively. The integrity of viral particles was verified by transmission electron microscopy (TEM). The serological testing were done using DAS-ELISA, according to Peterschmitt *et al.* (1991) for MSV and DSV, and according to Ioannidou *et al.* (2000) for RYMV.

Artificial feeding and microinjection in the hemolymph

The feeding system based on double membrane parafilm® (Costa *et al.*, 1997) was modified in order to obtain a feed under pressure with the help of a syringe. Feeding was only possible with the use of this mechanisms which somehow mimics the positive pressure of the phloem. The feed is made up of 20 % of sucrose, 0.02 % neutral red dye (Kuhlmann, France) and 0.1

mg/ml of purified virus or crude extract from diseased plants with a dilution ratio of 1/10 (Reynaud, 1988). Red color was used as a phototactic attractant and to monitor leafhopper feeding. The integrity of viral particles in the feeding solution is verified after 6 hours of AAP by TEM.

The crude extract of virus infected plants with a 1/10 dilution or the 0.1 mg/ml purified virus was injected in hemolymph with the help of micro-capillaries (Reynaud, 1988). The volume injected could not be accurately measured due to losses during the injection process; the volume seemed to fluctuate around 1 μ l.

DNA extraction and PCR analysis in whole and dissected insects

Whole insects or insect's components (gut, head, hemolymph) were always tested in groups of 10. Total DNA extraction was carried out by grinding insect material in liquid nitrogen and using the DNA extraction kit DNeasy Tissue (Qiagen, Germany). DNA was eluted in 100 μ l of sterile water. PCR assays were conducted with 2.5 μ l of template DNA in a total reaction volume of 25 μ l. For each virus, two pairs of specific primers were designed to amplify two fragments of overlapping DNA of approximately 1.4 kb each, together spanning the complete genome (Fig. 7). The two pairs of primers were tested separately for each PCR experiment. PCR amplification consisted of 30 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (1 min at 60 °C) and DNA extension (1 min at 72 °C). Amplified DNA fragments were electrophoresed in 1 % agarose (Quantum Biotechnologies, USA) gels in TBE buffer and detected with UV light after staining either with ethidium bromide for extracts from entire insect, head and gut, or with GelStar (TEBU, Fr) for extracts from hemolymph. Images of gels have been digitally processed by a Mitsubishi Video hardware and a ClaraVision (Polylabo) software.

Quantification of MSV DNA in whole and dissected insects

The LightCyclerTM (Idaho Technology, Idaho Falls, ID) was used for the real-time quantitative PCR procedure. The quantification was carried out on DNA extracts that were previously tested by conventional PCR (see above). DNA amplifications were done with the LC FastStart DNA Master SYBR Green kit (Roche Diagnostics, Fr) containing 1 μ M of each MSV specific primer (Primers 2233 and 1640; Fig. 7), 4 mM of MgCl₂ and 2 μ l of template DNA in a total reaction volume of 20 μ l. PCR amplification consisted of an initial 8 min denaturation step followed by 45 cycles of 10 s at 95°C, 5 s at 60°C and 30s at 72°C. At each

PCR cycle, the amount of specific product was monitored by the dsDNA binding dye SYBR Green I. The size of the unique PCR product was controlled on agarose gel (see above). For removing the non-specific product signal from the amplification curve the fluorescent signal was acquired at 78°C after every PCR cycle. The assessment of the number of MSV DNA copies was based on a standard amplification curve, obtained with a serial dilution of the most concentrated viral DNA sample from each test. It is assumed that the last dilution for which a fluorescence can be detected correspond to 10 copies of viral DNA.

Sustained feeding on MSV infected plants

Insects were maintained for 13 days on agroinoculated MSV infected plants. For each sampling date during this AAP, a sample of 10 insects was collected and frozen at -80°C. The frozen samples were simultaneously tested by PCR after the last sampling. This experiment was carried out one time.

Persistence of the virus in whole and dissected insects

After a 3-day AAP on agroinoculated plants, the insects were transferred to millet plants. The insects were sampled between 0 and 26 days after AAP. For every sampling, 10 females were harvested and frozen at -80°C. The frozen samples were simultaneously tested by PCR after the last sampling. The same experiment was carried out, except that the 10 insects were previously dissected under a stereomicroscope, for separately testing the hemolymph, the head and the intestinal tract. To avoid a contamination of the hemolymph by the alimentary bolus, the hemolymph was dissolved in 10 µl of sterile water after having made a tear on the ventral side of the abdominal cuticle, using forceps and under stereomicroscope. All the experiments were carried out three times.

Dynamics of virus flow across the gut wall

The speed with which the virus is able to cross the gut wall of *C. mbila* individuals was tested every hour during a 3-hour AAP on virus infected plants and subsequently after their transfer on millet plants. For enhancing the feeding during the AAPs, the insects were subjected to a preliminary 1-hour fasting period. Each sample consisted of 10 individuals which were immediately immobilized by placing them for 10 minutes at +4 °C and subsequently dissected

as above. The hemolymphs and guts of 10 female insects were recovered and stored at -80°C for a simultaneous testing after the last sampling. This experiment was carried out three times.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research was conducted during the thesis scholarship program of J. M. Lett, supported by le Ministère Français de la Recherche.

REFERENCES

- Atzmon, G., Van Oss, H., and Czosnek, H. (1998). PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors: application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 189-194.
- Bakker, W. (1974). "Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya." *PhD. Thesis*. Wageningen University, The Netherlands.
- Boulton, M. I., and Markham, P. G. (1986). The use of squash-blotting to detect plant pathogens in insect vectors. In "Developments in applied biology 1, 1986. Developments and applications in virus testing", pp. 55-69. Eds Jones, R.A.C. and L. Torrance. UK : Association of Applied Biologists, The Lavenham, Great Britain.
- Caciagli, P., and Bosco, D. (1997). Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* **87**, 610-613.
- Costa, H. S., Henneberry, T. J., and Toscano, N. C. (1997). Effects of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera:Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. *J. Econ. Entomol.* **90**, 333-339.
- Dollet, M., Accoto, G. P., Lisa, V., Menissier, J., and Boccardo, G. (1986). A geminivirus, serologically related to maize streak virus, from *Digitaria sanguinalis* from Vanuatu. *J. Gen. Virol.* **67**, 933-937.
- Filichkin, S. A., Brumfield, S., Filichkin, T. P., and Young, M. J. (1997). In vitro interactions of the aphid endosymbiotic symL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J. Virol.* **71**, 569-577.
- Franz, A., Makkouk, K. M., and Vetten, H. J. (1998). Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *J. Phytopathol.* **146**(7), 347-355.
- Ghanim, M., and Czosnek, H. (2000). Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *J. Virol.* **74**(10), 4738-45.

- Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M., and Czosnek, H. (1998). Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240**(2), 295-303.
- Gildow, F. E. (1987). Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Adv. Dis. Vector Res.* **4**, 93-120.
- Gildow, F. E. (1993). Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* **83**, 270-277.
- Gray, S. M., and Banerjee, N. (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(1), 128-148.
- Harrison, B. D. (1985). Advances in geminivirus research. *Annu. Rev. Phytopathol.* **23**, 55-82.
- Hunter, W. B., Hiebert, E., Webb, S. E., Tsai, J. H., and Polston, J. E. (1998). Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis.* **82**(10), 1147-1151.
- Ioannidou, D., Lett, J. M., Pinel, A., Assigbetse, K., Brugidou, C., Ghesquière, A., Nicole, M., and Fargette, D. (2000). Responses of *Oryza sativa japonica* sub-species to infection with *Rice yellow mottle virus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* PMPP00/026, in press.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B., and Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* **79**, 3091-3099.
- Julia, J. F., and Dollet, M. (1989). *Nesoclutha declivata* homoptera cicadellidae, vector of digitaria streak virus (geminivirus) in vanuatu. *Phytopathology* **127**, 42-48.
- Larsen, R. C., and Duffus, J. E. (1984). A simplified procedure for the purification of curly top virus and the isolation of its monomer and dimer particles. *Phytopathology* **74**, 114-118.
- Markham, P. G., Pinner, S., and Boulton, M. I. (1984). The transmission of MSV by leafhoppers, a new look at host adaptation. *Bull. Soc. Entomol. Suisse* **57**, 431-432.
- Mehta, P., Wyman, J. A., Nakhla, M. K., and Maxwell, D. P. (1994). Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. *J. Econ. Entomol.* **87**(5), 1285-90.
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., and Van den Heuvel, J. F. J. M. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75-84.

- Morin, S., Zeidan, M., and Czosnek, H. (1995). "Interactions between tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV), the tomato host plant and the whiteflies vector". Pages 85-88 in: *Adv. Vegetable Virus Res. Proc. 8th Conf. Virus Dis. Vegetables*, Prague.
- Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D., and Czosnek, H. (1992). Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* **82**, 1199-1202.
- NGuessan, P., Pinel, A., Caruana, M. L., Frutos, R., Sy, A., Ghesquiere, A., and Fargette, D. (2000). Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle sobemovirus in Côte d'Ivoire. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**(2), 167-178.
- Pesic-Van Esbroeck, Z., Harris, K. F., and Duffus, J. E. (1995). Immunocytochemical localization of squash leaf curl virus in squash and the sweet potato whitefly. *Phytopathology* **85**, 1180.
- Peterschmitt, M., Reynaud, B., Sommermeyer, G., and Baudin, P. (1991). Characterization of MSV isolates using monoclonal and polyclonal antibodies and by transmission to a few hosts. *Plant Dis.* **75**, 27-32.
- Polston, J. E., Al-Musa, A., Perring, T. M., and Dodds, J. A. (1990). Association of the nucleic acid of squash leaf curl geminivirus with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* **80**, 850-856.
- Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann, M., and Wittwer, C. (1998). Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica* **2**, 8-11.
- Reynaud, B. (1988). "Transmission des virus de la striure, du stripe et de la mosïque du maïs par leurs vecteurs, *Cicadulina mbila* (Naudé, 1924) et *Perigrinus maïdis* (Ashmead, 1890)(Homoptera)." *PhD. Thesis*. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Reynaud, B., and Peterschmitt, M. (1992). A study of the mode of transmission of MSV by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Appl. Biol.* **121**, 85-94.
- Rosell, R. C., Torres Jerez, I., and Brown, J. K. (1999). Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Virology* **89**(3), 239-246.
- Rubinstein, G., and Czosnek, H. (1997). Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J. Gen. Virol.* **78**, 2683-2689.
- Rybicki, E. P. (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Arch. Virol.* **139**, 49-77.

- Storey, H. H. (1932). The inheritance by an insect vector of the ability to transmit a plant virus. *Proc. Roy. Soc. B* **112**, 46-60.
- Storey, H. H. (1938). Investigation of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors II. The part played by puncture in transmission. *Proc. Roy. Soc. B* **125**, 455-477.
- Van den Heuvel, J. F. J. M., Bruyere, A., Hogenhout, S. A., Ziegler Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., Van der Wilk, F., and Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* **71**, 7258-7265.
- Van den Heuvel, J. F. J. M., Verbeek, M., and Van der Wilk, F. (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **75**, 2559-2565.
- Webb, M. D. (1987). Species recognition in *Cicadulina* leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of pathogens of Gramineae. *Bull. Entomol. Res.* **77**, 683-712.
- Zeidan, M., and Czosnek, H. (1991). Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *J. Gen. Virol.* **72**, 2607-2614.

Table 1. Study of the specificity of MSV transmission with *C. mbila*, using the non vector species *C. chinai* and viruses which are not transmitted by leafhoppers of the genus *Cicadulina*, DSV and RYMV.

			Acquisition		Maize agroinoculated with MSV-R2		DSV on <i>D. setigera</i>		Maize agroinoculated with DSV		RYMV on rice	
			Transmission		Inoculation		Maïs	<i>D. setigera</i>	Maïs	<i>D. setigera</i>	<i>D. setigera</i>	Rice
<i>Cicadulina mbila</i>	Natural*		YES	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO		
	Microinjection into the hemolymph	Crude extract of infected plant	YES (4/4)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				
		Purified virus	YES (4/4)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				
	Artificial feeding of purified virus		YES (10/10)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				
<i>Cicadulina chinai</i>	Natural*		NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO			
	Microinjection into the hemolymph	Crude extract of infected plant	YES (1/4)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				
		Purified virus	YES (2/4)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				
	Artificial feeding of purified virus		NO (0/20)	-	NO (0/4)	NO (0/4)	-	NO (0/4)				

YES: successful transmission based on symptoms

NO: no transmission according to symptoms and confirmed by ELISA tests

-: non tested.

*: natural transmission. Transmission test using 100 insects per test plant, AAP and IAP: 3 days each.

Ratio in brackets: number of plants exhibiting virus induced symptoms per number of test plants.

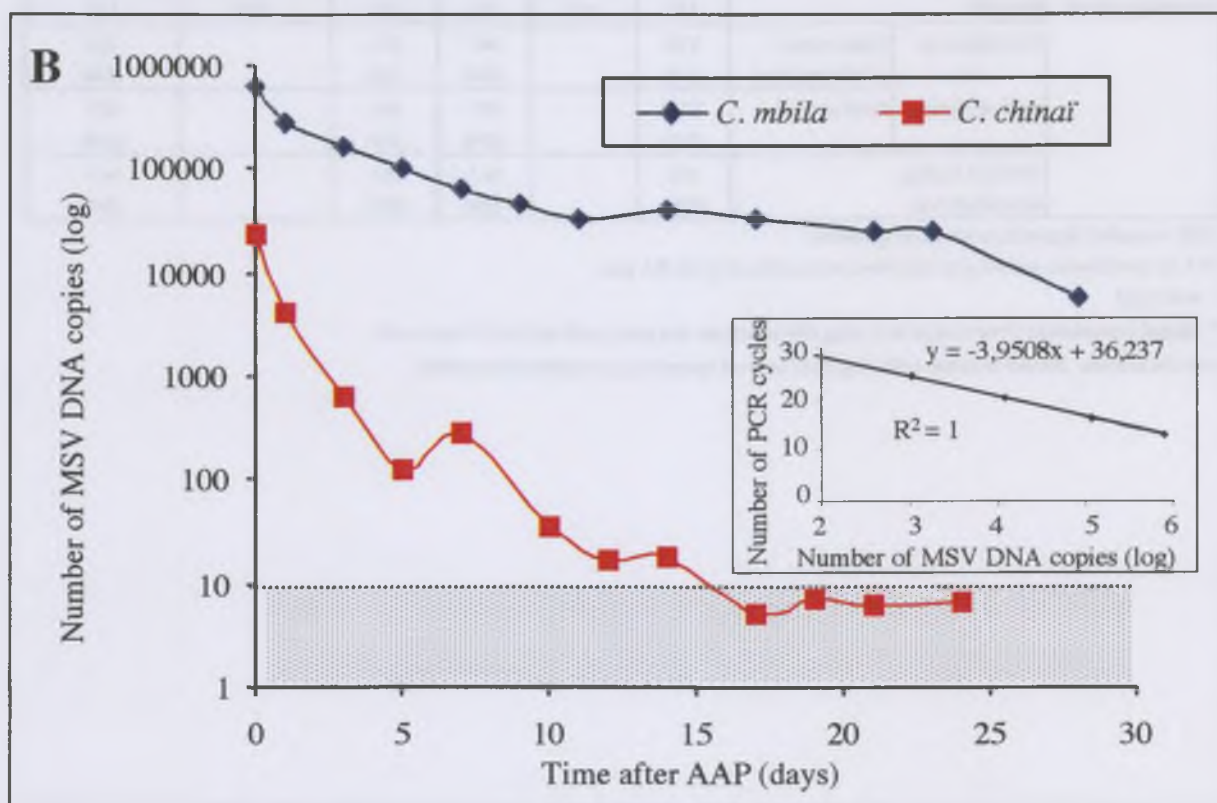
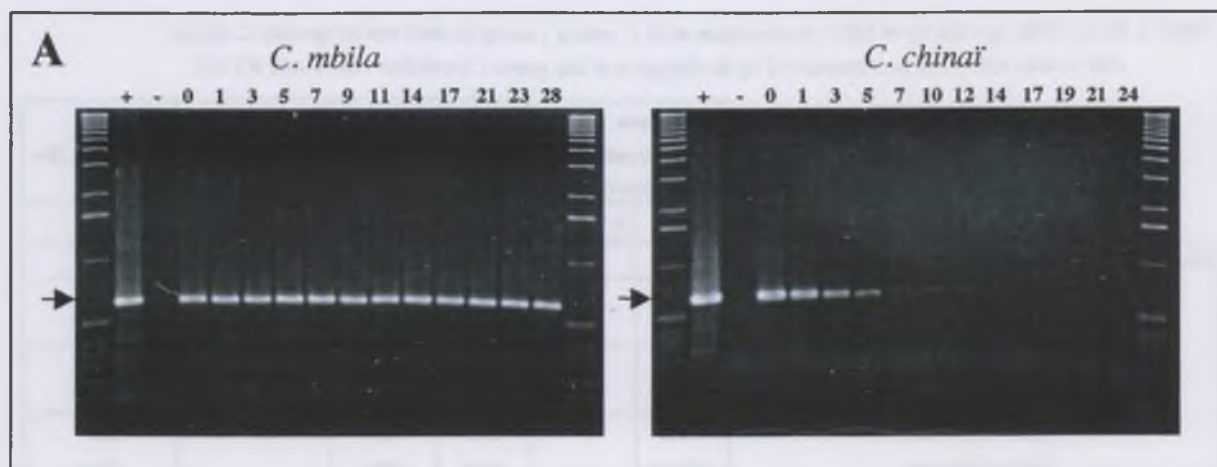


FIG. 1. Accumulation kinetics of maize streak virus (MSV) in leafhoppers of the vector species *Cicadulina mbila* and of the non-vector species *C. chinai* during a sustained feeding on MSV agroinoculated maize plants. Ten whole insects, collected and frozen at each sampling time, were simultaneously tested by PCR after the last sampling, with the MSV specific primers 1640-2233. (A) PCR products resolved on 1 % agarose gels. The arrow indicates the MSV specific amplification fragment of 632 pb. +: DNA extracted from an MSV infected maize plant (positive control). -: No DNA template (negative control). Other lanes correspond to batches of 10 insects which were given 0 to 13-day acquisition access feeding periods (AAPs). (B) Quantitative PCR detection using the same pair of primers as for A. Box: standard curve from the data given in B (the equation and fit of the line are shown).



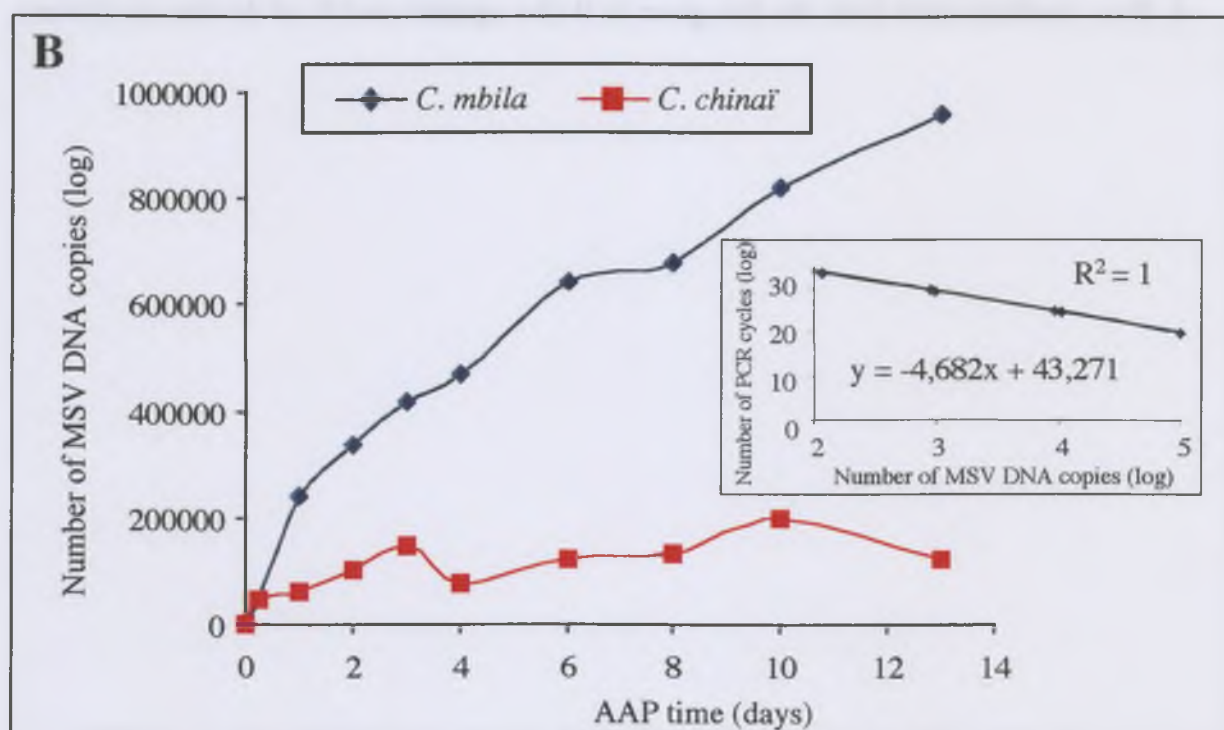
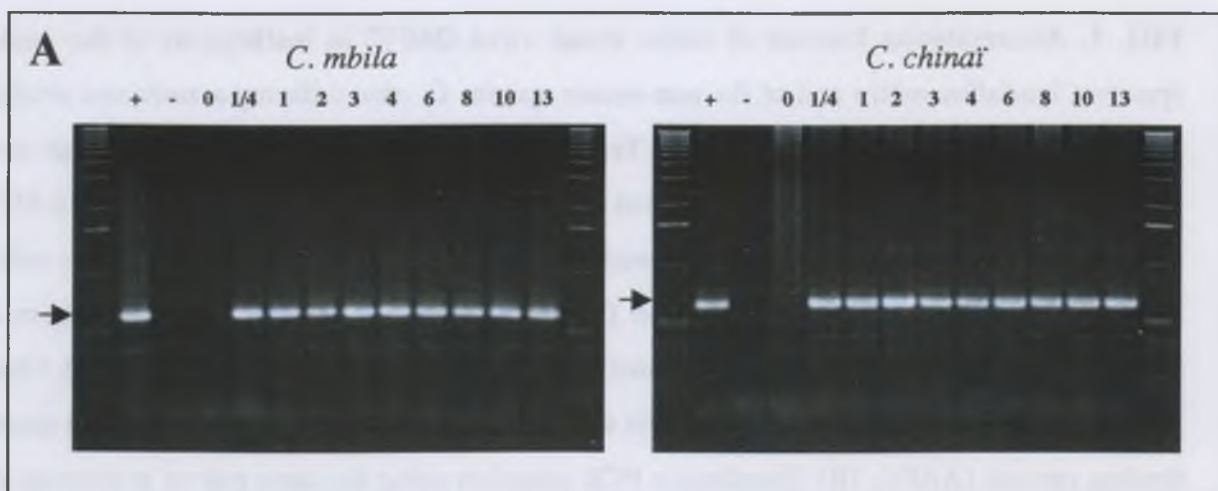
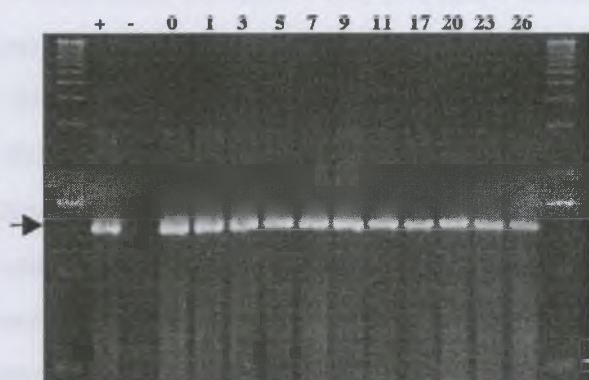


FIG. 2. Persistence kinetics of maize streak virus (MSV) in leafhoppers of the vector species *Cicadulina mbila* and of the non-vector species *C. chinai*, maintained on non-host millet plants after a 3-day acquisition access feeding period (AAP) on MSV infected maize plants. Ten whole insects, collected and frozen at each sampling time after the end of the AAP, were simultaneously tested by PCR, after the last sampling, with the MSV specific primers 1640-2233. (A) PCR products resolved on 1 % agarose gels. The arrow indicates the MSV-specific amplification fragment of 632 bp. +: DNA extracted from an MSV infected maize plant (positive control). -: No DNA template (negative control). Other lanes correspond to batches of 10 insects collected between 0 and 28 days after AAP. (B) Quantitative PCR detection using the same pair of primers as for A. The accuracy threshold are indicated by the dotted line. Box: standard curve from the data given in B (the equation and fit of the line are shown).



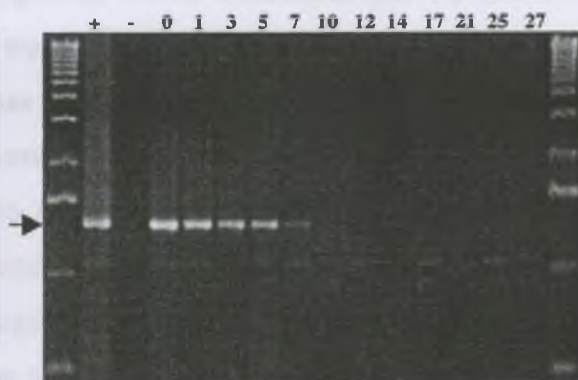
C. mbila

Guts

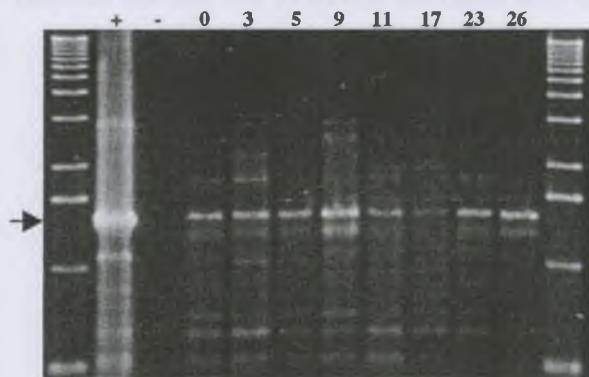


C. chinai

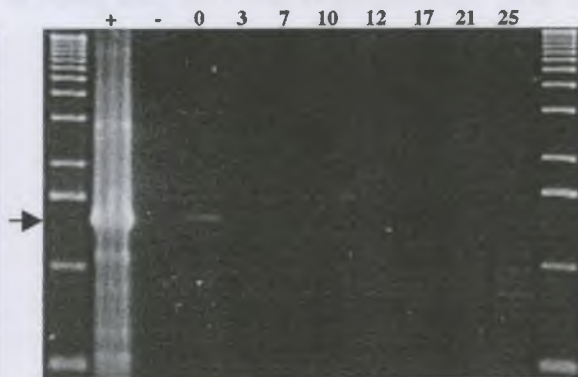
Guts



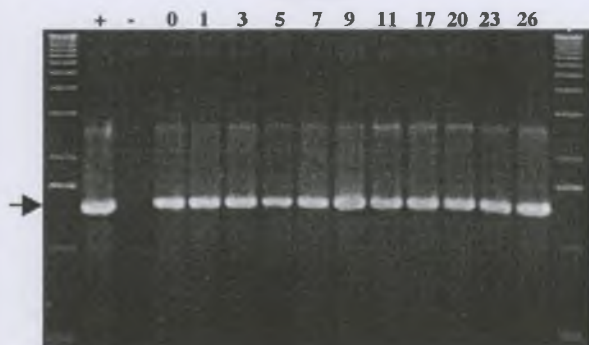
Hemolymphs



Hemolymphs



Heads



Heads

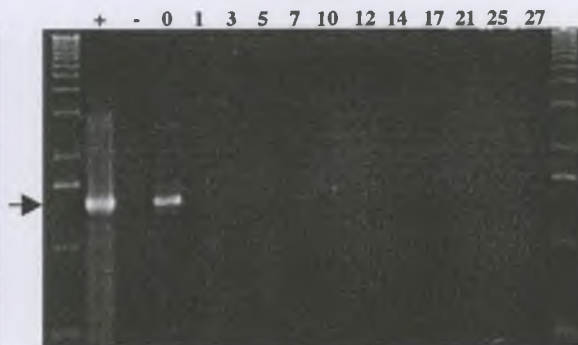
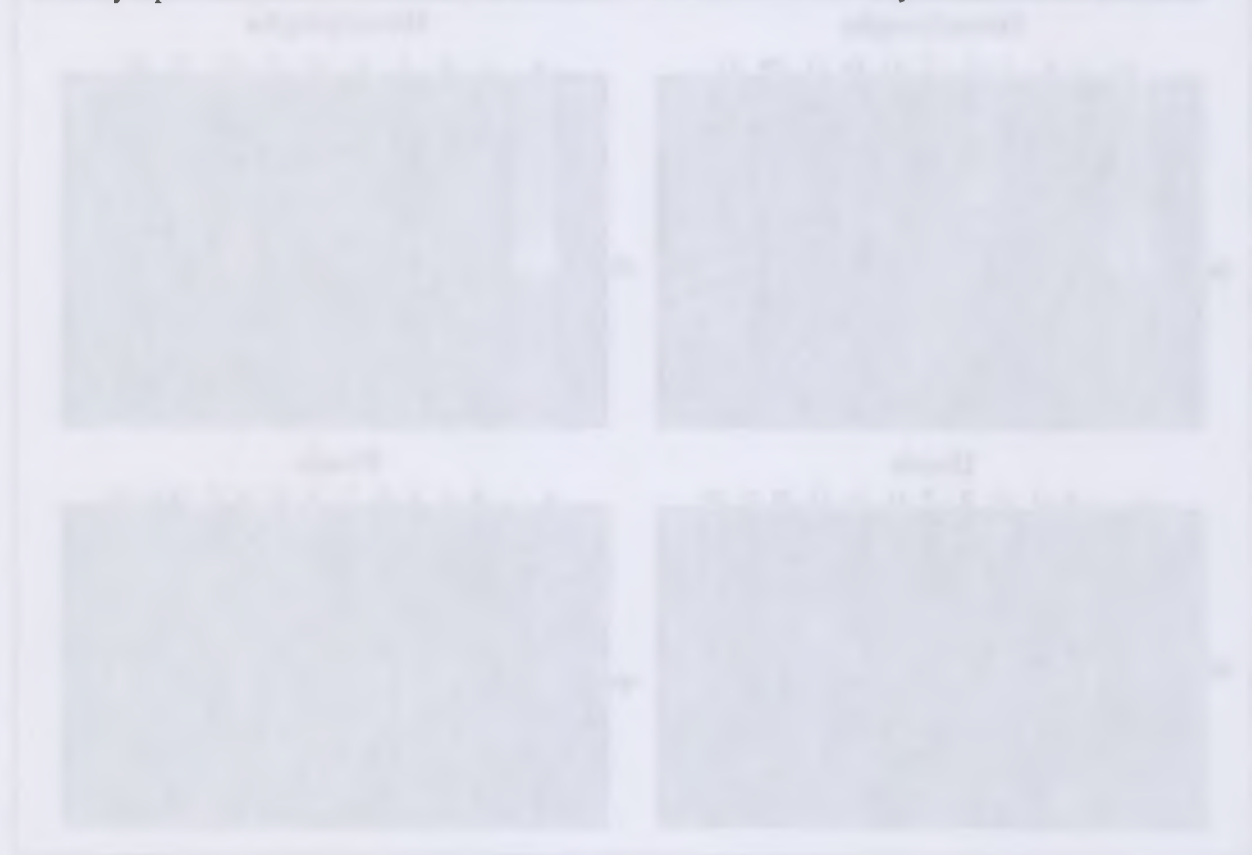
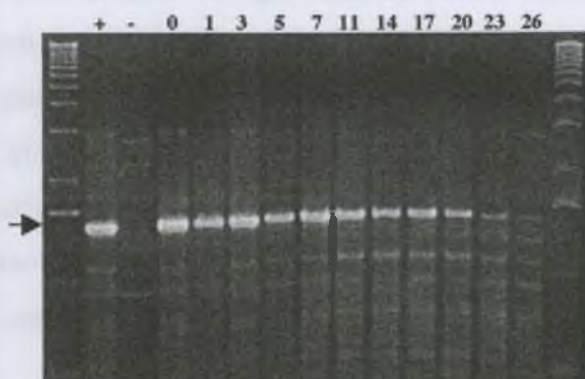


FIG. 3. Persistence kinetics of maize streak virus (MSV) in leafhoppers of the vector species *Cicadulina mbila* and of the non-vector species *C. chinai* maintained on non host millet plants following a 3-day acquisition access feeding period (AAP) on MSV agroinoculated maize plants. At each sampling time after the end of the AAP, the guts, the hemolymphs and the heads of ten insects were dissected and frozen. The frozen samples were simultaneously tested by PCR after the last sampling, with the MSV specific primers 862-Spb and 2201-942. PCR products were resolved on 1 % agarose gels. The arrow indicates the MSV specific fragment of approximately 1.4 kb. +: DNA extraction from an MSV infected maize plant (positive control). -: No DNA template (negative control). Other lanes correspond to guts, hemolymphs and heads of 10 insects collected between 0 and 27 days after AAP.

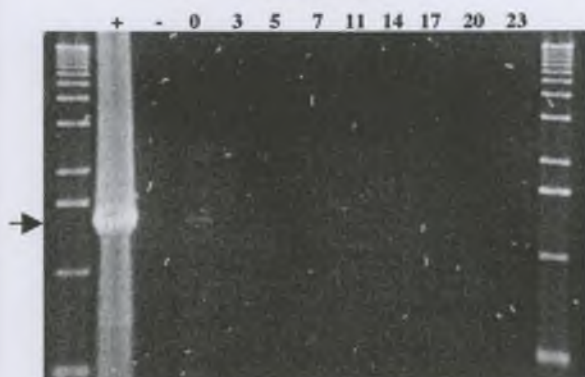


C. mbila

Guts



Hemolymphs

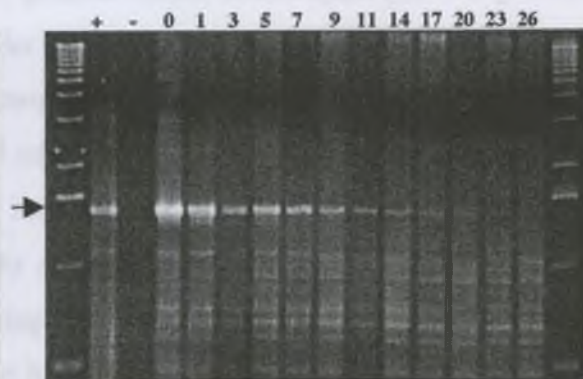


Heads

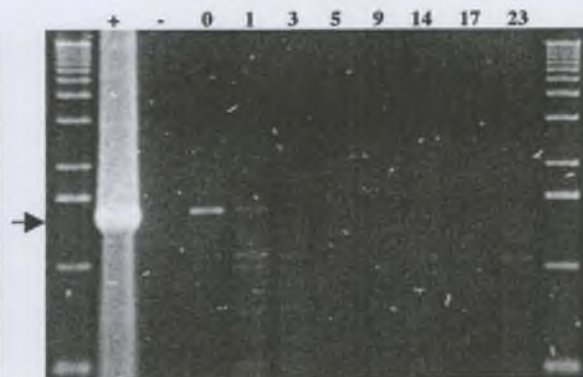


C. chinai

Guts



Hemolymphs

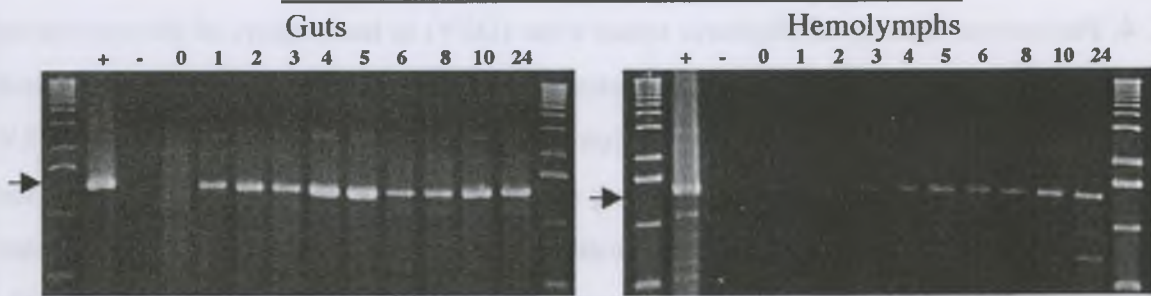


Heads



FIG. 4. Persistence kinetics of *Digitaria* streak virus (DSV) in leafhoppers of the non-vector species *Cicadulina mbila* and of the non-vector species *C. chinaï* maintained on non host millet plants following a 3-day acquisition access feeding period (AAP) on DSV agroinoculated maize plants. At each sampling time after the end of the AAP, the guts, the hemolymphs and the heads of ten insects were dissected and frozen. The frozen samples were simultaneously tested by PCR after the last sampling, with the DSV specific primers 833-2290 and 2165-924. PCR products were resolved on 1 % agarose gels. The arrow indicates the DSV specific fragment of approximately 1.4 kb. +: DNA extraction from an DSV infected *Digitaria setigera* plant (positive control). -: No DNA template (negative control). Other lanes correspond to guts, hemolymphs and heads of 10 insects collected between 0 and 26 days after AAP.

C. mbila



C. chinai

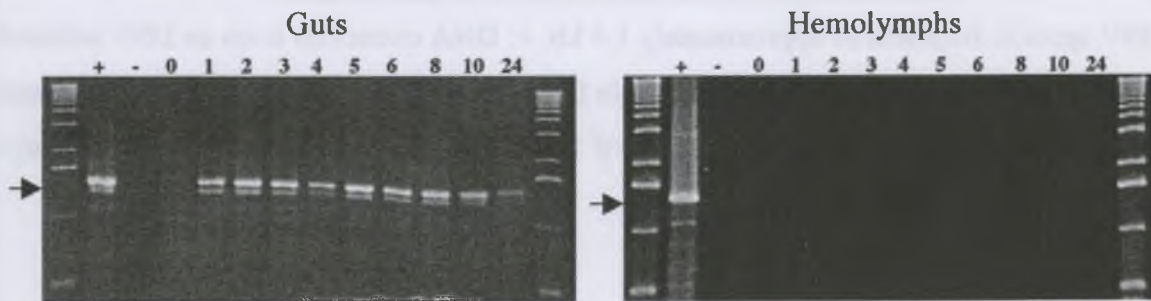
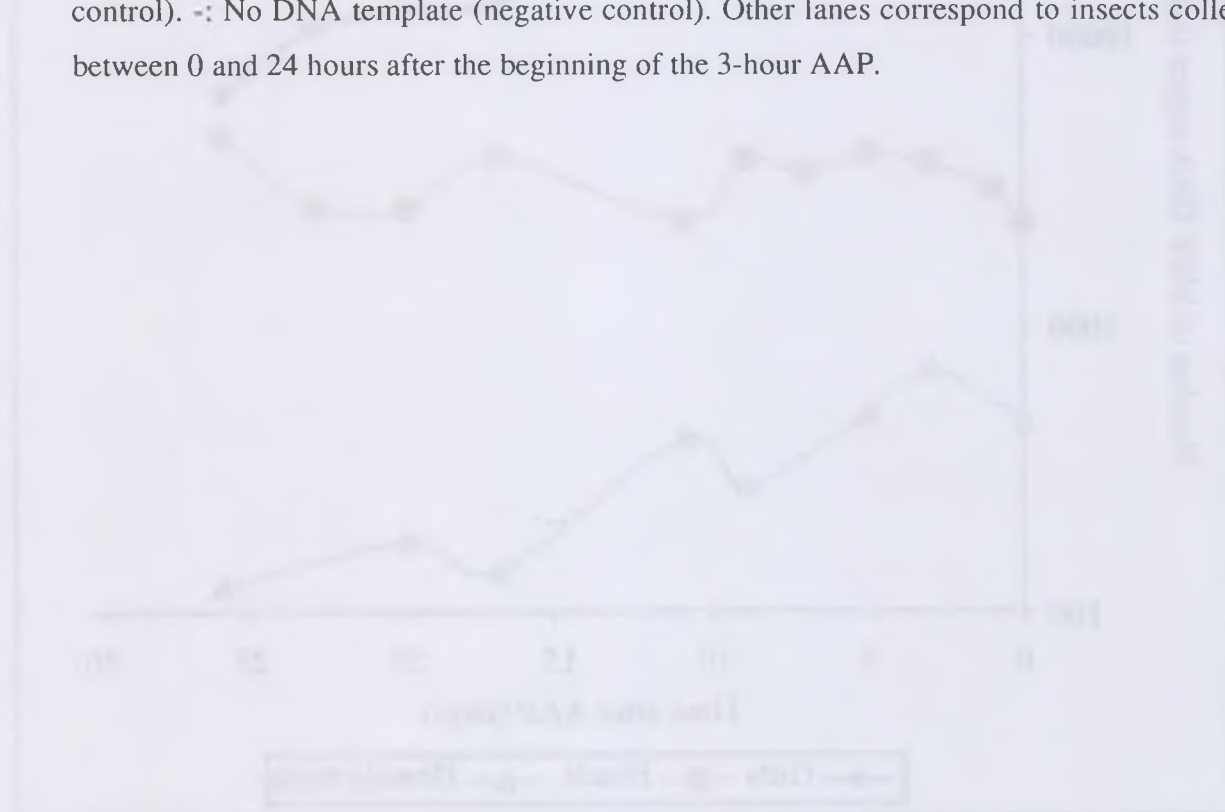


FIG. 5. MSV detection in the gut and the hemolymph of leafhoppers of the vector species *Cicadulina mbila* and the non vector species *C. chinaï* collected during a 3-h acquisition access feeding period (AAP) on MSV agroinoculated maize plants and subsequently on non host millet plants. At each sampling time, the guts and the hemolymphs of ten insects were dissected and frozen. The frozen samples were simultaneously tested by PCR after the last sampling, with the MSV specific primers 862-Spb and 2201-942. PCR products were resolved on 1 % agarose gels. The arrow indicates the specific amplification fragment of approximately 1.4 kb. +: DNA extraction from an MSV infected maize plant (positive control). -: No DNA template (negative control). Other lanes correspond to insects collected between 0 and 24 hours after the beginning of the 3-hour AAP.



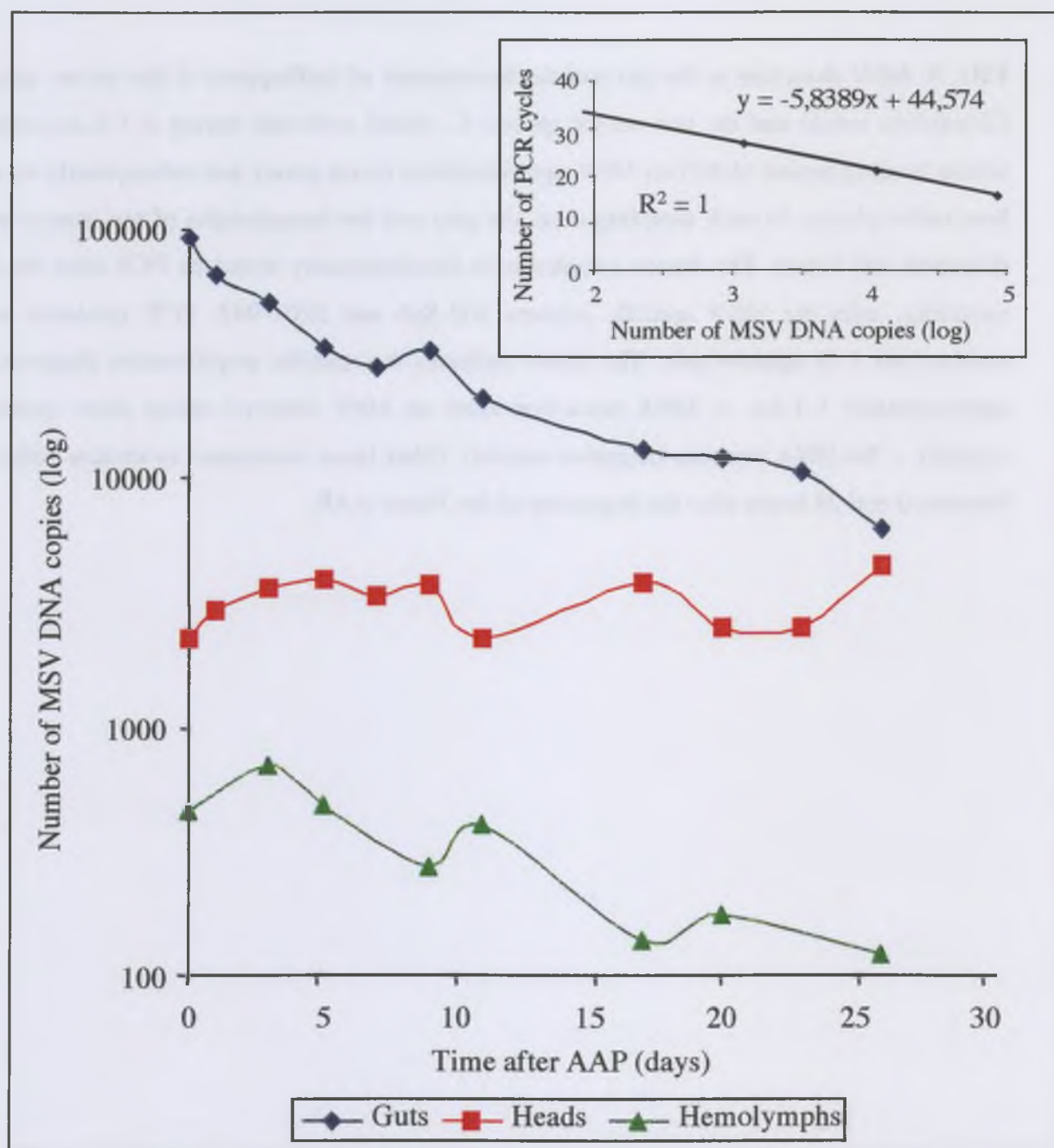


FIG. 6. Persistence kinetics of maize streak virus (MSV) in leafhoppers of the vector species *Cicadulina mbila* maintained on non host millet plants following a 3-day acquisition access feeding period (AAP) on MSV agroinoculated maize plants. At each sampling time after the end of the AAP, the guts, the hemolymphs and the heads of ten insects were dissected and frozen. The frozen samples were simultaneously tested by quantitative PCR after the last sampling, with the MSV specific primers 1640-2233. The samples tested by quantitative PCR were previously tested by conventionnal PCR (Fig. 3). Box: standard curve from the data (the equation and fit of the line are shown).

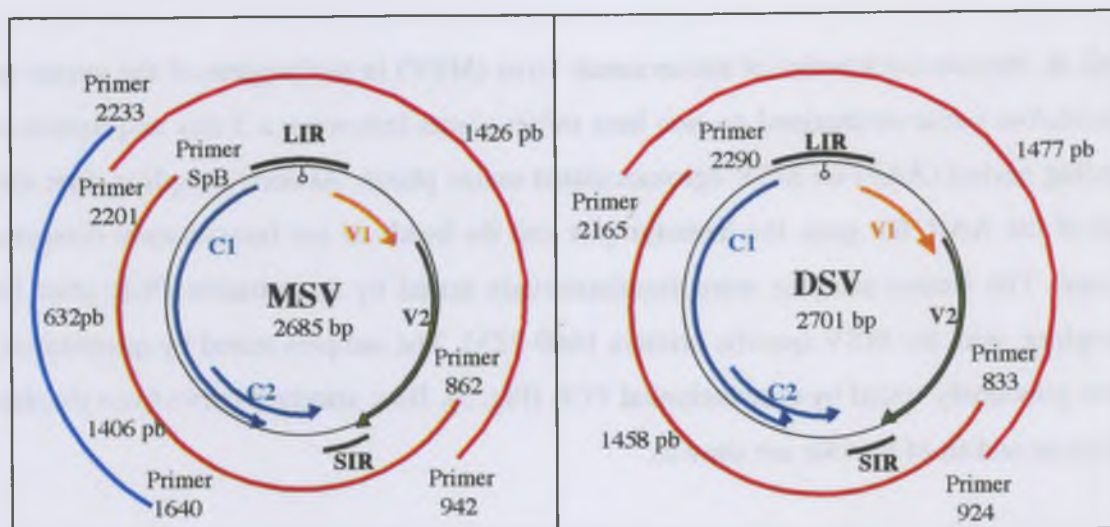


FIG. 7. Diagrammatic representation of the genome regions amplified by PCR for maize streak virus (MSV) and *Digitaria* streak virus (DSV). Two pairs of MSV specific primers (862-SpB, 2201-942) and two pairs of DSV specific primers (833-2290 and 2165-924), were designed to amplify two overlapping fragments of similar size which together span the complete genomes. A smaller fragment of 632 bp was amplified from the MSV genome in quantitative PCR with the primers 1640-2233. Arrows indicate the position of open reading frames for each genome (v1 and v2; c1 and c2) and the dark lines the position of the large and small intergenic regions (LIR, SIR).

II.3. Discussion

La sensibilité de la technique PCR permet de détecter le virus dans un insecte ou un organe unique (résultats non présentés ; Navot *et al.*, 1992 ; Rosell *et al.*, 1999). Cependant, pour minimiser les variations inter-individus et ainsi mieux dégager les tendances de la concentration virale au cours du temps, nous avons testé les cicadelles par groupe de dix individus. La dissection des insectes permet de tester séparément les compartiments impliqués dans la transmission circulante, et de localiser les barrières intervenant dans la non transmission (nos résultats ; Atzmon *et al.*, 1998 ; Rosell *et al.*, 1999). La PCR quantitative, qui ajoute à la sensibilité de la technique PCR la possibilité de quantifier le nombre de copies d'ADN viral, est particulièrement utile dans les cas où la transmission est circulante. Car, elle fournit des informations sur le flux de virus et sur les compartiments capable de l'accumuler. Cet outil semble avoir un avenir prometteur dans la compréhension de la dynamique des mécanismes de transmission des virus circulants.

L'analyse des couples non compatibles, *C. chinai*-MSV, *C. mbila*-DSV et *C. chinai*-DSV, montre que le virus est restreint à l'intestin. Ce résultat confirme que cet organe constitue une barrière physique à la transmission. Cette restriction du virus au tractus intestinal s'accompagne d'une diminution progressive de la charge virale au cours du temps. La vitesse de réduction de la quantité de virions semble dépendre de la résistance des particules aux variations des conditions chimiques et physiques du milieu.

La détection épisodique des mastrévirus dans l'hémolymphe des cicadelles non vectrices, à la fin de l'AAP, est contraire aux résultats obtenus chez les bégomovirus. En effet, l'ADN viral du SLCV n'est pas détecté dans l'hémolymphe d'une espèce d'aleurode non vectrice (Rosell *et al.*, 1999). Si ces détections ne sont pas liées à des contaminations expérimentales, elles pourraient suggérer que la paroi intestinale n'est pas totalement imperméable à des virus non transmis. L'hypothèse d'un effet dose peut être proposée.

La préservation du MSV chez *C. mbila*, en dépit de sa moindre stabilité, souligne la nécessité d'un mécanisme spécifique qui autorise la persistance du MSV et sa transmission. Il pourrait s'agir d'une internalisation des virions par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant, conformément à ce qui a été démontré pour le modèle *Luteoviridae*/puceron (Gildow, 1987,

1993). Au contraire, l'étude de quantification de l'ADN du TYLCV, par "chemiluminescent dot blot hybridization", a montré avec surprise une persistance plus longue de l'ADN viral chez l'insecte non vecteur comparativement à l'insecte vecteur (Caciagli & Bosco, 1997). La rapidité avec laquelle les géminivirus, MSV chez *C. mbila* et SLCV chez *B. tabaci* (respectivement nos résultats ; Rosell *et al.*, 1999), traversent la paroi intestinale de leurs insectes vecteurs argumente également l'existence d'un mécanisme actif de passage transmembranaire faisant intervenir un récepteur spécifique

La non transmission du DSV par *C. mbila* et *C. chinai*, même en court-circuitant la paroi intestinale, suggère l'existence d'une deuxième barrière à la transmission des géminivirus par cicadelle. Elle semble être liée au passage du virus à travers les glandes salivaires et/ou à la survie des virions dans l'hémolymph. En effet, l'intervention de protéines homologues de GroEL dans la persistance du virus dans le vecteur et dans l'efficacité de transmission des particules de *Luteoviridae* par puceron (Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997; Filichkin *et al.*, 1997) et de TYLCV par *B. tabaci* (Morin *et al.*, 1999), a été montrée depuis peu (Voir Article N°1). Par conséquent, l'hypothèse de l'implication des protéines homologues de GroEL dans la transmission circulante est à tester pour les géminivirus transmis par cicadelle. Cependant, l'existence d'une préservation des virus de la famille *Luteoviridae* par les homologues de GroEL a été montrée chez les pucerons vecteurs et non vecteurs (Van den Heuvel *et al.*, 1994). Par conséquent, la survie des *Mastrevirus* dans l'hémolymph des cicadelles n'est vraisemblablement pas le facteur déterminant de la spécificité de transmission par *Cicadulina spp.*

La non transmission du DSV et du RYMV par *Cicadulina spp.*, dans nos différentes conditions expérimentales, suggère que les glandes salivaires des cicadelles ne fonctionnent pas comme un simple organe excrétoire qui permettrait à tout virus pénétrant dans l'hémolymph, et capable d'y survivre, de pouvoir être relargué dans un nouvel hôte par l'intermédiaire de la salive.

L'ensemble de nos résultats et interprétations nous a amené à proposer un modèle dynamique de la transmission circulante non multipliante des géminivirus par cicadelle, schématisé sur la figure 14.

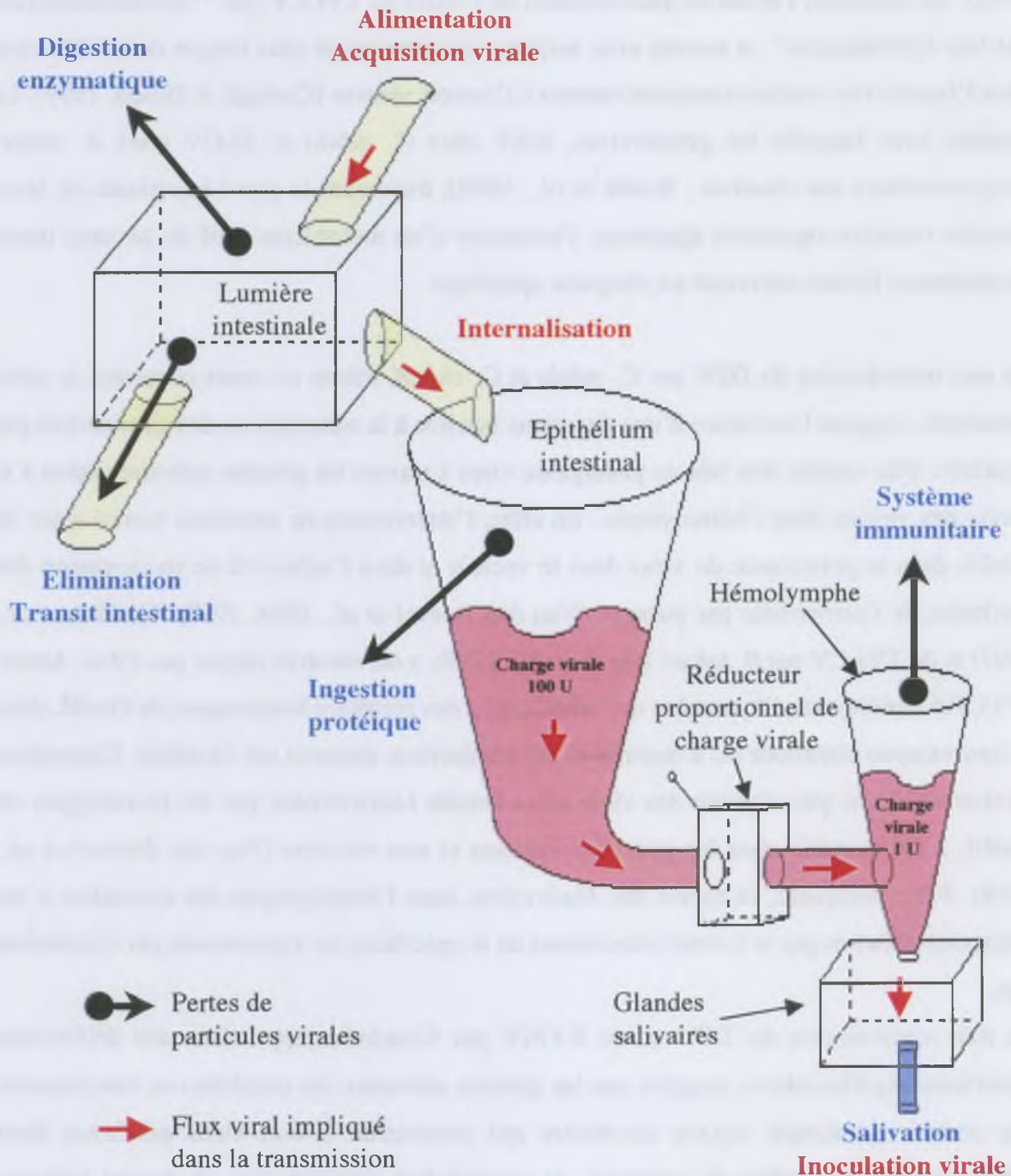


Figure 14. Représentation schématique d'un modèle dynamique de flux de particules de MSV à travers son insecte vecteur *C. mbila*. Les particules virales acquises à la suite d'une alimentation infectieuse sont transportées par le bol alimentaire dans la lumière intestinale où la charge virale est limitée à un seuil maximal. Ce seuil est le résultat d'un équilibre entre l'acquisition de nouvelles particules, l'élimination par le transit intestinal et la dégradation par les phénomènes de digestion enzymatique et d'ingestion protéique. Une quantité non limitée de virions est internalisée, stockée et préservée par les cellules de l'épithélium intestinal grâce à un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant. Par transcytose, une charge virale proportionnelle à celle présente dans le tractus intestinal est libérée dans l'hémolymphe : 1 unité de virions (U) dans l'hémolymphe pour 100 U dans l'intestin. Les particules, qui échappent au système immunitaire, vont alimenter les glandes salivaires où la charge virale est maintenue et limitée à un seuil maximal. Les pertes de particules virales liées à la salivation, vont intervenir dans l'inoculation de nouvelles plantes.

L'augmentation graduelle de la charge virale détectée chez *C. mbila*, lors d'une alimentation continue sur plante infectée, confirme que l'insecte vecteur a la capacité d'emmagasiner une quantité très importante de particules de MSV. Cette quantité ne semble pas être limitée à un seuil, comme cela a été suggéré pour le TYLCV et le SLCV dans leur insecte vecteur *B. tabaci* (respectivement Polston *et al.*, 1990 ; Zeidan & Czosnek, 1991). Par contre, chez l'insecte non vecteur *C. chinaii*, cette quantité est limitée à un seuil maximal, qui semble correspondre à la part de particules présente dans la lumière du tractus intestinal (Figure 14). Ce seuil pourrait coïncider à un équilibre entre l'acquisition de nouvelles particules et l'élimination d'autres par les phénomènes d'ingestion nucléoprotéique, de digestion enzymatique et de transit intestinal. L'élimination rapide de la charge virale chez *C. chinaii*, dix jours après la fin de l'AAP, suggère que les particules ne sont pas internalisées et préservées dans les cellules de l'épithélium intestinal, contrairement à ce qui semble être le cas chez *C. mbila*. De façon surprenante, l'ADN viral du SLCV a été détecté en quantité plus importante chez l'aleurode non vecteur *Trialeurodes vaporariorum* que chez *B. tabaci*, sans seuil maximal de détection (Polston *et al.*, 1990). Nos résultats suggèrent que la différence de charge virale observée entre *C. mbila* et *C. chinaii* semble représenter la part de particules internalisées et stockées dans les cellules épithéliales du tractus intestinal et des glandes salivaires, et dans l'hémolymph, comme cela a été proposé pour le modèle *Luteoviridae*/puceron (Références voir Article N°3).

La persistance du virus dans les trois compartiments de l'insecte, dans le cas du couple compatible MSV/*C. mbila*, est cohérente avec la capacité de *C. mbila* à rester infectieux, durant toute sa durée de vie (30 à 40 jours ; Storey, 1933). L'accumulation en trois jours d'une charge virale chez *C. mbila* 26 fois supérieure à celle chez *C. chinaii*, est le résultat d'un stockage et d'une préservation différentielle des particules et/ou d'une différence de comportement alimentaire (Article N°3 Figure 3). L'accumulation similaire du MSV pendant les premières heures d'AAP de *C. mbila* et de *C. chinaii*, suggère que le comportement alimentaire n'est pas le facteur qui intervient majoritairement dans la distinction entre une espèce vectrice et une espèce non vectrice du genre *Cicadulina* (Article N°3 Figure 2). Cependant, cette hypothèse reste à confirmer par une étude comparative du comportement alimentaire en EPG.

La détection du virus dans l'hémolymph, suite à une AAP de trois heures, a permis de mettre en évidence la rapidité et le flux de passage du MSV à travers la paroi intestinale de l'insecte

vecteur (Article N°3 Figure 6). La diminution progressive de la charge virale dans l'intestin et dans l'hémolymph, et la persistance d'une charge virale dans les glandes salivaires suggèrent que ce flux de virus se prolonge dans le temps au profit des glandes salivaires via l'hémolymph (Figure 14 ; Article N°3 Figure 7).

Cette stabilité de la charge virale au niveau des glandes salivaires (environ 3000 copies d'ADN viraux) est compatible avec la persistance de la capacité de transmission de *C. mbila* pendant toute sa durée de vie. Elle suggère que la quantité de virions présent dans ce compartiment est limitée à un seuil maximal. Les pertes de particules par salivation et probablement par dégradation sont remplacées par des particules virales provenant de l'hémolymph.

L'allure équivalente des courbes correspondant à la charge virale présente dans l'intestin et dans l'hémolymph, suggère que la quantité de virions présent dans l'hémolymph est directement dépendante de celle préservée dans le tractus intestinal (Article N°3 Figure 7). Cependant, les charges virales des deux compartiments ne sont pas équivalentes. Pour 100 unités d'ADN viraux détectées dans l'intestin, on en quantifie une dans l'hémolymph (Figure 14). L'hypothèse d'une simple relation de type « vases communicants » ne peut expliquer ce phénomène. Seul un mécanisme de transfert proportionnel de la charge virale vers l'hémolymph, en fonction de celle présente dans le tractus intestinal, peut être invoqué.

L'hypothèse des vases communicants peut être évoquée, si cette différence est uniquement liée à un biais expérimental. Notre protocole de récupération de l'hémolymph permet de supposer que la majorité des particules virales présent à l'état libre dans l'hémolymph a été récoltée. Par contre, cette charge virale ne prend pas en compte les particules qui se seraient adsorbées ou fixées, pour des raisons inconnues, sur les membranes cellulaires ou les lamelles basales des organes internes non prises en compte dans la quantification. Par conséquent, notre quantification relative de la charge virale dans l'hémolymph concerne uniquement le flux hypothétique de particules entre l'intestin et les glandes salivaires. Malgré ce biais possible dans la quantification, l'hémolymph, où la charge virale détectée est la plus faible, ne semble pas jouer le rôle de compartiment de stockage privilégié des virions, mais plutôt celui d'un compartiment de transit. Cette observation est contraire à ce qui a été suggéré pour la transmission circulante non multipliante des *Luteoviridae* et des *Nanovirus* par pucerons, où l'hémolymph est supposée être le lieu de stockage principal des particules virales (respectivement Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997 ; Franz *et al.*, 1998). La persistance d'une

importante charge virale dans le tractus intestinal et les glandes salivaires, suggère que ces deux compartiments représentent vraisemblablement les principaux lieux de stockage et de préservation des particules de MSV dans l'insecte vecteur. Une détection quantitative de la charge virale dans les trois compartiments des insectes vecteurs, maintenus en alimentation continue sur des plantes virosées, devrait permettre de valider notre modèle.

Discussion Générale et Perspectives



Cicadelles en alimentation sur une feuille de maïs présentant des symptômes de striure.

Discussion Générale et Perspectives

Les stratégies de transmission des phytovirus sont multiples, et l'efficacité avec laquelle ils sont propagés représente un paramètre important des épidémies. C'est pourquoi, la lutte contre les phytovirus transmis par des insectes de type piqueur suceur ne se limite pas uniquement à la lutte contre le pathogène mais porte également, si possible, sur le vecteur. Dans la sélection de variétés résistantes à une virose, il est préférable de ne pas uniquement cibler des résistances au virus *sensu stricto* mais également de rechercher des résistances au(x) vecteur(s). En l'absence de sources de résistance, et en dehors de la lutte chimique contre le vecteur, de nouvelles stratégies de lutte mériteraient d'être développées sur la base d'une meilleure connaissance des interactions virus-vecteur-plante.

Les virus de la famille des *Geminiviridae* représentent le deuxième groupe viral en nombres d'espèces et en importance économique. Notre étude de la transmission circulante non multipliante du MSV par *C. mbila* s'inscrit pleinement dans la recherche de stratégies de lutte contre les épidémies à géminivirus. L'épidémiologie d'un virus de plante transmis par insecte piqueur suceur dépend de nombreux paramètres, dont le comportement alimentaire du vecteur intervenant dans l'efficacité de l'acquisition et de l'inoculation du virus, et la persistance et la dynamique du virus lors de son cycle à travers le vecteur.

Acquisition et inoculation virale

Le comportement alimentaire des insectes piqueur suceurs est un facteur déterminant dans l'efficacité de la transmission des virus. Le développement de la technique EPG a permis de décomposer en plusieurs phases l'alimentation des pucerons et de les corrélérer à des activités biologiques de l'insecte et à l'acquisition et l'inoculation des virus non circulants non persistants. L'étude en EPG-DC du comportement alimentaire de *C. mbila* sur maïs, vecteur du MSV, nous a octroyé la possibilité de distinguer cinq types de signaux, de les caractériser par une analyse statistique portant sur leurs médianes et leurs durées, et par une analyse spectrale basée sur leurs fréquences majeures. La corrélation entre les signaux EPG et l'étude en MET du trajet tissulaire et intracellulaire des stylets de l'insecte dans le limbe foliaire, permet d'associer les cinq signaux à des activités alimentaires caractéristiques de *C. mbila*. L'identification de paramètres physiques quantitatifs, permettant de différencier les cinq types de signaux, offre à présent l'opportunité d'utiliser l'EPG en sélection variétale pour la

résistance au vecteur et à la transmission virale. A cet égard, nous avons montré que le signal de classe 2 est un signal critique pour la transmission, car l'ingestion active de contenu cellulaire non phloémien permet vraisemblablement l'acquisition des géminivirus accumulés dans le noyau.

La progression intracellulaire des stylets des cicadelles, dans les cellules de l'épiderme, du mésophylle et de la gaine périvasculaire qui sont remplies de salive visqueuse et/ou vidées de leur contenu cellulaire, provoque une désorganisation et une mort cellulaire. En revanche, les pucerons et les aleurodes, principaux groupes de vecteurs de virus circulants non multipliants, présentent un trajet extracellulaire intramural des stylets. Ils se contentent de réaliser de brèves ponctions cellulaires qui n'entraînent pas de désorganisation ou de mort cellulaire (Powell *et al.*, 1995). Pendant ces ponctions cellulaires, les ingestions de contenu cellulaire sont limitées chez les pucerons (Powell *et al.*, 1995) et semblent même absentes chez les aleurodes (Johnson & Walker, 1999). Dans ces conditions, des virus cloisonnés dans le noyau des cellules non vasculaires ne seraient vraisemblablement pas absorbés. Cette distinction dans le comportement alimentaire, entre ces trois groupes de vecteurs de virus circulants, joue très certainement un rôle majeur dans leur efficacité relative à acquérir le virus : quelques secondes pour le couple *C. mbila*/MSV (Reynaud, 1988), 15 à 30 min pour les couples *B. tabaci*/TYLCV (Cohen & Antignus, 1994) et *Aphis craccivora*/*Faba bean necrotic yellows nanovirus* (Franz *et al.*, 1998).

L'acquisition d'un virus circulant par de brèves ponctions cellulaires ou des alimentations cellulaires, pendant la phase de pénétration des stylets dans le limbe foliaire, nécessite une distribution tissulaire du virus qui ne soit pas limitée aux tissus vasculaires. Ceci semble être le cas pour la plupart des mastrovirus (Voir Discussion en français Article N°2). Par contre, les bégomovirus sont majoritairement considérés comme des virus limités au phloème (Horns & Jeske, 1991), même si quelques bégomovirus dont le TGMV et le BDMV ont été détectés dans la plupart des types tissulaires de la plante hôte. La différence d'AAP minimale entre les cicadelles et les aleurodes est compatible à la fois avec l'absence ou la rareté des ingestions faites par les aleurodes dans des cellules non phloémiennes et avec la restriction des bégomovirus majoritairement aux tissus phloémiens. En outre, le temps moyen de 16 min pour atteindre le phloème (Walker & Perring, 1994) est conciliable avec le temps minimal d'AAP des aleurodes pour les bégomovirus : 15 à 30 min. Par conséquent, la capacité d'acquisition rapide du MSV par cicadelle est liée à la fois à la répartition tissulaire du virus

dans la plante et aux fréquentes et vigoureuses ingestions non phloémiennes du vecteur. Celles-ci paraissent suffisamment importantes pour désorganiser la cellule, déchirer le noyau et libérer les particules dans le cytoplasme. Cette observation est compatible avec ce qui avait été suggéré pour le CSMV transmis par la cicadelle *Nesoclutha (obscura) pallida* ; l'acquisition virale semble principalement associée à l'alimentation dans le mésophylle (Grylls, 1963 d'après Pinner *et al.*, 1993).

Notre étude montre que le temps minimum pour accéder au phloème est équivalent au temps minimum d'IAP, en moyenne une dizaine de minutes pour le couple MSV/*C. mbila*. De plus, tout virus hypothétiquement relargué dans une cellule non phloémienne, lors de la progression des stylets dans le limbe foliaire, sera confronté à une terre brûlée où la réplication virale semble impossible. En effet, les cellules rencontrées par les stylets sont, soit vidées de leur contenu cellulaire, soit perforées et injectées de salive visqueuse. En outre, les travaux de Kimmins et Bosque-Perez (1996) ont corrélé l'inoculation du MSV par *C. storeyi* avec la première phase d'activité alimentaire dans le phloème. Par conséquent, l'ensemble de ces données suggère que la phase d'inoculation d'un mastrovirus est intimement liée à la phase de salivation dans le phloème.

Les phytovirus circulants et non circulants semi-persistants sont connus pour être principalement localisés dans le phloème (Voir Article N°1). Cette répartition tissulaire du virus semble particulièrement bien adaptée au comportement alimentaire de leurs vecteurs qui sont majoritairement phloémophages.

L'utilisation de l'EPG-DC a permis de fractionner la phase d'alimentation de *C. mbila* en cinq phases et de les corréler à la fois à des activités biologiques de l'insecte impliquées dans la transmission des virus circulants et à des paramètres quantitatifs utilisables en sélection variétale. L'ensemble de ces données met en évidence l'influence du comportement alimentaire de l'insecte vecteur sur l'efficacité de la transmission des géminivirus.

Persistance et dynamique du virus dans son vecteur

La sensibilité de la technique PCR, cumulée à la possibilité de quantifier le nombre de copies d'ADN viral par PCR quantitative, nous a permis d'étudier (1) l'acquisition et la persistance virale, (2) la colonisation des différents compartiments de l'insecte impliquée dans la

transmission circulante et (3) la cinétique des charges virales et les flux de particules entre les compartiments.

Les barrières à la transmission circulante

L'utilisation de couples mastrévirus/espèces de cicadelles du genre *Cicadulina* compatibles et incompatibles pour la transmission, nous a permis de montrer que la paroi intestinale représente une barrière physique à la transmission circulante non multipliante des géminivirus par cicadelle. De plus, elle semble être l'unique barrière à la transmission du MSV par le genre *Cicadulina*. Ainsi, dans le cas d'un mastrévirus non transmis par une espèce de cicadelle du genre *Cicadulina*, le virus est restreint au tractus intestinal. En l'absence d'acquisition de nouvelles particules virales, la charge virale diminue plus ou moins vite selon la sensibilité des virions aux variations des conditions physiques et chimiques. Cette diminution est très certainement liée à la digestion enzymatique, dans la lumière intestinale et dans les cellules épithéliales, et au transit intestinal. Apparemment, il n'y a pas de stockage et de préservation des virions. Dans le cas du couple compatible MSV/*C. mbila*, le virus est présent, persiste et s'accumule dans les trois compartiments impliqués dans la transmission circulante : le tractus intestinal, l'hémolymphe et les glandes salivaires. La préservation virale et la rapidité de passage du virus à travers la paroi intestinale suggèrent l'intervention d'un mécanisme d'internalisation faisant intervenir un récepteur spécifique. En conclusion, à l'inverse de la spécificité de transmission du modèle *Luteoviridae*/puceron où la paroi intestinale ne représente pas une barrière majeure à l'acquisition virale (Gildow, 1993), les géminivirus transmis par cicadelles semblent incapables de traverser la paroi intestinale des insectes non vecteurs. Des travaux antérieurs sur les aleurodes vectrices des bégomovirus avaient abouti à la même conclusion (Rosell *et al.*, 1999). L'existence de cette barrière intestinale spécifique accentue les divergences déjà observées, entre le modèle Geminiviridae/cicadelle et aleurode et le modèle *Luteoviridae*/puceron, et rend les transpositions entre les modèles d'autant plus difficiles (Articles N°1 et N°3).

La non transmission du DSV par le genre *Cicadulina*, même en court-circuitant la paroi intestinale et malgré une ressemblance génétique importante pour le MSV, suggère l'existence d'une deuxième barrière à la transmission des géminivirus par cicadelle. Elle semble être déterminée par le passage à travers les glandes salivaires et/ou la survie dans l'hémolymphe. En effet, l'intervention de protéines homologues de GroEL dans la persistance

virale dans l'hémolymphe a été montrée pour les *Luteoviridae* transmis par puceron (Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997) et pour le TYLCV transmis par *B. tabaci* (Morin *et al.*, 1999).

Persistence : stockage et préservation

L'augmentation graduelle de la quantité d'ADN viral détectée chez *C. mbila*, lors d'une alimentation continue sur une plante infectée par le MSV, confirme les résultats antérieurs sur la capacité d'emmagasiner une quantité très importante de protéines de capsid (Reynaud & Peterschmitt, 1992). Par contre, chez l'insecte non vecteur du genre *Cicadulina*, cette quantité est limitée à un seuil maximal qui semble correspondre à un équilibre entre l'acquisition et l'élimination des particules virales. La différence d'accumulation virale observée entre cicadelles vectrices et non vectrices semble représenter la part de particules virales internalisée et stockée dans les cellules épithéliales du tractus intestinal et des glandes salivaires et dans l'hémolymphe, de façon similaire au modèle *Luteoviridae*/puceron (Gildow, 1987 ; Gildow & Gray, 1993). Cette hypothèse est renforcée par le fait, que l'accumulation virale identique entre *C. mbila* et *C. chinai*, pendant les premières heures d'AAP, révèle que le comportement alimentaire ne semble pas être le facteur qui intervient majoritairement dans la distinction entre une espèce vectrice et non vectrice du genre *Cicadulina*. Néanmoins, cette dernière hypothèse reste à vérifier en EPG.

La persistance du MSV dans les trois compartiments de *C. mbila* est compatible avec sa capacité à rester infectieux durant toute sa durée de vie. Cependant, la persistance d'une forte charge virale dans le tractus intestinal et dans les glandes salivaires de *C. mbila* montre que ces organes représentent vraisemblablement le lieu de stockage principal des particules virales dans l'insecte. L'hémolymphe semble jouer le rôle de compartiment de transit et d'échange entre l'intestin et les glandes salivaires, et non pas celui d'un lieu de stockage privilégié des virions. Cette observation est contraire au « dogme » qui considère que l'hémolymphe est le principal compartiment réservoir des virus circulants non multipliants. Cette hypothèse, qui à notre connaissance n'a jamais été démontrée par des tests quantitatifs, est basée sur les travaux concernant le modèle *Luteoviridae*/puceron (Van den Heuvel *et al.*, 1994, 1997). Par transposition, elle a été proposée pour les géminivirus et les nanovirus transmis selon le même mode (Franz *et al.*, 1998). La quantification du nombre de particules virales dans les trois compartiments impliqués dans la transmission circulante, lors d'une AAP continue sur plante virosée, devrait pouvoir confirmer notre hypothèse.

La possibilité de pouvoir détecter la progression virale et les flux de particules à travers les trois compartiments impliqués dans la transmission circulante non multipliante, nous a permis de proposer un modèle dynamique de transmission d'un géminivirus par cicadelle (Figure 14). Nos résultats suggèrent un flux polarisé de particules virales, qui va de l'intestin vers les glandes salivaires via l'hémolymphe. La quantité de virions présente dans l'hémolymphe semble dépendante de celle internalisée et préservée dans le tractus intestinal. Dans ces deux compartiments, la charge virale ne semble pas limitée à un seuil. Par contre, au niveau des glandes salivaires où le nombre de particules quantifié est plus ou moins stable, elle paraît restreinte à un niveau maximal. Cette dernière hypothèse a également été proposée, mais sans démonstration, pour les géminivirus transmis par aleurodes (Caciagli *et al.*, 1995).

Les données concernant la persistance virale sur insecte entier montrent une diminution progressive de la charge virale, qui suggère une absence de multiplication virale dans l'insecte. Cependant, la persistance à vie de la capacité de transmission du MSV par *C. mbila*, et la persistance d'une charge virale dans les glandes salivaires contrairement aux compartiments du tractus intestinal et de l'hémolymphe, laissent planer un doute. En effet, ne pourrait on pas imaginer une multiplication du MSV dans les glandes salivaires, qui compenserait les pertes liées à la dégradation et à l'évacuation des particules par la salive.

Perspectives de travail à court terme sur la base de résultats préliminaires

Les cicadelles possèdent deux types de procaryotes endosymbiotiques, les bactéries de types 'a' et 't' (Louis & Nicolas, 1976a ; Louis *et al.*, 1976b ; Douglas, 1988). Nos essais de traitement des cicadelles aux antibiotiques (Annexe 1), pour tester l'intervention de ces bactéries dans la transmission du MSV, ont donné des résultats comparables à ceux obtenus pour la transmission du TYLCV par *B. tabaci* (Morin *et al.*, 1999). En effet, aucune diminution significative de la capacité de transmission n'a été constatée, contrairement à ce qui a été décrit pour la transmission des *Luteoviridae* par pucerons (Van den Heuvel *et al.*, 1994). D'autre part, nos premiers essais d'accrochage des particules de MSV purifié sur les protéines totales de broyat de cicadelles entières, analysées par électrophorèse (Annexe 2 ; Van den Heuvel *et al.*, 1994 ; Kikkert *et al.*, 1998), montrent la présence de bandes majoritaires aux alentours de 63 kDa. Or, ces bandes ont une taille équivalente à celles obtenues pour les homologues de GroEL (Van den Heuvel *et al.*, 1994). Par conséquent, ce

résultat suggère l'intervention possible des bactéries endosymbiotiques de types 'a' et 't' des cicadelles, dans la transmission des mastrévirus, et plus précisément dans la préservation des particules dans l'hémolymphe, comme cela a été montré pour la transmission circulante non multipliante des *Luteoviridae* par puceron et du TYLCV par *B. tabaci*. Cependant, la similarité des profils électrophorétiques obtenue pour le MSV, le DSV et le RYMV, suggère que si ces protéines interviennent dans la conservation des particules virales dans l'hémolymphe, elles ne semblent pas participer à la spécificité de transmission des mastrévirus par *Cicadulina spp.* L'utilisation des anticorps anti-GroEL (Van den Heuvel *et al.*, 1994) devrait nous permettre (1) de vérifier que les protéines d'environ 63 kDa identifiées dans l'interaction MSV/*C. mbila* correspondent à des protéines homologues de GroEL, comme cela a été montré pour le modèle TYLCV/*B. tabaci* (Morin *et al.*, 1999), (2) de tester l'intervention des protéines homologues de GroEL dans la persistance et l'efficacité de transmission du MSV par les cicadelles du genre *Cicadulina* et (3) de comparer la spécificité d'interaction virus/GroEL pour des combinaisons homologues et hétérologues, associant virus transmis ou non transmis et les homologues de GroEL de cicadelles vectrices ou non vectrices du genre *Cicadulina*.

Notre étude EPG-MET a permis de dissocier le comportement alimentaire de *C. mbila* en cinq types de signaux, caractérisés par des paramètres physiques discriminants et par des activités et des localisations alimentaires spécifiques. Elle offre à présent l'opportunité de réaliser une corrélation définitive entre les signaux EPG et les étapes qui interviennent dans la transmission et en particulier l'acquisition des mastrévirus par cicadelle, grâce à des interruptions artificielles des séances d'alimentation.

Les géminivirus sont considérés comme des virus circulants non multipliants (conférer Article N°1 et N°3). De ce fait, on suppose que le mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant illustré en MET pour les virus de la famille des *Luteoviridae* transmis par puceron (Gildow, 1987, 1993 ; Garret *et al.*, 1993), existe également pour les géminivirus. Cependant, seule une observation ultrastructurale permettra de valider l'intervention d'un tel mécanisme dans le passage trans-membranaire des géminivirus.

Dans le souci de localiser les sites de fixation des particules virales au niveau du tractus intestinal des insectes et de les corréler à la spécificité de transmission du MSV par *C. mbila*,

nous avons réalisé dans un premier temps une étude immuno-histologique (Annexe 3). Cependant, aucune différence dans l'intensité d'accrochage du virus purifié sur la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin moyen n'a pu être observée et corrélée à la présence d'un récepteur spécifique. Par la suite, nos premières démarches en MET n'ont pas permis de visualiser de particules de MSV dans la lumière intestinale, la chambre filtrante dont l'implication dans la transmission du MSV par le genre *Cicadulina* a été fortement suggérée (Markham *et al.*, 1988 ; Markham & Medina, 1998), ou les cellules épithéliales des intestins moyen et postérieur, malgré des AAP longues (30 jours). En effet, sachant que la quantité de particules de MSV dans un insecte vecteur ne semble pas restreinte à un seuil (Article N°3), l'augmentation de la durée d'AAP devrait augmenter les chances de visualiser une particule virale en MET. La taille plus réduite des glandes salivaires et la persistance d'une charge virale homogène, suite à une AAP, devraient également favoriser la visualisation ultrastructurale des particules de MSV.

Perspectives de travail à long terme

La forte spécificité, qui unit les virus et leurs vecteurs, semble déterminée par l'intervention de réactions spécifiques de type ligand-récepteur. Dans une perspective à long terme, l'étude des interactions moléculaires entre le virus et le vecteur devraient déboucher sur de nouvelles stratégies de contrôle des maladies virales des plantes.

L'identification de récepteurs chez les insectes vecteurs impliqués dans la transmission des phytovirus n'ayant pas abouti jusqu'à présent, les travaux porteraient en priorité sur la recherche des motifs de la CP impliqués dans le passage trans-membranaire des géminivirus. Outre son rôle dans la transmission, la CP des mastrevirus semble soumise à une forte pression de sélection, ce qui explique qu'aucun variant infectieux non transmis n'a été décrit à notre connaissance. Un tel variant pourrait être sélectionné par l'utilisation de la technique de microinjection de virus dans l'hémolymphe des insectes, qui permet de court-circuiter la paroi intestinale. Il pourrait être créé artificiellement par la recombinaison entre le gène de la CP d'un mastrevirus transmis et d'un mastrevirus apparenté non transmis, comme par exemple le MSV et le DSV, respectivement transmis et non transmis par *C. mbila*. Parallèlement à ces travaux, la CP du MSV sera produite dans un système d'expression bactérien, pour tester son activité quant à la transmission. Des tests de compétition entre la CP d'origine bactérienne et le virus purifié pour le récepteur putatif de l'insecte vecteur pourront être réalisés. Donnée en

premier repas à la population active de *C. mbila*, la CP d'origine bactérienne permettra de tester sa capacité à bloquer la transmission du MSV apporté au cours d'un deuxième repas. Simultanément, l'utilisation d'oligopeptides synthétiques, définis d'après la séquence d'un clone de MSV, devrait nous octroyer la possibilité de cartographier le ou les région(s) de la CP qui interviennent dans la transmission. Cependant, cette technique n'est pas capable d'identifier les motifs de type conformation tridimensionnelle.

La neutralisation de la transmission virale en saturant le ou les motif(s) des CP, qui interviennent dans l'attachement cellulaire semble être une voie possible. En effet, l'utilisation de composés anti-viraux chez l'homme, qui inhibent la liaison virus-récepteur cellulaire, est déjà le cas pour lutter contre les rhinovirus (Hadfield *et al.*, 1999). Ces matières actives bloquent le motif de la CP qui intervient dans l'adhésion cellulaire. De manière équivalente, la saturation ou le blocage des récepteurs viraux des vecteurs est également envisageable par l'intermédiaire de protéines portant le motif de la CP capable d'interagir avec le récepteur. L'utilisation de ces protéines pourra se faire par le traitement des plantes ou par leurs expressions dans des plantes transgéniques.

Jusqu'à présent, la stratégie de création des plantes transgéniques résistantes aux insectes ravageurs et vecteurs de virus repose sur des mécanismes simples conférant des résistances à des ravageurs cibles (Gatehouse *et al.*, 1993). Le plus largement utilisé est celui qui consiste à exprimer une protéine bactérienne ou végétale entomotoxique dans l'espèce végétale hôte (Sauvion, 1995). Si la disponibilité de variétés transgéniques résistantes aux insectes est déjà effective, l'évolution de la stratégie et son impact sur l'environnement restent incertains. A notre connaissance, aucune donnée concernant l'utilisation des plantes transgéniques dans la lutte contre la transmission virale par insectes piqueur suceurs ne sont actuellement disponibles. Cependant, on peut supposer que l'utilisation d'une stratégie basée sur la saturation ou le blocage des sites récepteurs impliqués dans le cycle du virus à travers l'insecte aura une répercussion plus faible sur les écosystèmes qu'une méthode insecticide. Néanmoins, une telle stratégie de préservation du vecteur n'est envisageable que si l'insecte ne provoque pas de dégâts directs sur les cultures.

Liste des Figures et des Tableaux

- Figure 1.** Cycle d'un virus de végétaux transmis par insecte vecteur selon le mode circulant (Page 6).
- Figure 2.** Chute de potentiel caractéristique enregistrée en EPG lors d'une piqûre d'essai de *Myzus persicae* et divisée en trois sous-phases corrélées au mécanisme d'inoculation et d'acquisition des virus non circulants non persistants (Page 8).
- Figure 3.** Les stratégies de la transmission non circulante des phytovirus par insecte vecteur de type piqueur suceur (Page 10).
- Figure 4.** Ultrastructure des particules de MSV (Page 40).
- Figure 5.** Classification des géminivirus en trois genres selon l'organisation de leur génome et leurs insectes vecteurs (Page 41).
- Figure 6.** Exemples de modifications cellulaires typiquement associées à l'infection par un géminivirus (Page 43).
- Figure 7.** Cinquième stade larvaire (puparium) du biotype B de *Bemisia tabaci* (Page 46).
- Figure 8.** Représentation schématique de la situation épidémiologique des bégomovirus transmis par le complexe de biotypes de *Bemisia tabaci* (Page 47).
- Figure 9.** Chute de potentiel (pd) enregistrée par électropénétrographie (EPG-DC) avec le biotype B de *Bemisia tabaci* (Page 48).
- Figure 10.** Symptômes chlorotiques de la maladie de la striure sur variété sensible de maïs (Page 50)
- Figure 11.** Insectes adultes du genre *Cicadulina* (Page 53).
- Figure 12.** Représentation schématique du montage électrique utilisé en électropénétrographie (EPG)(Page 56).
- Figure 13.** Représentation schématique de la tête et du prothorax d'une cicadelle, avec vue latérale du système digestif antérieur et de l'appareil salivaire (Page 90).
- Figure 14.** Représentation schématique d'un modèle dynamique de circulation du MSV à travers son vecteur *C. mbila* (Page 125).
- Tableau 1.** Récapitulatif non exhaustif des *Geminiviridae* pour lesquels les insectes vecteurs ont été identifiés (Page 45).

Tableau 2. Les espèces du genre *Cicadulina* vectrices et non vectrices du *Maize streak virus* (MSV)(Page 52).

Tableau 3. Signaux caractéristiques enregistrés en EPG-DC chez le puceron lors d'une alimentation sur plante et corrélations avec les activités biologiques de l'insecte (Page 57).

Article N°1

Figure 1. Représentation schématique du mode de transmission circulant non multipliant des virus de la famille des *Luteoviridae* par puceron et de leurs interactions avec les barrières à la transmission (Page 38).

Tableau 1. Familles et genres viraux contenant des espèces transmissent selon le mode circulant (Page 39).

Article N°2

Figure 1. Electrical penetration graph of *Cicadulina mbila* feeding behavior on maize : temporal trace and spectral analysis (Page 81).

Figure 2. Electrical penetration graph of *Cicadulina mbila* feeding behavior on maize : comparison of the EPG traces obtained during the same recording in EPG mode and emf mode (Page 82).

Figure 3. Transverse sections in stylets of *Cicadulina mbila* (Page 83).

Figure 4. Cross sections in two salivary sheaths within a mesophyll cell, adjacent to a secondary vascular bundle (Page 84).

Figure 5. Longitudinal section in a transverse vascular bundle, connecting two secondary vascular bundles with one xylem vessel (Xy) and one sieve tube (Ph) (Page 85).

Figure 6. Histological and ultrastructural observations of maize leaf tissues containing a stylet pathway ending in a sieve tube (Page 86).

Table 1. Median and duration analysis of EPG waveform periods recorded with *C. mbila* on maize (Page 87).

Table 2. Sequences of EPG waveform periods of three *C. mbila* leafhoppers on maize before stylets amputation (Page 88).

Article N°3

- Figure 1.** Accumulation kinetics of maize streak virus in leafhoppers (**Page 116**).
- Figure 2.** Persistence kinetics of maize streak virus in leafhoppers (**Page 117**).
- Figure 3.** Persistence kinetics of maize streak virus in leafhoppers guts, hemolymphs and heads (**Page 118**).
- Figure 4.** Persistence kinetics of digitaria streak virus in leafhoppers guts, hemolymphs and heads (**Page 119**).
- Figure 5.** Dynamic studies of virus flow across the gut wall (**Page 120**).
- Figure 6.** Persistence kinetics of maize streak virus in leafhoppers guts, hemolymphs and heads by quantitative PCR (**Page 121**).
- Figure 7.** Diagrammatic representation of the genome regions amplified by PCR for maize streak virus (MSV) and *Digitaria* streak virus (DSV) (**Page 122**).
- Table 1.** Study of the specificity of MSV transmission with *C. mbila*, using the non vector species *C. chinai* and viruses which are not transmitted by leafhoppers of the genus *Cicadulina*, DSV and RYMV (**Page 115**).

Liste des Publications

Publications dans des revues scientifiques

- Lett, J.M.,** and P., Schmitt. (1992). BSA : a new cryoprotectant for suspension cells of bramble (*Rubus fruticosus*). *C.R. Acad.Sci.Paris*, t.315, Série III, 453-458.
- Ioannidou, D., **Lett, J. M.**, Pinel, A., Assigbetse, K., Brugidou, C., Ghesquière, A., Nicole, M., and D., Fargette. (2000). Responses of *Oryza sativa japonica* sub-species to infection with *Rice yellow mottle sobemovirus*. *Physiological Molecular and Plant Pathology*, 57, 177-188.
- Lett, J. M.**, Granier, M., Grondin, M., Turpin, P., Chiroleu, F., Peterschmitt, M., and Reynaud, B. (2000). Electrical penetration graphs from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathways and consequences for virus transmission efficiency. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, acceptée avec révisions.
- Lett, J.M.,** B., Reynaud, et M., Peterschmitt. (2000). Les mécanismes de la transmission circulante des virus de végétaux par insectes piqueur suceurs. *Virologie*, acceptée avec révisions.
- Lett, J.M.,** M., Granier, I., Hippolyte, M., Grondin, M., Royer, S., Blanc, B., Reynaud, and M., Peterschmitt. (2000). PCR-based studies of spatial and temporal distribution of mastreviruses (*Geminiviridae*) in leafhoppers belonging to the genus *Cicadulina*. *Virology*, soumise.

Communications orales

- Reynaud, B., **J.M., Lett, M.**, Granier, F., Molinaro, Y., Mara, M., Grondin, D., Lan Sun Luk, and M., Peterschmitt. (1997). Electrical penetration graph from *Cicadulina mbila* on a susceptible maize hybrid and the fine structure of its stylets pathways. *9th International Auchenorrhyncha Congress*, February 17-21, Sydney, Australia.
- Reynaud, B., **J.M., Lett, M.**, Granier, F., Molinaro, F., Grauer, M., Grondin, P., Lefrère, J., Pomes, and M., Peterschmitt. (1997). Electrical penetration graph from *Cicadulina mbila* and its application in plant breeding to screen a potential resistance of maize to MSV transmission. *Maize Streak Disease Symposium*, September 8-11, Nelspuit, South Africa.
- Lett J.M.,** M., Granier, M., Grondin, S., Blanc, M., Peterschmitt, et B., Reynaud. (1998). Analyse cellulaire des mécanismes d'acquisition du maize streak virus (MSV) par *Cicadulina mbila*. *Rencontres du groupe Vection* à l'INRA de Colmar du 25-26 mars 1998.

- Lett J.M.** (1999). Caractérisation du comportement alimentaire de *Cicadulina mbila* (Naude, 1924) sur maïs par électropénétrographie, corrélée à la localisation cellulaire des stylets. *Travaux Dirigés*, Centre National d'Etudes Agronomiques des Régions Chaudes, 26 Janvier, CNEARC, Montpellier.
- Lett J.M.** (1999). Les virus à Transmission Circulante. *Rencontres du Groupe des Phytovirologues d'Agropolis*, 25 Mars, CIRAD, Montpellier.
- Lett J.M., M. Granier, M. Grondin, I. Hypolithe, B. Reynaud et M. Peterschmitt.** (2000). Traquer le MSV dans les entrailles de cicadelles à l'aide de la technique PCR. *Rencontres du groupe Vection*, 18-19 Avril, INRA de Rennes.

Poster

- Lett J.M., Granier, M. Grondin, J. Escoute, B. Reynaud et M. Peterschmitt.** 1999. Analyse moléculaire et cellulaire des mécanismes de transmission du *Maize streak virus* par *Cicadulina mbila*. *7èmes Rencontres de Virologie Végétale*, 14-18 Mars, Aussois.

Références Bibliographiques

Aksoy, S. (1995). Molecular analysis of the endosymbionts of tsetse flies : 16S rDNA locus and over-expression of a chaperonin. *Insect Molecular Biology* **4**, 23-29.

Ammar, E. D. (1994). Propagative transmission of plant and animal viruses by insects : factors affecting vector specificity and competence. *Advances Disease Vector Research* **10**, 289-331.

Ammar, E. D., Jarifors, U. & Pirone, T. P. (1994). Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* **84**, 1054-1060.

Atreya, P. L., Lopezmoya, J. J., Chu, M. H., Atreya, C. D. & Pirone, T. P. (1995). Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* **76**, 265-270.

Atzmon, G., Van Oss, H. & Czosnek, H. (1998). PCR-amplification of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) DNA from squashes of plants and whitefly vectors : application to the study of TYLCV acquisition and transmission. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 189-194.

Bakker, W. (1974). Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya, pp. 152: Wageningen University, The Netherlands.

Bandla, M. D., Campbell, L., Ullman, D. E. & Sherwood, J. L. (1998). Interaction of tomato spotted wilt tospovirus glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology* **88**, 98-104.

Barrow, M. R. (1992). Development of maize hybrids resistant to maize streak virus. *Crop Protection* **11**, 267-271.

Bass, H. W., Nagar, S., Hanley Bowdoin, L. & Robertson, D. (2000). Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *Journal of Cell Science* **113**, 1149-1160.

Baumann, P., Baumann, L., Lai, C., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A. & Clark, M. A. (1995). Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera* : intercellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology* **49**, 55-94.

Bedford, I. D., Briddon, R. W., Brown, J. K., Rosell, R. C. & Markham, P. G. (1994a). Geminivirus-Transmission and Biological Characterisation of *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotypes from Different Geographic Regions. *Annals of Applied Biology* **125**, 311-325.

Bedford, I. D., Briddon, R. W., Jones, P., Alkaff, N. & Markham, P. G. (1994b). Differentiation of three whitefly-transmitted geminiviruses from the republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology* **100**, 243-257.

Bellows, T. S., Perring, T. M., Gill, R. J. & Headrick, D. H. (1994). Description of a species of *Bemisia* (Homoptera : Aleyrodidae) infesting North American agriculture. *Annals of the Entomology Society of America* **87**, 195-206.

- Bethke, J. A., Paine, T. D. & Nuessly, G. S.** (1991). Comparative biology, morphometrics and development of 2 populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae) on cotton and poinsettia. *Annals of the Entomological Society of America* **84**, 407-411.
- Bigarré, L.** (1999). Diversité des Gémiviruses et Interactions avec leurs Hôtes, pp. 118: Université Paris XI, France.
- Blackmer, J. L., Lindley, V. A. & Byrne, D. N.** (1995). Histological examination of flight muscle development and breakdown in *Bemisia tabaci* (Homoptera : Aleyrodidae) : relationship to age and flight behavior. *Journal of Morphology* **226**, 213-221.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R., Garcia-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**, 141-7.
- Blanc, S., Schmidt, I., Kuhl, G., Esperandieu, P., Lebeurier, G., Hull, R., Cerutti, M. & Louis, C.** (1993). Paracrystalline structure of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor produced both in plants and in a heterologous system and relationship with a solubilized active form. *Virology* **197**, 283-92.
- Blanc, S., Schmidt, I., Vantard, M., Scholthof, H. B., Kuhl, G., Esperandieu, P., Cerutti, M. & Louis, C.** (1996). The aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus forms a stable complex with microtubules in both insect and plant cells. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **93**, 15158-63.
- Boulton, M. I. & Markham, P. G.** (1986). The use of squash-blotting to detect plant pathogens in insect vectors. In *Developments in applied biology 1, 1986. Developments and applications in virus testing*, pp. 55-69. The Lavenham, Great Britain: Eds Jones, R.A.C. and L. Torrance. UK : Association of Applied Biologists.
- 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.** (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO Journal* **14**, 650-659.
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J. & Markham, P. G.** (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **177**, 85-94.
- Brown, J. K. & Bird, J.** (1992). Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean Basin. *Plant Disease* **76**, 220-225.
- Brown, D. J. F., Robertson, W. M. & Trudgill, D. L.** (1995a). Transmission of viruses by plant nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 223-249.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R. & Rosell, R. C.** (1995b). The sweetpotato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* **40**, 511-534.
- Brown, J. K., Perring, T. M., Cooper, A. D., Bedford, I. D. & Markham, P. G.** (2000). Genetic analysis of *Bemisia* (Hemiptera : Aleyrodidae) populations by isoelectric focusing electrophoresis. *Biochemical Genetics* **38**, 13-25.

Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L. (1996). Viruses of plants. *CAB International, Cambridge, United Kingdom*.

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

Caciagli, P. & Bosco, D. (1997). Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* **87**, 610-613.

Caciagli, P., Bosco, D. & AL-Bitar, L. (1995). Relationships of the sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector *Bemisia tabaci* gen. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 163-170.

Cahill, M., Jarvis, W., Gorman, K. & Denholm, I. (1996). Resolution of baseline responses and documentation of resistance to buprofezin in *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae). *Bulletin of Entomological Research* **86**, 117-122.

Caillaud, C. M., Dipietro, J. P., Chaubet, B. & Pierre, J. S. (1995). Application of discriminant analysis to electrical penetration graphs of the aphid *Sitobion avenae* feeding on resistant and susceptible wheat. *Journal of Applied Entomology* **119**, 103-106.

Campbell, B. C. & Dreyer, D. L. (1990). The role of plant matrix polysaccharides in aphid-plant interactions. In *Aphid-plant genotype interactions*, pp. 149-170. Edited by R. K. Campbell & R. D. Eikenberry. Amsterdam: Elsevier Science.

Chang, V. C. S. (1978). Feeding activities of the sugarcane leafhopper : Identification of electronically recorded waveforms. *Annals of the Entomological Society of America* **71**, 31-36.

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

Chen, J. Q., Y., R., Delobel, B., Sauvion, N., Guillaud, J. & Febvay, G. (1997). Melon resistance to the aphid *Aphis gossypii* : behavioural analysis and chemical correlations with nitrogenous compounds. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **85**, 33-44.

Cohen, S. & Antignus, Y. (1994). Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Advances in Disease Vector Research* **10**, 259-288.

Costa, H. S. & Brown, J. K. (1990). Variability in biological characteristics, isozyme patterns and virus transmission among populations of *Bemisia tabaci* Genn. in Arizona. *Phytopathology* **80**, 888.

Costa, H. S. & Brown, J. K. (1991). Variation in biological characteristics and in esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci* Genn. and the association of one population with silverleaf symptom development. *Entomologia Experimentalis and Applicata* **61**, 211-219.

- Costa, H. S., Henneberry, T. J. & Toscano, N. C.** (1997). Effects of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera:Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. *Journal of Economical Entomology* **90**, 333-339.
- Crane, P. S.** (1970). The feeding behavior of the blue-green sharpshooter, *Hordnia circellata* Baker. Ph-D. Thesis, University of California, Davis, 132 pp.
- Damsteegt, V. D.** (1983). MSV: I. Host range and vulnerability of maize germ plasm. *Plant Disease* **67**, 734-737.
- Delpuech, I.** (1985). Les cicadelles vectrices de viroses du maïs à l'île de la réunion. Etude préliminaire. *Phytotechnie*, 132.
- Dintinger, J., Reynaud, B., Letourmy, P., Marchand, J.-L. & Peterschmitt, M.** (1997a). A multilocation variety trial in Africa to evaluate efficiency and stability of complete resistance to MSV originating in La Réunion. In *Maize Streak Disease Symposium, 9-11 Sept 1997*, pp. 24. Edited by A.-G. C. Institute. South Africa.
- Dintinger, J., Pernet, A., Rodier, A., Reynaud, B. & Marchand, J.-L.** (1997b). A complete resistance to maize streak virus originating in Mascarene germplasm, inheritance and gene mapping. In *Maize Streak Disease Symposium, 9-11 Sept 1997*, pp. 21. Edited by A.-G. C. I.-G. C. Institute. South Africa.
- Dollet, M., Accoto, G. P., Lisa, V., Menissier, J. & Boccardo, G.** (1986). A geminivirus, serologically related to maize streak virus, from *Digitaria sanguinalis* from Vanuatu. *Journal of General Virology* **67**, 933-937.
- Donson, J., Morris-Krsinich, B. A. M., Boulton, M. I. & Davies, J. W.** (1984). A putative primer for second-strand DNA synthesis of MSV is virion-associated. *EMBO Journal* **3**, 3069-3073.
- Douglas, A. E.** (1988). Experimental studies on the mycetome symbiosis in the leafhopper *Euscelis incisus*. *Insect Physiology* **34**, 1043-1053.
- Downham, M. C. A., Claridge, M. F. & Morgan, J. C.** (1997). Preliminary observations on the mating behaviour of *Cicadulina storeyi* China and *C. mbila* Naudé (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Insect Behaviour* **10**, 753-760.
- Dry, I. B., Krake, L. R., Rigden, J. E. & Rezaian, M. A.** (1997). A novel subviral agent associated with a geminivirus: the first report of a DNA satellite. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **94**, 7088-7093.
- Efron, Y., Kim, S. K., Fajemisin, J. M., Mareck, J. H., Tang, C. Y., Dabrowski, Z. T., Rossel, H. W. & Thottappilly, G.** (1989). Breeding for resistance to Maize Streak Virus: a multidisciplinary team approach. *Plant Breeding* **103**, 1-36.
- Esau, K. & Magyarosy, A. C.** (1979). Nuclear abnormalities and cytoplasmic inclusion in *Amoinkia* infected with the curly top virus. *Journal of Ultrastructure Research* **66**, 11-21.

Estabrook, E. M., Suyenaga, K., Tsai, J. H. & Falk, B. W. (1996). Maize stripe tenuivirus RNA2 transcripts in plant and insect hosts and analysis of pvc2, a protein similar to the Phlebovirus virion membrane glycoproteins. *Virus Genes* **12**, 239-247.

FAO (1999). Statistical Databases: <http://apps.fao.org/default.htm>.

Filichkin, S. A., Brumfield, S., Filichkin, T. P. & Young, M. J. (1997). In vitro interactions of the aphid endosymbiotic symL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *Journal of Virology* **71**, 569-577.

Filichkin, S. A., Lister, R. M., McGrath, P. F. & Young, M. J. (1994). *In vivo* expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus read-through gene. *Virology* **205**, 290-299.

Forbes, A. R. (1969). The stylets of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera, Aphididae). *Canadian Journal of Entomology* **101**, 31-41.

Franz, A., Makkouk, K. M. & Vetten, H. J. (1998). Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Phytopathology* **146**, 347-355.

Frohlich, D. R., TorresJerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G. & Brown, J. K. (1999). A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 1683-1691.

Fukatsu, T. & Ishikawa, H. (1992). Synthesis and localization of symbionin an aphid endosymbiont protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **22**, 167-174.

Garret, A., Kerlan, C. & Thomas, D. (1993). The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Archives of Virology* **131**, 377-392.

Gatehouse, A. M. R., Shi, Y., Powell, K. S., Brough, C., Hilder, V. A., Hamilton, W. D. O., Newell, C. A., Merryweather, A., Boulter, D. & Gatehouse, J. A. (1993). Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **342**, 279-286.

Gergerich, R. & Scott, H. A. (1991). Determinants in the specificity of virus transmission by leaf-feeding beetles. *Advances in Disease Vector Research* **8**, 1-14.

Ghanim, M. & Czosnek, H. (2000). Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV-Is) is transmitted among whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a sex-related manner. *Journal of Virology* **74**, 4738-45.

Ghanim, M., Morin, S., Zeidan, M. & Czosnek, H. (1998). Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* **240**, 295-303.

Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1996). How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends in Plant Science* **1**, 260-267.

Gildow, F. E. (1987). Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids. *Advances in Disease Vector Research* **4**, 93-120.

- Gildow, F. E.** (1993). Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* **83**, 270-277.
- Gildow, F. E. & Gray, S. M.** (1993). The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology* **83**, 1293-1302.
- Gildow, F. E., Reavy, B., Mayo, M. A., Woodford, T. & Duncan, G. H.** (1997). Potato leafroll virus-like particles lacking readthrough protein are transmitted by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **87**, S33.
- Gill, R. J.** (1990). The morphology of whiteflies. In *Whiteflies: their Bionomics, Pest Status and Management*, pp. 13-44. Hampshire, UK: Intercept Ltd.
- Graham, C. L.** (1979). Inability of certain vectors in North Africa to transmit maize streak. *Environmental Entomology* **8**, 228-230.
- Gray, S. M.** (1996). Plant virus proteins involved in natural vector transmission. *Trends in Microbiology* **4**, 253-294.
- Gray, S. M. & Banerjee, N.** (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 128-148.
- Grylls, N. E.** (1963). A striate mosaic virus disease of grasses and cereals in Australia, transmitted by the cicadellid *Nesoclutha obscura*. *Australian Journal of Agricultural Research* **14**, 143-153.
- Hadfield, A. T., Diana G. D. & Rossmann M. G.** (1999). Analysis of three structurally related antiviral compounds in complex with human rhinovirus 16. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **96**, 14730-14735.
- Ham, P. J.** (1992). Immunity in haematophagous insect vectors of parasitic infection. *Advances in Disease Vector Research* **9**, 41-66.
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D. & Reeves, W. C.** (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology* **28**, 229-262.
- Harrewijn, P., Tjallingii, W. F. & Mollema, C.** (1996). Electrical recording of plant penetration by western flower thrips. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **79**, 345-353.
- Harris, K. F.** (1977). An ingestion-egestion hypothesis of non circulative virus transmission. In *Aphids as Virus Vectors*, 1st edn, pp. 165-220. Edited by K. Maramorosch. New York : Academic Press.
- Harrison, B. D.** (1985). Advances in geminivirus research. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 55-82.
- Hébrard, E., Froissart, R., Louis, C. & Blanc, S.** (1999). Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie* **3**, 35-48.

- Hogenhout, S. A., Van der Wilk, F., Verbeek, M., Goldbach, R. W. & Van den Heuvel, J. F. J. M. (1998). Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *Journal of Virology* **72**, 358-365.
- Hogenhout, S. A., Verbeek, M., Hans, F., Houterman, P. M., Fortass, M., Van Der Wilk, F., Huttinga, H. & Van Den Heuvel, J. F. J. M. (1996). Molecular bases of the interactions between luteoviruses and aphids. *Agronomie* **16**, 167-173.
- Holbrook, F. R. & Tabachnick, W. J. (1995). *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) complex in California. *Journal of Medical Entomology* **32**, 413-419.
- Horns, T. & Jeske, H. (1991). Localization of Abutilon Mosaic Virus DNA within leaf tissue by *in situ* hybridization. *Virology* **181**, 580-588.
- Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H. & Raccah, B. (1994). Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* **75**, 1407-14.
- Hunter, W. B. & Backus, E. A. (1989). Mesophyll-feeding by the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera : cicadellidae) : Results from electronic monitoring and thin-layer chromatography. *Environmental Entomology* **18**, 465-472.
- Hunter, W. B., Hiebert, E., Webb, S. E., Tsai, J. H. & Polston, J. E. (1998). Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Disease* **82**, 1147-1151.
- Ioannidou, D., Lett, J. M., Pinel, A., Assigbetse, K., Brugidou, C., Ghesquière, A., Nicole, M. & Fargette, D. (2000). Responses of *Oryza sativa japonica* sub-species to infection with Rice yellow mottle virus. *Physiological Molecular and Plant Pathology* PMPP00/026, sous presse.
- Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B. & Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *Journal of General Virology* **79**, 3091-3099.
- Janssen, J. A. M., Tjallingii, W. F. & Van Lenteren, J. C. (1989). Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **52**, 69-81.
- Johnson, D. D. & Walker, G. P. (1999). Intracellular punctures by the adult whitefly *Bemisia argentifolii* on DC and AC electronic feeding monitors. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92**, 257-270.
- Julia, J. F. & Dollet, M. (1989). *Nesoclutha declivata* homoptera cicadellidae, vector of digitaria streak virus (geminivirus) in vanuatu. *Phytopathology* **127**, 42-48.
- Karpf, A. R. & Brown, D. T. (1998). Comparison of Sindbis virus-induced pathology in mosquito and vertebrate cell cultures. *Virology* **240**, 193-201.

- Kawabe, S. & Mac Lean, D. L.** (1978). The mechanisms of rice resistance to the green rice leafhopper. Analysis of honeydew excreted by the green leafhopper on resistant and susceptible rice. *Abstr. 19th Conf. Jap. Soc. Appl. Ent. Zool.* 244.
- Kawabe, S. & Mac Lean, D. L.** (1980). Electronic measurement of probing activities of the green leafhopper of rice. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **27**, 77-82.
- Kawabe, S., Mac Lean, D. L., Tatsuki, S. & Ouchi, T.** (1981). An improved electronic measurement system for studying ingestion and salivation activities of leafhoppers. *Annals of the Entomological Society of America* **74**, 222-225.
- Kennedy, G. G.** (1976). Host plant resistance and spread of plant viruses. *Environmental Entomology* **5**, 827-832.
- Kikkert, M., Meurs, C., Van de Wetering, F., Dorfmueller, S., Peters, D., Kormelink, R. & Goldbach, R.** (1998). Binding of tomato spotted wilt virus to a 94-kDa thrips protein. *Phytopathology* **88**, 63-69.
- Kim, S. K., Efron, Y., Fajesimin, J. M. & Buddenhagen, I. W.** (1989). Mode of gene action for resistance in maize to maize streak virus. *Crop Science* **29**, 890-894.
- Kimmins, F. M. & Bosque-Perez, N. A.** (1996). Electrical penetration graphs from *Cicadulina* spp. and the inoculation of a persistent virus into maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 46-49.
- Kimmins, F. M.** (1989). Electrical penetration graphs from *Nilaparvata lugens* on resistant and susceptible rice varieties. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **27**, 77-82.
- Kimmins, F. M. & Tjallingii, W. F.** (1985). Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **39**, 135-141.
- Klingler, J., Powell, G., Thompson, G. A. & Isaacs, R.** (1998). Phloem specific aphid resistance in Cucumis melo line AR 5: effects on feeding behaviour and performance of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**, 79-88.
- Klute, K. A., Nadler, S. A. & Stenger, D. C.** (1996). Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with Rep and C4 genes derived from subgroup III ancestor. *Journal of General Virology* **77**, 1369-1378.
- Kunik, T., Palanichelvam, K., Czosnek, H., Citovsky, V. & Gafni, Y.** (1998). Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *The Plant Journal* **13**, 393-399.
- Lamb, J. W., Duncan, G. H., Reavy, B., Gildow, F. E., Mayo, M. A. & Thay, R. T.** (1996). Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *Journal of General Virology* **77**, 1349-1358.
- Larsen, R. C. & Duffus, J. E.** (1984). A simplified procedure for the purification of curly top virus and the isolation of its monomer and dimer particles. *Phytopathology* **74**, 114-118.

- Lazarowitz, S. G. & Beachy, R. N.** (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell* **11**, 535-548.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M. & Blanc, S.** (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO Journal* **18**, 7077-7085.
- Lei, H., Tjallingii, W. F. & van Lenteren, J. C.** (1998). Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **88**, 73-80.
- Lei, H., van Lenteren, J. C. & Tjallingii, W. F.** (1999). Analysis of resistance in tomato and sweet pepper against the greenhouse whitefly using electrically monitored and visually observed probing and feeding behaviour. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92**, 299-309.
- Leisner, S. M., Turgeon, R. & Howell, S. H.** (1993). Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**, 191-202.
- Liu, H., Boulton, M. I., Thomas, C. L., Prior, D. A. M., Oparka, K. J. & Davies, J. W.** (1999c). Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Molecular Plant Microbe Interactions* **12**, 894-900.
- Liu, L., Davies, J. W. & Stanley, J.** (1998). Mutational analysis of bean yellow dwarf virus, a geminivirus of the genus Mastrevirus that is adapted to dicotyledonous plants. *Journal of General Virology* **79**, 2265-2274.
- Liu, L., Saunders, K., Thomas, C. L., Davies, J. W. & Stanley, J.** (1999b). Bean yellow dwarf virus RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology* **256**, 270-279.
- Liu, S., Bedford, I. D., Briddon, R. W. & Markham, P. G.** (1997). Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology* **78**, 1791-1794.
- Louie, R.** (1995). Vascular Puncture of Maize Kernels for the Mechanical Transmission of Maize White Line Mosaic Virus and Other Viruses of Maize. *Phytopathology* **85**, 139-143.
- Louis, C. & Nicolas, G.** (1976a). Ultrastructure of the endocellular procaryotes of arthropods as revealed by freeze-etching I. "a" Type endosymbiots of the leafhopper *Euscelis plebejus* Fall. (*Homoptera, Jassidae*). *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire* **26**, 121-126.
- Louis, C., Nicolas, G. & Pouphe, M.** (1976b). Ultrastructure of the endocellular procaryotes of arthropods as revealed by freeze-etching II. "t" Type endosymbiots of the leafhopper *Euscelis plebejus* Fall. (*Homoptera, Jassidae*). *Journal de Microscopie et de Biologie Cellulaire* **27**, 53-58.
- Ludwig, G. V., Israel, B. A., Christensen, B. M., Yull, T. M. & Schultz, K. T.** (1991). Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. *Virology* **181**, 564-571.

Maia, I. G., Haenni, A. & Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* **77**, 1335-41.

Marion-Poll, F., Della Giustina, W. & Mauchamp, B. (1987). Changes of electrical patterns related to feeding in a mesophyll feeding leafhopper *Zyginidia scutellaris*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **43**, 115-124.

Markham, P. G., Bedford, I. D., Liu, S., Frolich, D. F., Rosell, R. & Brown, J. K. (1995). The transmission of geminiviruses by biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius). In *Bemisia* : 1995, pp. 69-75. Edited by D. G. a. R. T. Mayer. Andover: Intercept.

Markham, P. G. & Medina, V. (1998). Intracellular pathway of maize streak virus in its leafhopper vector, *Cicadulina mbila* (Naude). In *2nd International Workshop on Bemisia and geminiviral diseases*, pp. L-33. San Juan, Puerto Rico.

Markham, P. G., Pinner, M. S., Mesfin, T., Nebbache, S., Briddon, R. & Medina, V. (1988). Geminiviruses, and their interaction with vectors. *Annual report 1988 of the John Innes Institute*, 63-67.

Markham, P. G., Pinner, S. & Boulton, M. I. (1984). The transmission of MSV by leafhoppers, a new look at host adaptation. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischer Gesellschaft* **57**, 431-432.

Marsh, M. & Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research* **36**, 107-151.

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.

Martin, D. P., Willment, J. A. & Rybicki, E. P. (1999). Evaluation of Maize Streak Virus pathogenicity in differentially resistant *Zea mays* genotypes. *Phytopathology* **89**, 695-700.

McLean, D. L. & Kinsey, M. G. (1967). Probing behavior of the pea aphid, *Acyphosiphon pisum*. I. Definitive correlation of electronically recorded waveforms with aphid probing activities. *Annals of the Entomological Society of America* **60**, 400-406.

McLean, D. L. & Kinsey, M. G. (1984). The precibarial valve and its role in the feeding behavior of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Bulletin of the Entomological Society of America* **30**, 26-31.

Mehta, P., Wyman, J. A., Nakhla, M. K. & Maxwell, D. P. (1994). Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato-infecting geminiviruses. *Journal of Economic Entomology* **87**, 1285-90.

Mesfin, T., Hollander, J. D. & Markham, P. G. (1991). *Cicadulina* species and maize streak virus in Ethiopia. *Tropical pest management* **37**, 240-244.

Mesfin, T., Bosque-Pérez, N. A., Buddenhagen, I. W., Thottappilly, G. & Olojede, S. O. (1992). Studies of Maize streak virus isolates from grass and cereal hosts in Nigeria. *Plant Disease* **76**, 789-795.

- Mesfin, T., Hollander, J. D. & Markham, P. G.** (1995). Feeding activities of *Cicadulina mbila* (Hemiptera: Cicadellidae) on host-plants. *Bulletin of Entomological Research* **85**, 387-396.
- Miller, B. R. & Mitchell, C. J.** (1991). Selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**, 399-407.
- Miranda, G. J. & Hoganezawa, H.** (1995). Identification, purification, and serological detection of the major noncapsid protein of rice grassy stunt virus. *Phytopathology* **85**, 1530-1533.
- Missich, R., Ramirez-Parra, E. & Gutierrez, C.** (2000). Relationship of oligomerization to DNA binding of *Wheat dwarf virus* RepA and Rep proteins. *Virology* **273**, 178-188.
- Mittler, T. E.** (1957). Studies on the feeding and the nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin)(Homoptera, Aphididae). I. The uptake of phloem sap. *Journal of Experimental Biology* **34**, 334-341.
- Moffat, A. S.** (1999). Plant pathology - Geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science* **286**, 1835.
- Monttlor, C. B. & Tjallingii, W. F.** (1989). Stylet penetration by two aphid species on susceptible and resistant lettuce. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **52**, 103-111.
- 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* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **256**, 75-84.
- Morin, S., Zeidan, M. & Czosnek, H.** (1995). Interactions between tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV), the tomato host plant and the whiteflies vector. Pages 85-88 in: Adv. Vegetable Virus Res. Proc. 8th Conf. Virus Dis. Vegetables, Prague.
- Mound, L. A. & Halsey, S. H.** (1978). Whiteflies of the World, pp. 340. New York: Wiley.
- Mourya, D. T., Ranadive, S. N., Gokhale, M. M., Barde, P. V., Padbidri, V. S. & Banerjee, K.** (1998). Putative Chikungunya virus-specific receptor proteins on the midgut brush border membrane of *Aedes aegypti* mosquito. *Indian Journal of Medical Research* **107**, 10-14.
- Naudé, T. J.** (1924). A new jassid in South-Africa. *J. Nat. Hist.* **4**, 307.
- Nault, L. R.** (1997). Arthropod Transmission of Plant Viruses : A new Synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* **90**(5), 521-541.
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D. & Czosnek, H.** (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185**, 151-161.
- Navot, N., Zeidan, M., Pichersky, E., Zamir, D. & Czosnek, H.** (1992). Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. *Phytopathology* **82**, 1199-1202.

NGuessan, P., Pinel, A., Caruana, M. L., Frutos, R., Sy, A., Ghesquiere, A. & Fargette, D. (2000). Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle sobemovirus in Cote d'Ivoire. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 167-178.

Nielson, M. W. (1968). The leafhopper vectors of phytopathogenic viruses (Homoptera, Cicadellidae) taxonomy, biology and virus transmission. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* **1382**, 1-386.

Nuttall, P. A., Jones, L. D. & Davies, C. R. (1991). The role of arthropod vectors in arbovirus evolution. *Advances in Disease Vector Research* **8**, 15-45.

Okoth, V. A. O., Dabrowski, Z. T., Thottappilly, G. & Van Emden, H. F. (1987). Comparative analysis of some parameters affecting maize streak virus transmission of various *Cicadulina* spp. populations. *Insect Science Application* **8**, 295-300.

Omura, T. & Yan, J. (1999). Role of outer capsid proteins in transmission of Phytoreovirus by insect vectors. In *Advances in Virus Research, Vol 54*, pp. 15-43. Edited by K. Maramorosch, F. A. Murphy & A. J. Shatkin. 525 B Street/ Suite 1900/San Diego/CA 92101-4495/USA: Academic Press Inc.

Otim-Nape, G. W. & Thresh, J. M. (1998). The current pandemic of cassava mosaic virus disease in Uganda. In *The epidemiology of plant diseases*, pp. 423-443. Edited by D. G. Jones. Dordrecht: Kluwer Academic.

Ozzam, O., Frazer, J., De La Rosa, D., Beaver, J. S., Ahlquist, P. & Maxwell, D. P. (1994). Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **204**, 289-296.

Paterniani, E., Perez, F., Reinarch, F., Tundisi, J. G., Xu, Z., Fang, R., Yingqian, Q., Sharma, R. P., Sopory, S. K., Tandom, P. N., Jain, H. K., Sharma, M., Paroda, R. S., Varma, A., Sahai, S., Thomas, J., Muralidhar, K., Larson, J., Nieto-Sotelo, J., Sarukhan, J., Heap, B., Klug, A., Gale, M., Lipton, M., Bowden, R., Akhtar, M., Alberts, B., Rowland, F. S., Sequiera, L., Cook, R. J., McCalla, A. & Campbell, J. (2000). Transgenic plants and world agriculture, <http://bob.nap.edu/html/transgenic/notice.html> edn, pp. 40. Washington, D.C.: National Academic Press.

Peiffer, M. L., Gildow, F. E. & Gray, S. M. (1997). Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *Journal of General Virology* **78**, 495-503.

Pernet, A., Hoisington, D., Franco, J., Isnard, M., Jewell, D., Jiang, C., Marchand, J.-L., Reynaud, B., Glaszmann, J.-C. & González de León, D. (1999a). Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. I Resistance in line D211 and stability against different virus clones. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 524-539.

Pesic-Van Esbroeck, Z., Harris, K. F. & Duffus, J. E. (1995). Immunocytochemical localization of squash leaf curl virus in squash and the sweet potato whitefly. *Phytopathology* **85**, 1180.

Pernet, A., Hoisington, D., Dintinger, J., Jewell, D., Jiang, C., Khairallah, M., Letourmy, P., Marchand, J.-L., Glaszmann, J.-C. & González de León, D. (1999b). Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. II Resistance in line CIRAD390 and stability across germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 540-553.

Peterschmitt, M., Granier, M., Frutos, R. & Reynaud, B. (1996). Infectivity and complete nucleotide sequence of the genome of a genetically distinct strain of maize streak virus from Reunion Island. *Archives of Virology* **141**, 1637-1650.

Peterschmitt, M., Quiot, J. B., Reynaud, B. & Baudin, P. (1992). Detection of maize streak virus antigens overtime in different part of maize plants of a sensitive and a so-called tolerant cultivar by ELISA. *Annals of Applied Biology* **121**, 641-653.

Peterschmitt, M., Reynaud, B., Sommermeyer, G. & Baudin, P. (1991). Characterization of MSV isolates using monoclonal and polyclonal antibodies and by transmission to a few hosts. *Plant Disease* **75**, 27-32.

Pinner, M. S., Medina, V., Plaskitt, K. A. & Markham, P. G. (1993). Viral inclusions in monocotyledons infected by maize streak and related geminiviruses. *Plant Pathology* **42**, 75-87.

Pirone, P. & Thornbury, D. W. (1988). Quantity of virus required for aphid transmission of a potyvirus. *Phytopathology* **78**, 104-107.

Pirone, T. P. & Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 227-247.

Pollard, D. G. (1969). Directional control of the stylets in phytofagous Hemiptera. *Proc. R. Ent. Soc. Lond.* **44**, 173-185.

Polston, J. E., Al-Musa, A., Perring, T. M. & Dodds, J. A. (1990). Association of the nucleic acid of squash leaf curl geminivirus with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology* **80**, 850-856.

Polston, J. E. & Anderson, P. K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant disease* **81**, 1358-.

Powell, G., Pirone, T. & Hardie, J. (1995). Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an in vitro system that correlate with subsequent transmission. *European Journal of Plant Pathology* **101**, 411-420.

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

Pringle, M. C. (1999). Virus Taxonomy. 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the international committee on taxonomy of viruses during 1998. *Archives of Virology* **144**, 1463-1466.

Rapusas, H. R. & Heinrichs, E. A. (1990). Feeding behavior of *Nephotettix virescens* (Homoptera : Cicadellidae) on rice varieties with different levels of resistance. *Environmental Entomology* **19**, 594-602.

Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann, M. & Wittwer, C. (1998). Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica* **2**, 8-11.

Reese, J., Tjallingii, W. F., Van Helden, M. & Prado, E. (2000). Waweform comparisons among AC and DC electronic monitoring systems for aphid feeding behavior. In : G. P. Walker and E. A. Backus (eds), *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Hemipteran Feeding Behavior*. Thomas Say Publications in Entomology : Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, USA (in press).

Reynaud, B. (1988). Transmission des virus de la striure, du stripe et de la mosaïque du maïs par leurs vecteurs, *Cicadulina mbila* (Naude, 1924) et *Peregrinus maidis* (Ashmead, 1890) (*Homoptera*). Approches biologique, génétique et épidémiologique de la relation vecteur-virus-plante. In *Physiologie et Biologie des Organismes et Populations*, pp. 173. Montpellier, France: Université des Sciences et Techniques du Languedoc.

Reynaud, B. & Peterschmitt, M. (1992). A study of the mode of transmission of MSV by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology* **121**, 85-94.

Reynaud, B., Lett, J. M., Granier, F., Molinaro, Y., Grauer, M., Grondin, D., Lefrere, P., Pomes, J. & Peterschmitt, M. (1997). Electrical penetration graph from *Cicadulina mbila* and its application in plant breeding to screen a potential resistance of maize to MSV transmission. In *Maize Streak Disease Symposium*. September 8-11, Nelsput, South Africa.

Rodier, A., Assie, J., Marchand, J. L. & Herve, Y. (1995). Breeding maize lines for complete and partial resistance to maize streak virus (MSV). *Euphytica* **81**, 57-70.

Rose, D. J. W. (1978). Epidemiology of maize streak disease. *Annual Review of Entomology* **23**, 259-282.

Rosell, R. C., Torres Jerez, I. & Brown, J. K. (1999). Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Virology* **89**, 239-246.

Roulston, A., Marcellus, R. C. & Branton, P. E. (1999). Viruses and apoptosis. *Annual Review of Microbiology* **53**, 577-628.

Rubinstein, G. & Czosnek, H. (1997). Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *Journal of General Virology* **78**, 2683-2689.

Ruppel, R. F. (1965). A review of the genus *Cicadulina* (Hemiptera, Cicadellidae). *Publications of the Michigan State University Museum* **2**, 347-428.

Rushing, A. E., Sunter, G., Gardiner, W. E., Dute, R. R. & Bisaro, D. M. (1987). Ultrastructural aspects of tomato golden mosaic virus infection in tobacco. *Phytopathology* **77**, 1231-1236.

- Rybicki, E. P.** (1994). A phylogenetic and evolutionary justification for three genera of Geminiviridae. *Archives of Virology* **139**, 49-77.
- Sauge, M. H.** (1999). Analyse des mécanismes de la résistance du pêcher *Prunus persica* (L.) Batsch au puceron vert *Myzus persicae* (Sylzer), pp. 187: Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.
- Sauge, M. H., Kervella, J. & Rhabé, Y.** (1998). Probing behaviour of the green peach aphid *Myzus persicae* on resistant *Prunus* genotypes. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **89**, 223-232.
- Sauvion, N.** (1995). Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Harris), pp. 195. Lyon, France: Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Seth, M. L., Raychaudhuri, S. P. & Singh, D. V.** (1972). Occurrence of maize streak virus on wheat in India. *Current Science* **41**, 684.
- Smith, M. C., Page, W. W., Holt, J. & Kyetere, D.** (2000). Spatial dynamics of maize streak virus disease epidemic development in maize fields. *International Journal of Pest Management* **46**, 55-66.
- Spiller, N. J., Koenders, L. & Tjallingii, W. F.** (1990a). Xylem ingestion by aphids - a strategy for maintaining water balance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **55**, 101-104.
- Spiller, N. J.** (1990b). An ultrastructural study of the stylet pathway of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **54**, 191-193.
- Stanley, J.** (1995). Analysis of african cassava mosaic virus recombinants suggests strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* **206**, 707-712.
- Stanley, J., Saunders, K., Pinner, M. S. & Man Wong, S.** (1997). Novel defective interfering DNAs associated with ageratum yellow vein geminivirus infection of *Ageratum conyzoides*. *Virology* **239**, 87-96.
- Stollar, V.** (1993). Insect-transmitted vertebrate viruses : alphetogaviruses. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**, 289-295.
- Storey, H. H.** (1925). The transmission of streak disease of maize by the leafhopper *Balclutha mbila* Naudé. *Annals of Applied Biology* **12**, 422-439.
- Storey, H. H.** (1928). Transmission studies of maize streak disease. *Annals of Applied Biology* **15**, 1-25.
- Storey, H. H.** (1932). The inheritance by an insect vector of the ability to transmit a plant virus. *Proc. Roy. Soc. B.* **112**, 46-60.
- Storey, H. H.** (1933). Investigation of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors. I. *Proc. Roy. Soc. B* **113**, 463-485.

Storey, H. H. (1938). Investigation of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors II. The part played by puncture in transmission. *Proc. Roy. Soc. B.* **125**, 455-477.

Storey, H. H. (1939). Investigation of the mechanism of the transmission of plant viruses by insect vectors III. The insect's saliva. *Proc. Roy. Soc. B.* **127**, 526-542.

Stussi-Garraud, C., Mutterer, J., Delecalle, B., Rohfritsch, O. & Vantard, M. (1998). Routes intra- et intercellulaires utilisées par les virus de plantes pour le mouvement de cellule à cellule. *Virologie* **2**, 269-283.

Sudarshana, M. R., Wang, H. L., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (1998). Dynamics of bean dwarf mosaic geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Molecular and Plant Microbe Interactions* **11**, 277-291.

Suzuki, N., Sugawara, M., Kusano, T., Mori, H. & Matsuura, Y. (1994). Immunodetection of rice dwarf phytoeviral proteins in both insect and plant hosts. *Virology* **202**, 41-48.

Tabachnick, W. J. (1994). Genetics of insect vector competence for arboviruses. *Advances in Disease Vector Research* **10**, 93-108.

Tavella, L. & Arzone, A. (1993). Comparative morphology of mouth parts of *Zygimidia pullula*, *Empoasca vitis* and *Graphocephala pennatri* (Homoptera, Auchenorrhyncha). *Bulletin of Zoology* **60**, 33-39.

Thottappilly, G., Bosque-Pérez, N. A. & Rossel, H. W. (1993). Viruses and virus diseases of maize in tropical Africa. *Plant Pathology* **42**, 494-509.

Tjallingii, W. F. (1978). Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **24**, 521-530.

Tjallingii, W. F. (1985a). Electrical nature of recorded signals during stylet penetration by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**, 177-186.

Tjallingii, W. F. (1985b). Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**, 187-193.

Tjallingii, W. F. (1988). Electrical recording of stylet penetration activities. In : Minks, A. K., and Harrewijn, P. (eds.), *Aphids : Their Biology, Natural Enemies and Control*. Elsevier, Amsterdam. vol. **2B**, 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.

Tjallingii, W. F. (1994). Sieve element acceptance by aphids. *European Journal of Entomology* **91**, 47-52.

Tjallingii, W. F. (2000). Comparison of AC and DC-systems for electrical recordings of stylet penetration activities by aphids. In : G. P. Walker and E. A. Backus (eds), *Principles and Applications of Electronic Monitoring and Other Techniques in the Study of Hemipteran*

Feeding Behavior. Thomas Say Publications in Entomology : Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, USA (in press).

Ullman, D. E., Cho, J. J., Mau, R. F. L., Westcot, D. M. & Custer, D. M. (1992). A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. *Phytopathology* **82**, 1333-1342.

Van den Heuvel, J. F. J. M., 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**, 2559-2565.

Van den Heuvel, J. F. J. M., Bruyere, A., Hogenhout, S. A., Ziegler Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., Van der Wilk, F. & Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology* **71**, 7258-7265.

Van den Heuvel, J. F. J. M., Hogenhout, S. A. & Van der Wilk, F. (1999). Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends in Microbiology* **7**, 71-76.

Villarreal, L. P. (1999). DNA virus contribution to host evolution. In *Origin and evolution of viruses*, pp. 391-420. Edited by E. Domingo, R. Webster & J. J. Holland. London: Academic Press.

Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* **96**, 14147-14152.

von Arnim, A., Frishmuth, T. & Stanley, J. (1993). Detection and possible functions of African cassava mosaic virus DNA B gene products. *Virology* **192**, 264-272.

Walker, G. P. & Perring, T. M. (1994). Feeding and oviposition behaviour of whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) interpreted from AC electronic feeding monitor waveforms. *Annals of the Entomological Society of America* **87**, 363-374.

Wang, H. & Nuttall, P. A. (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* **109**, 525-530.

Wang, H. L., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1996a). Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology* **86**, 1204-1214.

Wang, R. Y., Ammar, E. D., Thornbury, D. W., Lopez-Moya, J. J. & Pirone, T. P. (1996b). Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *Journal of General Virology* **77**, 861-867.

Wang, X. & Zhou, G. (1998). 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, UK, Abstr.1.13.16.

Wayadande, A. C. & Nault, L. R. (1993). Leafhopper probing behavior associated with maize chlorotic dwarf virus transmission to maize. *Phytopathology* **83**, 522-526.

Webb, M. D. (1987). Species recognition in *Cicadulina* leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae), vectors of pathogens of Gramineae. *Bulletin of Entomological Research* **77**, 683-712.

Wright, J. P. & Fisher, D. B. (1980). Direct measurement of sieve tube turgor pressure using severed aphid stylets. *Plant Physiology* **65**, 1133-1135.

Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., Garcia, J. A. & Gutiérrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology* **39**, 647-656.

Young, N. Y. & Goodman, L. J. (1990). Probing and feeding behaviour of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, (Homoptera ; Cicadellidae). *7Th Auchenorrhyncha Meeting, Wooster*.

Zeidan, M. & Czosnek, H. (1991). Acquisition of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology* **72**, 2607-2614.

Zeigler, R. S. & Morales, J. F. (1990). Genetic determination of replication of rice hoja blanca virus within its planthopper vector, *Sogatodes oryzae*. *Phytopathology* **80**, 559-566.

Annexes



Larves de cicadelles dont l'une s'est alimentée sur un milieu artificiel contenant un colorant Rouge Neutre, marqueur de l'alimentation (gauche), et l'autre sur une plante de maïs (droite).

Exe 1. Etude de l'implication des symbionines dans la capacité de transmission individuelle du MSV par *C. mbila* suite à un traitement aux antibiotiques.

	Protocole n°1	Protocole n°2	Protocole n°3
ement Antibiotique	8/20 (40%)	18/40 (45%)	26/40 (65%)
oins NON traités	9/20 (45%)	14/40 (35%)	33/40 (82.5%)

% de transmission

ore de plants présentant des symptômes / nombre de plants testés

ocole n°1

ement 6h	Transfert sur Maïs	Traitement 6h	AAP 24 heures	IAP Individuel 3 jours	Relevé final des symptômes IAP+30jours
tracycline#	12h	Tétracycline	Maïs virosé	Maïs sain	

ocole n°2

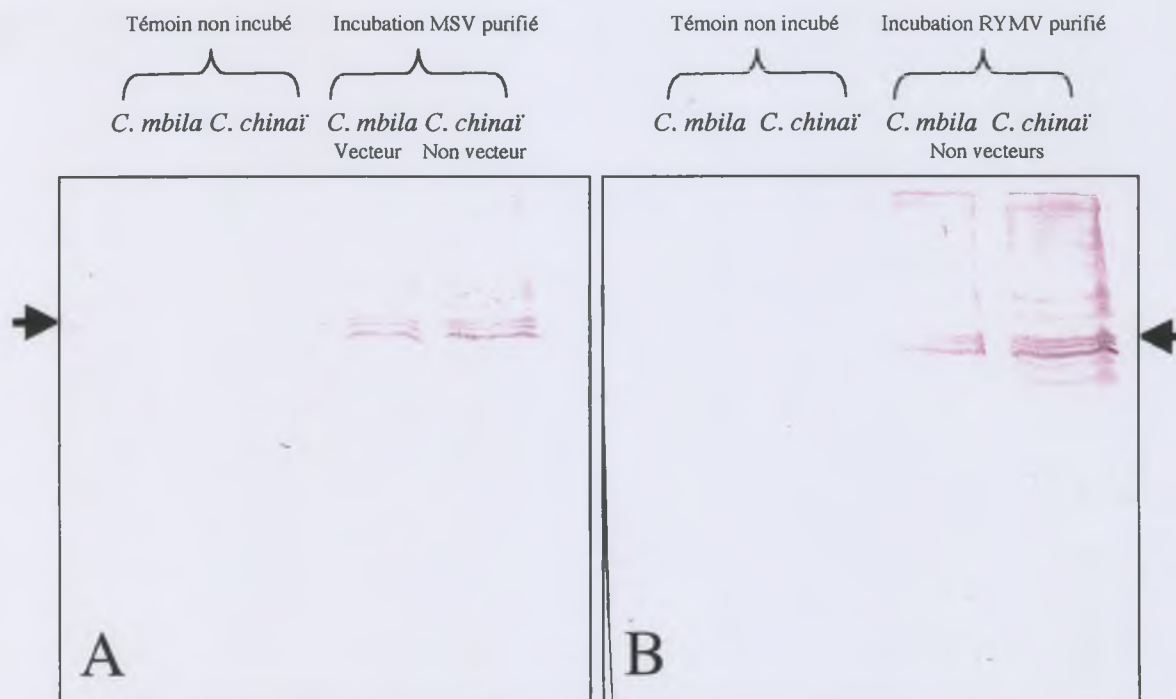
aitement 12h	AAP 24 heures	IAP Individuel 24 heures	Relevé final des symptômes IAP+30jours
étracycline#	Maïs virosé	Maïs sain	

ocole n°3

aitement 12h	AAP 12 heures	IAP Individuel 12 heures	Relevé final des symptômes IAP+30jours
tail d'antibiotiques*	Maïs virosé	Maïs sain	

étracycline et rifampicine 50 µg/ml, ampicilline 100 µg/ml, lysozyme 250 µg/ml, kanamycine et streptomycine 30 µg/ml

50 µg/ml



Annexe 2. Etude en Far-western de l'affinité d'extrait purifié de virus (ligand) pour des protéines d'insectes (récepteurs hypothétiques). Un extrait brut de protéines obtenues par broyage de cicadelles entières est séparé par électrophorèse. La capacité d'accrochage des virions de MSV (A), DSV et RYMV (B) sur des protéines de cicadelles vectrices et non vectrices, est révélée par une technique immuno-enzymatique à l'aide d'anticorps spécifique de chaque virus et de la phosphatase alcaline. Les bandes majeurs (flèches) ont des tailles similaires à celles des protéines homologues de GroEL (~63 kDa) décrites chez les pucerons et les aleurodes. Cette observation suggère l'intervention possible des bactéries endosymbiotiques des cicadelles dans la transmission des mastrévirus, comme cela a été montré pour les virus de la famille *Luteoviridae* transmis par puceron et le TYLCV transmis par aleurode. Aucune bande (récepteur putatif) n'a pu être associée à la spécificité de transmission circulante du MSV par *C. mbila*.

Annexe 3. Etude histologique de la fixation du *Maize streak virus* au niveau des cellules épithéliales du tractus intestinal de *Cicadulina mbila*.

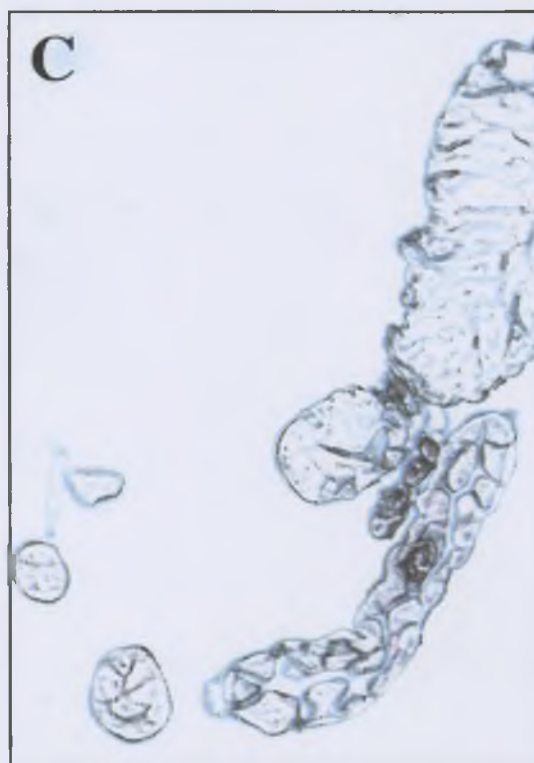
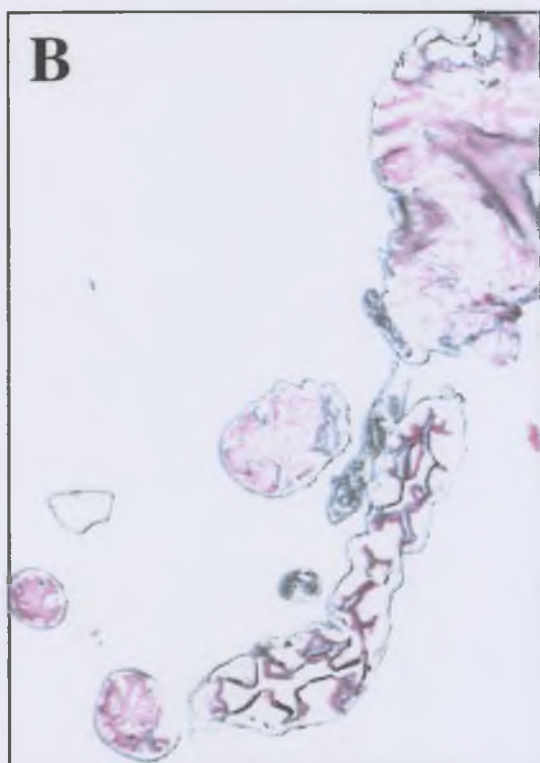
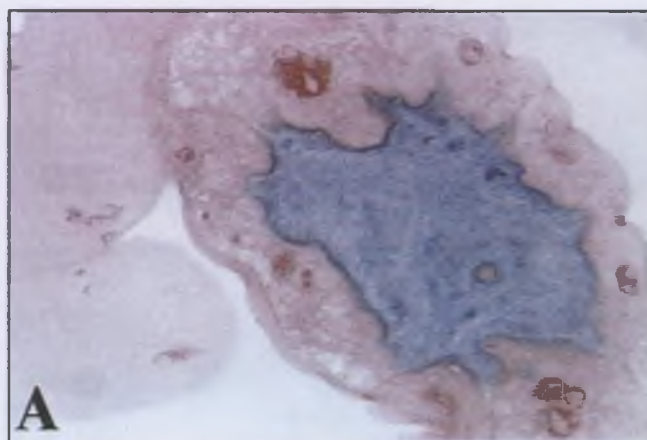


Figure A. Coupe transversale de l'intestin moyen de *C. mbila* inclus dans une résine de type méthacrylate et colorié à l'Azan de Heidenhain. Les cellules de l'épithélium présentent une coloration rouge et la bordure en brosse une intense coloration bleue. La lumière intestinale a également une coloration bleue mais plus diffuse.

Figures B et C. Détection immuno-enzymatique de la fixation d'extraits purifiés de MSV sur les bords en brosse de l'intestin moyen de *C. mbila*, inclus dans une résine dérésinable. La révélation en présence de virus (A) a été faite par comparaison avec une révélation en absence de virus (B). Un marquage équivalent a été obtenu sur la bordure en brosse des cellules épithéliales de l'intestin moyen du témoin non vecteur *C. chinai*.

Summary

Most of the plant viruses rely for their transmission, on a third organism, most often arthropods. The efficiency with which a virus is transmitted by its vector(s) is determinant on the severity of epidemics. This efficiency mainly depends from the acquisition and inoculation capacities, and from the persistence and dynamic of the virus in its vector. These two components were investigated in the case of the circulative transmission of the *Maize streak mastrevirus* (MSV; *Geminiviridae*) through *Cicadulina mbila* (*Homoptera*, *Cicadellidae*).

Firstly, the feeding behavior of *C. mbila* on maize was analysed using direct current electropenetrography (EPG-DC). Five electrical signals were identified and analysed by statistical analysis. For three of them, the stylet pathway within the plant tissue was monitored by transmission electron microscopy (TEM). Based on the correlation between the EPG signal and the TEM data, characteristic feeding activities could be associated to each signal : stylets penetration into the leaf lamina (signal 1), active ingestion of non phloemic cell content (signal 2), stylet work (signal 3), salivation and passive ingestion in the sieve tubes (signal 4 and 5, respectively). Unlike aphids which only briefly probe into non phloem cells, *C. mbila* is probing vigorously in these cells (signal 2). This specificity of *C. mbila* feeding behavior seems to be correlated to its efficiency to acquire geminivirus particles known to be accumulated within the nucleus. This specific feeding behavior was compared to that of whiteflies of the genus *Bemisia*, vector of the geminiviruses of the genus *Begomovirus*, for which such a vigorous probing was not described.

Secondly, spatial and temporal distribution of MSV was monitored in the vector species *C. mbila* and a non vector species *C. chinaii*, using conventional and/or real-time quantitative PCR. Sustained feeding on MSV infected plants, showed that virus accumulation reaches a maximum in *C. chinaii*, but not in *C. mbila*. After a 3-day acquisition access feeding period (AAP), MSV is detected in the gut, the hemolymph, and the salivary glands of *C. mbila*, but only in the gut of *C. chinaii*. Similarly, *Digitaria streak mastrevirus* which is not transmitted by any of the two species, is only detected in the gut confirming that the gut wall is a physical barrier in the case of non transmission. MSV was detected in the hemolymph of *C. mbila* 3 hours after the beginning of the AAP. Although viral DNA is progressively decreasing in the vector and non vector species after a 3-day AAP, MSV DNA remained stable in the salivary glands of *C. mbila*. This enabled us to propose a model explaining the circulation of the geminivirus through their leafhopper vectors, consistent with the circulative nonpropagative transmission.

Key words: phytovirus, transmission, barrier, vector, geminivirus, mastrevirus, MSV, streak, leafhoppers, feeding behavior, EPG, persistence, detection, quantitative PCR, virion flow.

Résumé

La plupart des virus phytopathogènes ont développés des interactions avec des organismes tiers pour leur transmission, le plus souvent des arthropodes. L'efficacité avec laquelle un virus est transmis par son ou ses vecteur(s) est un facteur déterminant pour la gravité des épidémies. Cette efficacité dépend principalement de la capacité d'acquisition et d'inoculation du virus lors d'une alimentation sur une plante, et de la persistance et de la dynamique du virus dans son vecteur. Ces deux paramètres ont été étudiés dans le cas de la transmission circulante du *Maize streak mastrevirus* (MSV ; *Geminiviridae*) par *Cicadulina mbila* (*Homoptera*, *Cicadellidae*).

Premièrement, nous avons étudié le comportement alimentaire de *C. mbila* sur maïs, en utilisant l'électropénétrographie en courant continu (EPG-DC). Cinq types de signaux ont été différenciés et caractérisés par des analyses statistiques. Pour trois signaux, le trajet tissulaire et cellulaire des stylets de l'insecte a été analysé en microscopie électronique à transmission (MET). En se basant sur la corrélation entre les signaux EPG et les données en MET, les signaux ont pu être associés à des activités alimentaires caractéristiques : la pénétration des stylets dans le limbe (signal 1), l'ingestion active de fluides cellulaires non phloémiens (signal 2), le mouvement des stylets (signal 3), la salivation dans le phloème (signal 4) et l'ingestion passive dans le phloème (signal 5). Contrairement aux pucerons qui se contentent de faire de brèves ponctions cellulaires, *C. mbila* effectue un pompage vigoureux dans les cellules non phloémiennes. Cette particularité du comportement alimentaire de *C. mbila* semble corrélée à son efficacité à acquérir des particules de gémiovirus cloisonnées dans le noyau des cellules. Une comparaison a été faite avec le comportement alimentaire des aleurodes, vecteurs des gémiovirus du genre *Begomovirus*, pour lesquels un tel pompage n'a pas été décrit.

Deuxièmement, une analyse spatio-temporelle du virus à travers les différents compartiments de l'insecte, impliqués dans la transmission circulante, a été menée par des techniques de détection basées sur l'amplification de l'ADN viral et particulièrement la PCR quantitative. Les travaux ont porté sur la comparaison entre une population de *C. mbila* sélectionnée, dont 100 % des individus transmettent le MSV, et une population de cicadelles d'une espèce non vectrice *C. chinaii*. Les tests de transmission naturels et artificiels du MSV et du *Digitaria streak mastrevirus* (DSV), confirment que le MSV est transmissible par *C. chinaii* si le virus est injecté directement dans l'hémolymphe, contrairement au DSV. L'alimentation continue sur plante virosée montre que l'accumulation du MSV chez *C. chinaii* est limitée à un seuil, à l'inverse de chez *C. mbila*. La persistance du MSV, dans les insectes entiers et dans l'intestin, l'hémolymphe et la tête des insectes disséqués, est étudiée après une période d'acquisition alimentaire infectieuse de trois jours. Le MSV est détecté pendant une dizaine de jours chez *C. chinaii* et pendant tout le test (25 jours) chez *C. mbila*. Dans le cas de la non transmission, nous avons montré que la paroi intestinale représente une barrière physique pour le virus. Tandis que pour le couple MSV/*C. mbila*, un passage rapide du virus (3 heures), de l'intestin vers l'hémolymphe, a été observé. La persistance d'une charge virale stable dans les glandes salivaires, suggère un flux polarisé des virions à partir de l'hémolymphe et de l'intestin, où la concentration en virus est décroissante pendant tout le test. Ces données quantitatives nous permettent de proposer un modèle dynamique de la transmission circulante non multipliante des gémiovirus par cicadelles.

Mots-clés : Phytovirus, transmission, barrière, vecteur, gémiovirus, mastrévirus, MSV, striure, cicadelle, comportement alimentaire, EPG, persistance, détection, PCR quantitative, flux des virions.